universidad ^{de}león

ACTIVIDAD Y MODO DE ACCIÓN LEISHMANICIDA DE NUEVOS DERIVADOS DE LA PODOFILOTOXINA Y QUINONAS

Jose Miguel Escudero Martínez

Dpto. Ciencias Biomédicas

Área de Toxicología

León, Septiembre de 2015

Índice

Índice	1
1 Introducción	11
1.1 La leishmaniosis y las enfermedades olvidadas	11
1.1.1 Historia de la enfermedad	11
1.1.2 Genero Leishmania	13
1.1.2.1 Ciclo biológico	17
1.1.2.1.1 Biología del vector	20
1.1.3 Formas clínicas	21
1.1.3.1 Leishmaniosis visceral o Kala-azar	22
1.1.3.2 Leishmaniosis cutánea	23
1.1.3.3 Leishmaniosis mucocutánea	24
1.1.4 Epidemiología	25
1.1.4.1 Coinfeción con VIH	27
1.1.4.2 La leishmaniosis en España	28
1.1.4.3 Leishmaniosis canina	29
1.1.5 Diagnóstico y prevención	30
1.1.6 Tratamiento de la leishmaniosis	32
1.1.6.1 Quimioterapia	32
1.1.6.1.1 Antimoniales pentavalentes (Sb $^{\vee}$)	32
1.1.6.1.2 Anfotericina B (Fungizone [®])	32
1.1.6.1.3 Miltefosina	33
1.1.6.1.4 Paromomicina	34
1.1.6.1.5 Alopurinol	35
1.1.6.1.6 Pentamidina	35
1.1.6.1.7 Azoles	36
1.1.6.1.8 Combinaciones de fármacos	36
1.1.6.2 Inmunoterapia	36
1.1.6.2.1 Vacunas de Primera generación	37
1.1.6.2.2 Segunda generación	37
1.1.6.2.3 Tercera generación	37
1.1.6.3 Resistencias	38

1.2 Microtúbulos y tubulina	39
1.2.1 Dinámica de ensamblado de los microtúbulos	40
1.2.2 Estructura de la tubulina	42
1.2.2.1 Dominio N-terminal	42
1.2.2.2 Dominio intermedio	43
1.2.2.3 Dominio C-terminal	44
1.2.2.4 Extremo C-terminal	44
1.2.3 Interacciones	44
1.2.3.1 Interacciones dentro del mismo protofilamento	45
1.2.3.2 Interacciones laterales	46
1.2.3.2.1 Interacción lateral α - α y β - β	46
1.2.3.2.2 Interacción lateral α - β y β - α	47
1.2.4 Sito de unión al GTP	47
1.2.4.1 Cambios conformacionales durante la hidrolisis de GTP	48
1.2.5 Inhibidores de la polimerización de tubulina	49
1.2.5.1 Dominio de unión de la colchicina	50
1.2.5.1.1 Lignanos	51
1.2.5.2 Dominio de unión de la vinca	52
1.2.5.3 Dominio de unión del taxol	54
1.2.5.4 Dominio unión de la laulimalida	55
1.2.6 Tubulina en Leishmania	56
1.3 ADN topoisomerasas	57
1.3.1 ADN topoisomerasas de tipo II	59
1.3.2 ADN topoisomerasa de tipo I	60
1.3.2.1 TopIA	60
1.3.2.2 TopIB	61
1.3.2.2.1 Inhibidores de la Topoisomerasa IB	66
1.3.2.2.1.1 La camptotecina	66
1.3.2.2.1.2 Topotecán	67
1.3.2.2.1.3 Irinotecán (CPT-11) y SN38	67
1.3.2.2.1.4 Indolocarbazoles (rebecamicina y derivados)	68
1.3.2.2.1.5 Indenoisoquinolinas	68
1.3.2.2.1.6 Quinonas	69

Índice

		1.3.2.2.1.7 Á	Ácido betulínico y derivados	70
		1.3.2.2.1.8 E	3erberina	70
		1.3.2.2.1.9 E	Bisbencimidazoles	71
		1.3.2.2.1.10	Diamidinas aromáticas	71
		1.3.2.2.1.11	Ácidos grasos acetilénicos y otros compuestos	72
	1.4	Bioinformáti	са	73
	1.4.2	Alineamie	ento de secuencias	73
	1.4.2	2 Predicciór	n de genes	74
	1.4.3	B Predicciór	n de estructuras	74
	1.4.4	Docking		75
	1.5	Nuevas estra	ategias para el descubrimiento de fármacos antiparasitarios	77
	1.5.2	Cribados l	basados en dianas (TBS)	77
	1.5.2	2 Cribados l	basados en Fenotipo (PBS)	77
	1.5.3	B Aplicaciór	n de patógenos modificados para el cribado fenotípico	de
	fármac	os		78
	1.5.4	El uso de t	tripanosomátidos fluorescentes en HTS	79
2	Ob	jetivos		85
3	Ma	aterial y méto	dos	89
	3.1	Material biol	lógico	89
	3.1.2	Cepa bact	eriana	89
	3.1.2	2 Cepa de L	evadura	89
	3.1.3	Cepas de	Leishmania	89
	3.1	.3.1 Promast	tigotes	89
	3.1	.3.2 Promast	tigotes que sobrexpresan la proteína infrarroja fluorescente (IRFP:	
	Inf	rared Fluoresce	ent Protein):	89
	3.1.4	Línea celu	ılar HepG2	90
	3.1.5	6 Ratones		90
	3.2	Vectores		91
	3.2.2	pLEXSY-hy	yg2	91
	3.2.2	2 pESC-URA	Α.	92
	3.3	Medios de cu	ultivo	92
	3.3.2	Medio SO	C	92
	3.3.2	2 Medio YP	D	92

3.3.	3 Medio S.C. ura-	93
3.3.	4 Medio M199	93
3.3.	5 Medio Schneider	93
3.3.	6 Medio RPMI	94
3.3.	7 Medios MEM y DMEN Glutmax	94
3.4	Mantenimiento de microorganismos	94
3.4.	1 Bacterias y levaduras	94
3.4.	2 Promastigotes de Leishmania spp	94
3.4.	3 HepG2	94
3.5	Determinación de la citotoxicidad y la selectividad	95
3.5.	1 Calculo de CI ₅₀ en cepas de <i>Leishmania</i> que sobreexpresan IRFP.70	95
3.	5.1.1 Ensayo dosis respuesta en promastigotes modificados con la proteína	
IR	FP.70	95
3.5.	2 Calculo de CI ₅₀ en células de mamífero	95
3.6	Extracción de macrófagos peritoneales	96
3.7	Obtención de explantes esplénicos de ratón	96
3.8	Calculo de CI ₅₀ en amastigotes de <i>Leishmania</i>	96
3.8.	1 Infecciones experimentales	97
3.9	Purificación de la Tubulina de <i>Leishmania</i>	97
3.10	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE	<u>-</u>) 98
3.10	0.1 Preparación del gel	98
3.	10.1.1 Preparación del gel separador	98
3.	10.1.2 Preparación del gel concentrador	99
3.10	D.2 Preparación de la muestra	99
3.10	0.3 Electroforesis	100
3.11	Tinción con Azul de Coomassie	100
3.12	Transferencia de Western	100
3.12	2.1 Inmunodetección de proteínas fijadas a una membrana	101
3.13	Medida de la polimerización de la tubulina de Leishmania	101
3.14	Purificación de ADN-topoisomerasa IB de Leishmania	102
3.14	4.1 Transformación de levaduras	102
3.	14.1.1 Sobrexpresión y purificación de proteínas	102

Índice

3.14.1.1.	1 Crecimiento e inducción de cultivos	102
3.14.1.1.	2 Obtención de extractos	103
3.14.1.1.	3 Purificación	103
3.14.2	Determinación de la actividad TopIB	105
3.14.3 E	Ensayo de Inhibición de la actividad de relajación	105
3.15 Estud	ios de bioinformática	106
3.15.1	Alineamiento de secuencias	106
3.15.2 (Construcción de modelos tridimensionales de proteínas	106
3.15.2.1	Selección de la secuencia	106
3.15.2.2	Creación de las plantillas y modelos	106
3.15.3 (Creación de modelos con mutaciones puntuales	107
3.15.4	Docking	107
4 Resultado	OS	111
4.1 Gener	ración de las cepas infrarrojas	111
4.2 Establ	lecimiento del modelo de fluorescencia en promastigotes	112
4.3 Establ	lecimiento y optimización del modelo de explantes esplenicos	114
4.4 Activi	dad citotóxica en cultivos primarios de células de mamífero	116
4.5 Lignar	nos	118
4.5.1 Co	mpuestos con sistema polianular tetracíclico: Lactonas	119
4.5.2 Co Lactonas.	mpuestos con sistema polianular tetracíclico TE. Lactama	y otras 122
4.5.3 Co a la posición C	mpuestos con sistema polianular tricíclico: con función aldehíc C-3	do unida 124
4.5.4 Co (imina o hidra	mpuestos con sistema polianular tricíclico: con función nitro zona) unida a la posición C-3.	ogenada 126
4.5.5 Co unidos directa	mpuestos con sistema polianular tricíclico: con grupos hetero amente a la posición C-3	ocíclicos 128
4.5.6 Oti	ros compuestos tricíclicos y tetracíclicos angulares	129
4.6 Quinc	onas	131
4.6.1 De quinónicos uti	escripción de la síntesis química y de los tipos de com ilizados en el estudio	puestos 131
4.6.2 Na	ftoquinonas terpénicas (TNQs)	133
4.6.3 Na	ftohidroquinonas terpénicas (TNHQs)	134

4.6.4 Naftohidroquinonas diterpénicas	(DNHQs) 135
4.6.5 Terpenil y Diterpenil Ant Antracenohidroquinonas (TAHQs)	racenoquinonas (TAQs, DAQs) y 137
4.6.6 Otros derivados quinónicos	139
4.7 Purificación de la tubulina de <i>Leis</i> polimerización	<i>hmania</i> y optimización del ensayo de 140
4.7.1 Inhibición de la polimerización de	e tubulina de <i>Leishmania</i> 142
4.7.1.1 Inhibición de la polimerización po tetracíclico	r los lignanos con sistema polianular 142
4.7.1.2 Inhibición de la polimerización de polianular tricíclico	tubulina por lignanos con sistema 143
4.8 Estudio del efecto inhibitorio sobre	a ADN topoisomerasa IB de <i>Leishmania</i> 145
4.8.1 Inhibición de la ADN topoisomera	asa IB de <i>Leishmania</i> por lignanos 146
4.8.2 Inhibición de la ADN topoisomera	asa IB de <i>Leishmania</i> por quinonas 147
4.9 Modelización de la tubulina de Leish	mania 150
4.9.1 Selección de la secuencia y planti	llas 150
4.10 Docking	153
4.11 Superficie del sitio de unión	155
5 Discusión	159
5.1 Mecanismo de acción de los derivad	os de la podofilotoxina en <i>Leishmania</i> 159
5.2 Lignanos	168
5.2.1 Modificaciones sobre la podofilo	coxina 168
5.2.2 Modificaciones sobre el aldehído	podofílico 173
5.3 Quinonas	179
6 Conclusiones	187
7 Biblioglafia	191
Anexo I: Formulas químicas de los compuesto	s 215
Anexo II: Promastigotes L. major	231
Anexo III: Promastigotes L. infantum	239
Anexo IV: Amastigotes L. infantum	247
Anexo V: Macrófagos peritoneales	255

Anexo VI: Esplenocitos	257
Anexo VII: Línea celular HepG2	265
Anexo VIII: Porcentaje de inhibición tubulina	273



1 Introducción

1.1 La leishmaniosis y las enfermedades olvidadas

Se conoce por leishmaniosis, el conjunto de enfermedades zoonósicas producidas por protozoos del género *Leishmania*, que afectan al ser humano y a varias especies de vertebrados superiores. La leishmaniosis cursa con lesiones en la piel, mucosa y órganos internos, pudiendo ser mortal si no se trata.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la leishmaniosis como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas (ETD) y prioriza su tratamiento y prevención. Dichas enfermedades, a pesar de afectar a más de mil millones de personas y de su alta mortalidad reciben muy pocos recursos para su erradicación. En la mayoría de los casos ETD afectan a países subdesarrollados y tienen una escasa incidencia para los países del primer mundo. Además el tratamiento genera un escaso beneficio comercial, por lo que el desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas es muy bajo. En el periodo comprendido entre los años 2000 al 2011, sólo el 4% de los nuevos productos registrados por la OMS fue para el tratamiento de ETDs, de los casi 150.000 ensayos clínicos llevados a cabo, solo 2016 (1,3 %) estuvieron relacionados con éstas y 121 (0,08%) fueron específicos de leishmaniosis (Pedrique y col., 2013).

Se calcula que 350 millones de personas se encuentran actualmente en riesgo de contraer leishmaniosis y que 12 millones están afectadas (World Health Assembly Resolution 2007/60.13). Según el informe Nº: 375 de la OMS (enero de 2014) la incidencia anual es de 1,3 millones de casos nuevos, con una mortalidad estimada de 20.000 a 30.000 fallecimientos al año. Desde que en 1990 la OMS redactara el primer informe sobre el control de la leishmaniosis, el número de casos no ha disminuido y se cree que ha aumentado debido al incremento de los factores de riesgo, entre los que se encuentran, cambios en el hábitat de los vectores y hospedadores ocasionados por el cambio climático, deforestación, movimientos migratorios, etc... (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004).

1.1.1 Historia de la enfermedad

En el viejo mundo la leishmaniosis era conocida como "botón de oriente". La primera referencia escrita se encuentra en las tablillas de la biblioteca del rey asirio Asurbanipal, cerca de Mosul en Irak. En estas tablillas del siglo VII a.C., aparecen las primeras descripciones de la enfermedad, aunque se cree que algunas de estas descripciones pueden estar tomadas de textos más antiguos, escritos 1.500 ó 2.500 años antes. En el siglo X d.C. el erudito árabe Avicena proporcionó descripciones más precisas de la enfermedad (Cox, 2002).

Jose Miguel Escudero Martínez

La leishmaniosis visceral o Kala-azar, se confundía normalmente con otras enfermedades que cursaban con los mismos síntomas, como por ejemplo la malaria. De este modo muchos médicos entre los que se encuentra Ronald Ross, premio Nobel por descubrir el ciclo biológico del parásito *Plasmodium*, describieron el Kala-azar como un tipo de malaria más virulenta (Cox, 2002). En 1756, el médico escocés Alexander Russell destinado en una factoría inglesa de Alepo (Siria), describió los síntomas de una plaga que arrasó la ciudad refiriéndose a ella como "botón de Alepo". En un principio se creyó que la plaga era de peste bubónica, pero sus descripciones concuerdan con los síntomas de la leishmaniosis (Hawgood, 1994). La primera notificación del Kala-azar se produjo en el norte de la India, en la población de Jessore en 1824, donde varios pacientes que sufrían de altas fiebres fueron tratados ineficazmente con quinina, tratamiento usado para malaria. En esta epidemia se contabilizaron un total de 75.000 muertes en apenas tres años (Bern y Chowdhury, 2006).

En el Nuevo Mundo hay menos información debido a la falta de tratados médicos. Las lesiones cutáneas y deformaciones características aparecen en piezas de cerámica y artesanía de las culturas, Mochica (1330 a.C.- 500 d.C.) y Chimú (1000-1400 d.C.), situadas en el actual Perú y Ecuador. No fue hasta el siglo XVI con la llegada de los conquistadores españoles cuando se tuvieron las primeras descripciones clínicas de la enfermedad, dadas por Fernando de Oviedo (1535), Pedro Pizarro (1571) y Fernando de Santillán (1572); se la denominó "enfermedad de los Andes", "enfermedad del valle" o "lepra blanca" ya que las lesiones mucocutáneas causadas por la leishmaniosis son muy parecidas a las causadas por la lepra (Gade, 1979).

La primera descripción del agente se debe a un cirujano militar ruso Piotr F. Borovsky (Figura 1A) que a raíz de los estudios sobre el Kala-azar que realizó en Taskent (Uzbekistán), en 1898, describió la presencia de un protozo responsable de las lesiones cutáneas de los individuos infectados (Cook, 1993). No fue hasta principios del siglo XX cuando el médico escocés, William Leishman (Figura 1B) que trabajaba en el Royal Victoria Hospital (Netley, Inglaterra) y el profesor de Fisiología de la Universidad de Madrás (India), Charles Donovan (Figura 1C), publicaron los resultados obtenidos de forma independiente sobre el agente etiológico responsable del Kala-azar (Donovan, 1903; Leishman, 1903). A su vez, Javes H. Wright (Wright, 1903) describió inequívocamente el agente causante de la leishmaniosis cutánea, está ya había sido descrita años antes por el médico escocés David Cunningham, destinado en el ejército inglés en la India, aunque sin establecer la relación existente entre éste y la enfermedad (Cox, 2002).



Figura 1.- (A) Piotr Fokich Borovsky (1863-1932), (B) Teniente General Sir William Boog Leishman (1865-1926) y (C) Charles Donovan (1863-1951) (Cook, 2008).

Apenas un año después del descubrimiento de Leishman y Donovan, Leonard Rogers consiguió cultivar los parásitos causantes de la enfermedad y ver el cambio de estos parásitos redondeados a las formas alargadas y flageladas que hoy conocemos como promastigotes. También planteó que la enfermedad podría ser transmitida por algún artrópodo (Killick-Kendrick, 2013).

Después de la primera guerra mundial la búsqueda del vector se centró en los artrópodos hematófagos como, pulgas, piojos, reduvídeos (chinches asesinas), chinches, mosquitos, moscas de los establos y garrapatas entre otros. Pero fue un informe de Charles Wenyon en 1912, sobre flagelados no identificados en el intestino de moscas de arena en la zona de Alepo (Siria), una zona con gran prevalencia de la leishmaniosis, el que centró la búsqueda en estos dipteros. Estudios posteriores establecieron una correlación de la distribución de moscas de la arena (*Phlebotomus sp.*) con la enfermedad y finalmente, Edmond Sergent descubrió, que si realizaba escarificaciones en la piel y aplicaba sobre ellas promastigotes obtenidos de *Phlebotomus papatasi*, se podía contraer leishmaniosis (Killick-Kendrick, 2013).

1.1.2 Genero Leishmania

El género *Leishmania*, se clasifica dentro del filo Euglenozoa, clase Kinetoplastea, orden Trypanosomatida y la familia Trypanosomatidae, pues los protozoos poseen un flagelo y un kinetoplasto dentro del cual se encuentra una acumulación compacta de ADN. El kinetoplasto es un orgánulo positivo a la tinción de Feulgen debido a la acumulación maxiva de maxi y minicirculos de ADN extranuclear imprescindible en la fisiología del microorganismo. Todos los miembros del genero *Leishmania* son parásitos heteroxenos que precisan de dos hospedadores para completar su ciclo biológico; las hembras de díptero de los géneros *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Luztomyia* (en el Nuevo Mundo) actuaran como vector de transmisión (Maslov y col., 2013). El

hospedador definitivo es un vertebrado superior como el perro, algún mamífero salvaje o el hombre. El parásito presenta diferencias morfológicas y bioquímicas según se encuentre en uno u otro hospedador. Así la forma residente en el insecto se denomina promastigote, es móvil, fusiforme y muy parecido a un hemoflagelado y por otra parte, el amastigote intracelular es redondeado, carece de flagelo y reside en el interior de las células del sistema monocítico-fagocitario del hospedador definitivo (Figura 2).



Figura 2.- (A) Amastigotes en el interior de un macrófago (GEFOR); (B) promastigotes (GEFOR). (C) Representación esquemática de los principales orgánulos intracelulares de un promastigote (izquierda) y de un amastigote (derecha) (Besteiro y col., 2007).

La superficie de los promastigotes está recubierta por un glicocálix, formado por moléculas importantes para la supervivencia del parásito y la patogénesis. De entre ellas destaca el lipofosfoglicano (LPG), el proteofosfoglicano (PPG), la metaloproteinasa GP63 y lípidos derivados del ácido glicofosfatidilinositol (GIPLs). Estas moléculas recubren el parásito formando un escudo protector y su polimorfismo ayuda a clasificar las diferentes cepas de *Leishmania* (McConville y Ferguson, 1993; McConville y col., 2002). *Leishmania* también segrega moléculas de fosfoglicano, como el PPG y la fosfatasa ácida (sAP) (Sacks y Kamhawi, 2001).

El LPG constituye el glicoconjugado más abundante de la superficie de los promastigotes (5x10⁶ moléculas/parasito) de *Leishmania*. Está unido a la membrana del parásito mediante el anclaje a una molécula de GIPL, seguido de un núcleo de heptasacárido al que a su vez se une un polímero compuesto de 15 a 30 unidades repetidas de galactosa y manosa y un oligosacárido terminal. La composición de los

azúcares de las unidades repetidas varía en función de la especie y de la fase de desarrollo del parásito (Descoteaux y Turco, 1999).

Los PPG se pueden clasificar en PPG secretados (sPPG) y PPG de membrana (mPPG) (Figura 3). Los mPPG constan de un gran domino central de hasta 100 repeticiones de serinas fosfoglicosiladas y un dominio de unión a membrana muy parecido al que presentan los LPG, con una molécula de anclaje seguida de un núcleo de azúcares (Montgomery y col., 2002). Los promastigotes procíclicos y metacíclicos de *Leishmania* expresan grandes cantidades de LPG en su superficie, en contraste con la expresión atenuada en amastigotes y la expresión aumentada de PPG en el interior de los macrófagos (Turco y Sacks, 1991).

La GP63 es una zinc metaloproteasa expresada mayoritariamente en el promastigote, cuya máxima actividad se da con pH ácido, como el del interior del intestino del vector, y cuya función es la rotura inespecífica de enzimas lisosómicas (Olivier y col., 2012).



Figura 3.- Estructura esquemática del lipofosfoglicano (LPG) y proteofosfoglicano de membrana (mPPG) (Capul y col., 2007)

El genoma de *Leishmania* es aneuploide y para las especies del viejo mundo (*L. donovani, L. infantum, L. major, L. tropica, L. aethiopica*) se organiza en 36 cromosomas; *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el muevo mundo tienen 34 y 35 respectivamente. Su genoma presenta un alto grado de sintenia entre diferentes especies de *Leishmania* e incluso con algunas de tripanosomátidos (Sterkers y col., 2012). Los genes de *Leishmania* no presentan intrones y además, aunque el tamaño de los cromosomas es menor que el de otros organismos, presentan un mayor número de genes altamente empaquetados.

Jose Miguel Escudero Martínez

Dichos genes se pueden organizar en una o en ambas hebras de ADN, formando transcritos policistrónicos a partir de promotores no definidos. El proceso de *trans-splicing* es expecifico de Kinetoplastidos, y representa un paso necesario para el procesado de los ARNm en estos eucariotas inferiores (Kazemi, 2011).

 Tabla 1.- Nueva propuesta de nomenclatura de Leishmania spp. basada en la secuencia del gen hsp70 (Antinori y col., 2012).

Genero	Complejo	Especie	Distribución geográfica	Especie según el análisis hsp 70
L. (Leishmania)	L. donovani	L. donovani	China, subcontinente indio, Etiopía, Sudán, Kenia, Irán, Arabia Saudí, Yemen	L. donovani
		L. infantum	Albania, Argelia, Francia, España, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal, Siria, Túnez, Turquía, Yemen	
		L. chagasi	Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Guayana holandesa Honduras, Martinica, México, Nicaragua, Paraguay, Venezuela	
		L. archibaldi	India, Sudán, Etiopía, Líbano, Israel	
	L. tropica	L. tropica	Afganistán. Argelia, Azerbaiyán, Grecia, Irán, Irak, Israel, Marruecos, Túnez, Turquía, Yemen	L. tropica
		L. aethiopica	Etiopía, Kenia	
		L. major	Afganistán, Argelia, Chad, Irán, Irak, Israel, Libia, Mauritania, Marruecos, Siria, Sudán	L. major
	L. mexicana	L. mexicana	Belice, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Venezuela	L. mexicana
		L. amazonensis	Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana francesa, Panamá, Perú, Venezuela	
		L. garnhami	Venezuela	
L. (Viannia)	L. guyanensis	L. guyanensis	Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Perú, Guayana holandesa, Venezuela	L. guyanensis
		L. panamensis	Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Venezuela	
		L. naiffi	Brasil, Guayana francesa, Ecuador, Perú	L. naiffi
	L. braziliensis	L. braziliensis	Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua	L. braziliensis
		L. peruviana	Perú	
		L. lainsoni	Brasil, Bolivia, Perú	L. lainsoni

Los genomas completos de tres de las especies principales de *Leishmania* (*L. major, L. infantum* y *L. braziliensis*) han sido secuenciados en los últimos 10 años, mostrando la existencia de más de 8.300 genes codificadores de proteínas, de los cuales únicamente un 35% tiene asignada una función concreta. Casi el 40% de los genes codificadores de proteínas se pueden clasificar dentro de 662 familias con un número de miembros que oscila entre 2 y 500. Los genes grandes suelen estar dispersos a lo largo de todo el genoma, agrupados en tándem en diferentes *loci*, mientras que la mayoría de familias de genes pequeños forman grupos de uno a tres genes (Myler, 2008).

Las primeras clasificaciones filogenéticas de tripanosomatidos fueron realizadas por Horae y Wallace en función de la morfología basándose en la situación del flagelo y del kinetoplasto (Maslov y col., 2013). Este tipo de clasificación no permite diferenciar entre especies de *Leishmania*, ya que morfológicamente presentan las mismas características. Por ello, históricamente estos parásitos se han clasificado según su distribución geográfica, la especificidad en cuanto al vector invertebrado que los transmite, el tropismo tisular y las manifestaciones clínicas (Pratt y David, 1981). Actualmente se siguen desarrollando nuevos métodos de identificación como los basados en la espectrometría de masas (Mouri y col., 2014). Otra clasificación a seguir es la que emplea las secuencias de genes muy consevados como la proteína de choque térmico 70 (Hsp70). Según estos autores, dentro del complejo de *L. donovani*, únicamente *L. donovani* mantendría el nivel de especie y *L. donovani infantum* debería ser considerada como una subespecie. De forma similar, solamente *L. tropica*, y no *L. aethiopica*, conservaría el nivel de especie, mientras que *L. major* se consideraría una especie independiente (Tabla 1) (Montalvo y col., 2010).

1.1.2.1 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Leishmania* es heteroxeno y en él se diferencian dos fases de desarrollo replicativo, el promastigote (forma móvil) localizado en el interior del intestino de las hembras de las moscas de los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, que actúan como vector; y los amastigotes, formas quiescentes de pequeño tamaño (3 a 5 μ m), que se localizan en los fagolisosomas de los macrófagos infectados del hospedador vertebrado.

El ciclo se inicia cuando un flebótomo ingiere sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes. El cambio de condiciones del hospedador al vector, como la temperatura y el pH provocará la transformación del amastigote a promastigote. La ubicación del parásito en el vector depende de la especie de *Leishmania*. Así, en *L. braziliensis* llega al intestino posterior antes de migrar hacia la probóscide; sin embargo, la mayoría de las especies de *Leishmania* limitan su desarrollo al intestino medio (Figura 4) (Dostalova y Volf, 2012).



Figura 4.- Ciclo biológico del parásito *Leishmania spp*. En naranja se muestran los acontecimientos desarrollados en el interior del insecto vector, mientras que en azul se representa la etapa en el hospedador mamífero.

Los promastigotes pasan por varias fases morfológicas diferentes en el interior del insecto. De este modo, los promastigotes procíclicos, constituyen la primera forma replicativa y se dan dentro de la matriz peritrófica, generada tras la ingesta de sangre por el epitelio intestinal como barrera física protectora. Pasadas 48-72 horas los parásitos comienzan a disminuir su velocidad de división y desarrollan flagelos más largos y fuertes, diferenciándose en promastigotes nectomónados. Estas formas se acumulan en la matriz peritrófica provocando su ruptura por degradación enzimática, posteriormente se desplazan del lúmen del intestino medio al anterior y en esta zona se trasforman en promastigotes leptomónados, los cuales entran en otra fase de replicación. Estos se trasformarán finalmente en promastigotes metacíclicos infectivos que se situarán en la válvula del estomodeal del insecto. Existen también formas más pequeñas denominadas haptomónadas, que se fijan a las paredes del intestino por el flagelo (Figura 5) (Dostalova y Volf, 2012).



Figura 5.- Formas de *Leishmania* en el tubo digestivo de un flebótomo: (a) Amastigotes, (b) promastigotes prociclicos, (c) promastigotes nectomónadas, (d) promastigotes leptomónados, (e) promastigotes metaciclicos y (f) y haptomónadas (Dostalova y Volf, 2012) y los tiempos de cada forma (Kamhawi, 2006).

El proceso de transformación de los promastigotes en el tubo digestivo de los flebótomos recibe el nombre de metaciclogénesis (Figura 6). Durante este proceso el parásito adquiere resistencia a la lisis, ya que, junto a los cambios morfológicos, se dan cambios en la composición en LPG y GP63 de su membra plasmática. Las proteínas LPG aumentan su número y su glicosilación. Este aumento del número de azúcares en la membrana del parásito forma una barrera protectora contra las enzimas proteolíticas del intestino del flebótomo, facilitando también el anclaje de los promastigotes al epitelio del vector (Olivier y col., 2012).



Figura 6.- Proceso de metaciclogénesis (Roditi y Liniger, 2002).

Los promastigotes metacíclicos y haptomónados se acumulan en la parte anterior del tubo digestivo del insecto, recubriéndose de una capa de proteofosfoglicanos que generan un tapón que obstruye el intestino del insecto. Esta obstrucción impide el funcionamiento normal de la válvula estomodeal, de tal forma, que cuando la hembra de flebótomo se disponga a alimentarse, no podrá succionar la sangre y se producirá un reflujo que introducirá los parásitos en el torrente sanguíneo del hospedador definitivo. Junto con los parásitos, el insecto también introducirá parte de su saliva, que contiene numerosos compuestos inmunomoduladores y bioactivos, que van a facilitar el proceso de infección, como el maxadilano que favorecerá la dilatación arterial (Dostalova y Volf, 2012).

El proceso de la picadura va a originar una respuesta inmune por parte del hospedador, con la secreción de citoquinas antiinflamatorias IL-6, IL-1 β e IL-10 y la activación de la cascada del complemento, a través de la vía clásica o alternativa dependiendo de la especie. El promastigote metacíclico evitará la destrucción por la vía del complemento del hospedador mediante GP63, que será capaz de convertir la proteína C3b en su forma inactiva, C3bi, la cual se unirá a la superficie del parásito evitando así el ataque por la proteína del complemento C5 (Mosser y Edelson, 1987).

Hay dos teorías que tratan de explicar como el promastigote metacíclico se introduce en el interior del macrófago. En la primera -denominda del caballo de Troya- los neutrófilos fagocitan de forma masiva a los promastigotes infectantes en el lugar de la picadura. Los neutrófilos tienen una vida media de 6 a 10 horas, pasada la cual entrarán espontáneamente en apoptosis y los macrófagos fagocitarán los restos del neutrófilo que contienen en su interior los parásitos (Laskay y col., 2008; Peters y col., 2008). La segunda –denominada del conejo de Troya- postula que el parásito no entra en el interior del neutrófilo, si no que espera junto a un neutrófilo apoptótico y aprovecha el momento el que el macrófago va a fagocitar los restos del neutrófilo para ser fagocitado él mismo (Ritter y col., 2009).

La transformación de promastigotes a amastigotes supone una reorganización estructural completa del parásito. Durante este proceso el patogeno pierde el flagelo y cambia la composición de la membrana (Turco y Sacks, 1991). Los amastigotes resistirán el pH ácido del interior del lisosoma y comenzarán a dividirse por fisión binaria.

Dependiendo de la especie de *Leishmania* y del tipo de patología causada por dicha especie, los amastigotes se dispersarán por el organismo hacia los órganos diana, hígado, bazo y medula ósea, en la leishmaniosis visceral; o proliferarán en el lugar de la picadura, leishmaniosis cutánea y mucocutánea (Forestier, 2013).

1.1.2.1.1 Biología del vector

Los flebótomos, subfamilia Phlemotominae, trasmiten aparte de la leishmaniosis otras enfermedades, como la enfermedad de Carrion causada por *Bartonella bacilliformis* y algunas producidas por arbovirus. Pertenecen a la familia Psychodidae una de las más antiguas familias de dípteros. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener una densa cobertura de escamas angostas en cabeza, tórax, patas y venas de las alas. La subfamilia Phlemotominae es la única que ha desarrollado un aparato bucal apto para tomar sangre. Son moscas pequeñas (1,5 a 2 mm de longitud de cuerpo) y su color varía del blanco al negro. A diferencia del resto de miembros de la familia, cuando están en reposo mantienen las alas en ángulo recto por encima del abdomen, son peludas y al posarse o abandonar en el hospedador dan una serie de saltos (Figura 7) (Alkan y col., 2013).



Figura 7.- Hembra de flebótomo, esquema (Young, 1984) y foto (Killick-Kendrick, 1999)

De las 500 especies conocidas de flebótomos, sólo 98 especies han sido descritas como vectores de la enfermedad, 42 del genero *Phemotomus* en el Viejo Mundo y 56 del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Alkan y col., 2013; Maroli y col., 2013).

Los flebótomos se desarrollan en ambientes húmedos pero no acuáticos, ricos en materia orgánica y tienen un ciclo biológico que comprende las fases de huevo, larva y pupa (Figura 8). El huevo tarda en desarrollarse de 7 a 10 días, pero este periodo de tiempo puede variar en función de las condiciones ambientales, generalmente el calor lo acorta y el frío lo alarga. La larva se desarrolla en un periodo de 3 semanas, pasando por cuatro estadios larvales antes de convertirse en pupa. El estadio de pupa suele durar 10 días y el insecto adulto unos 29 días (Ready, 2013). Durante las épocas frías del año, el huevo y la larva de las especies paleárticas entran en diapausa (Alkan y col., 2013).



Figura 8.- ciclo de vida de un flebótomo: (A) adulto, (B) huevo, (C) fases larvales y (D) pupa (OMS, 2010).

Su comportamiento es nocturno, suelen picar al anochecer, durante el día permanecen en lugares húmedos y frescos, son predominantemente exofágicas (pican al aire libre) y exofílicas (descanso al aire libre durante la maduración de los huevos), aunque se han descrito algunas especies endofílicas (descansando en el interior durante la maduración de los óvulos) (Killick-Kendrick, 1999).

1.1.3 Formas clínicas

En el ser humano la leishmaniosis puede cursar como cinco variantes dependiendo de los diferentes cuadros clínicos: leishmaniosis visceral o Kala-azar, leishmaniosis cutánea, leishmaniosis cutánea difusa, leishmaniosis mucocutánea y leishmaniosis dérmica post Kala-azar (Ashford, 2000), sin embargo habitualmente se clasifica en tres grandes grupos, donde la leishmaniosis cutánea difusa se incluye dentro de la leishmaniosis cutánea y la leishmaniosis dérmica post Kala-azar dentro de la leishmaniosis visceral (Tabla 2).

Leishmaniosis visceral	Común	L. donovani
		L. infantum
		L. chagasi (= L.infantum)
	Rara	L. tropica
		L. amazonensis
Leishmaniosis cutánea	Común	L. major
		L. amazonensis
		L. mexicana
		L. braziliensis
	Rara	L. infantum
		L. donovani
Leishmaniosis mucocutánea	Común	L. braziliensis
	Rara	L. panamensis
		L. guyanensis
		L. amazonensis

Tabla 2.- Especies de Leishmania y variante clínica causada (McCall y col., 2013).

1.1.3.1 Leishmaniosis visceral o Kala-azar

Esta enfermedad es consecuencia de la multiplicación del parásito en órganos internos del hospedador como consecuencia de un fallo en la respuesta inmune de tipo celular. La interiorización del parásito origina hiperplasia e hipertrofia de los órganos afectados, congestión de los vasos sanguíneos y necrosis de los tejidos (Figura 9). Los lugares en los que se encuentra una mayor carga parasitaria suelen ser bazo, hígado, médula ósea y tejido linfático, aunque también pueden aparecer parásitos en áreas como pulmones o epitelio intestinal.

El periodo de incubación varía de diez días a un año, la progresión es gradual y aunque se han documentado casos de progresión en las dos primeras semanas no suelen detectarse los síntomas hasta 3 u 8 meses después de la picadura. Habitualmente se observa fiebre alta, anemia, esplenomegalia, pérdida de peso y hemorragias debidas a la pérdida de plaquetas. Estas manifestaciones clínicas se dan fundamentalmente en niños y personas con el sistema inmunitario debilitado por malnutrición o inmunosupresión (Cruz y col., 2006; Carrillo y col., 2014). En los análisis se pueden detectar una gran cantidad de anticuerpos específicos IgM e IgG por la activación de los linfocitos B. Su mortalidad es del 75-90% si no se trata adecuadamente (Carter y col., 2005; Ready, 2014).

Las especies responsables de la leishmaniosis visceral en el Viejo Mundo son *L. donovani* y *L. infantum,* aunque otras especies cutáneas pueden visceralizar como *L. tropica.* Por su parte *L. chagasi* produce cuadros visceralizantes en los países del Nuevo Mundo. Los vectores implicados en transmitir la enfermedad son *P. perniciosus y P. ariasi* (Ashford, 2000).



Figura 9.- Esplenomegalia causada por leishmaniosis visceral en un paciente de Nepal (C. Bern, CDC)

La enfermedad dérmica post Kala-azar se desarrolla generalmente tras el tratamiento exitoso de una leishmaniosis visceral causada por *L. donovani*. Puede manifestarse tras meses o años de haber padecido la enfermedad visceral con la aparición de pápulas, máculas y lesiones nodulares en la piel (Figura 10) (Mukhopadhyay y col., 2014). Se da en las zonas donde *L. donavani* es endémica, como el Sur de Asia (India, Nepal y Bangladesh) y en África, principalmente Sudán.



Figura 10.- Hombre con pápulas características de post Kala-azar (OMS)

1.1.3.2 Leishmaniosis cutánea

Es el resultado de la acumulación de macrófagos infectados alrededor de la picadura y como consecuencia de una respuesta inmunitaria de tipo celular. Las células infectadas permanecen en la piel y pueden ser aisladas por linfocitos o células plasmáticas causando cambios estructurales, como ulceraciones y granulomas. El periodo de incubación va de dos semanas a dos meses, con la evolución primero a una lesión enrojecida y pruriginosa que aumenta en tamaño y da lugar a una úlcera, cuyas dimensiones dependen de la especie infectiva y de la respuesta inmune del hospedador (Figura 11). En muchos casos se cura de forma espontánea dejando cicatrices o persiste

de 1 a 3 años como una forma no ulcerosa. Una de las complicaciones es la infección por bacterias patógenas, lo que da lugar a la formación de costras y cuerpos necróticos, que producen grandes dolores.

Las especies responsables de esta enfermedad son: *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. braziliensis* (Ashford, 2000).



Figura 11.- Paciente con leishmaniosis cutánea en una clínica de Kabul (Ahmad Masood, REUTERS)

La leishmaniosis cutánea difusa se puede considerar una forma rara de leishmaniosis cutánea que se produce cuando los linfocitos no aíslan la lesión primaria. El parásito se extiende por los tejidos adyacentes dando lugar a múltiples nodos o placas no ulcerosas que involucran grandes zonas de la piel. En esta variante las lesiones abarcan grandes extensiones del cuerpo, dándose sobre todo en las extremidades y la cara. En muchos casos ha sido confundida con *lepra lepromatosa,* ya que los síntomas clínicos son muy parecidos. Debido a la deficiencia inmune la enfermedad no tiene curación espontánea y la recaída tras el tratamiento suele ser común (Akuffo y col., 1988; Paniz Mondolfi y col., 2013).

Es producida por *L. aethiopica* y *L. amazonensis* y está restringida a Venezuela y República Dominicana en el Nuevo Mundo y a Etiopía, India y Kenia en el Viejo Mundo (Ashford, 2000).

1.1.3.3 Leishmaniosis mucocutánea

Se origina por una metástasis de los parásitos hacia las mucosas, por vía hematógena, cutánea o linfática. Las manifestaciones clínicas pueden aparecer años después de haber cicatrizado la forma cutánea, pero también puede presentarse cuando todavía existen manifestaciones en la piel. Es altamente deformante ya que puede causar la erosión del tejido blando y el cartílago de las zonas afectadas, particularmente de la nariz originando la llamada "nariz de tapir". También afecta a la faringe, facilitando infecciones secundarias que pueden conducir a la muerte. Casi nunca se cura espontáneamente. En el Nuevo Mundo las especies responsables son *L. braziliensis* y *L. panamensis*, dándose principalmente en Bolivia, Brasil y Perú. En el Viejo Mundo se denomina leishmaniosis

mucosa, es rara y se da únicamente en coinfecciones con VIH, afectando a mucosas de la boca, nariz y genitales.

1.1.4 Epidemiología

La leishmaniosis se considera endémica en más de 98 países, dentro de los cuales se encuentra España y otros países de la Unión Europea como Francia, Italia y Grecia (Figura 12). Se calcula que la incidencia anual es de 0,2-0,4 millones de casos de leishmaniosis visceral y de 0,7-1,2 millones de leishmaniosis cutánea. Se cree que estos datos están subestimados y que hay una mayor incidencia de la enfermedad, debido a que muchos casos no se notifican a los centros de salud (Alvar y col., 2012).

Como ya se ha mencionado la leishmaniosis se transmite por la picadura de los dípteros, aunque hay excepciones como son: transmisión venérea (Symmers, 1960); transmisión congénita (Eltoum y col., 1992); transfusión de sangre infectada (Bruce-Chwatt, 1972; Riera y col., 2008), y uso de jeringuillas infectadas en el consumo de drogas (Alvar y col., 2012; Maroli y col., 2013).

La leishmaniosis visceral se considera la segunda EDT con mayor mortalidad con cerca de 40.000 muertes al año y la cuarta en morbilidad. El 90 % de los casos de leishmaniosis visceral se dan en seis países: India, Bangladesh, Sudán, República del Sur de Sudán, Brasil y Etiopía (Alvar y col., 2012). Estos países también son los que presentan mayor número de casos de leishmaniosis dérmica post Kala-azar (Figura 13).

Las mayores epidemias de leishmaniosis visceral se han dado en: Etiopía (2005-2006), Kenia (2008), Sudán del Sur (2009-2012) con 28.300 casos y 900 muertos, y la mayor de todas en Sudán (1984-1994) con 100.000 muertos de una población estimada de 300.000.



Figura 12.- En rojo los 98 países donde la leishmaniosis es considerada enfermedad endémica por la OMS (OMS).



Figura 13.- Número de nuevos casos de leishmaniosis cutánea (A) y leishmaniosis visceral registrados durante el año 2012 (B) (OMS).

La leishmaniosis cutánea muestra una distribución geográfica mucho más amplia, aunque el 75% de los casos se concentran en 10 países (Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Sudán y Siria). Por otra parte, la leishmaniosis mucocutánea se restringe prácticamente a Sudamérica, con el 90% de los casos en solo 3 países, Bolivia, Brasil y Perú (Figura 13).

En los últimos años se ha producido un estancamiento de la enfermedad en algunos países y el repunte de la misma en otros, pero no se ven signos de recesión de la misma. Esto puede deberse a que muchos de los factores de riesgo asociados a la enfermedad están en aumento. Los factores más destacados son:

- Factores socioeconómicos. Las distintas leishmaniosis como el resto de ETD están asociadas a la pobreza. Las comunidades más pobres de los paises subdesarrollados tienen malas infraestructuras, que favorecen en algunos casos el desarrollo del vector, como es la ausencia de alcantarillado y de recogida de basuras.
- La **malnutrición** va a afectar al sistema inmune y por tanto al factor de riesgo de contraer la enfermedad. Dietas pobres en proteínas, hierro, vitamina A y zinc aumentan el riesgo (Carrillo y col., 2014).
- Los flujos migratorios de nativos de zonas endémicas favorecen el movimiento de las cepas, originando nuevos focos de enfermedad en países donde nunca se había descrito. Por ejemplo: el desplazamiento de tropas a zonas donde la leishmaniosis es una enfermedad endémica. El caso más reciente son las tropas enviadas a Afganistán y el aumento de casos relacionado con el regreso de los veteranos de la guerra del Golfo (Herwaldt, 1999). Sólo durante el periodo 2003-2004 un 2,1% (más de 300 soldados) de las tropas Estadounidenses fueron tratadas por leishmaniosis (Sanders y col., 2005).
- Los cambios ambientales afectan a la incidencia de la enfermedad, la desforestación y la urbanización de zonas rurales, puede dar lugar al desplazamiento de las poblaciones de flebótomos o el acercamiento de las personas a ellas. Uno de los casos más recientes fue el brote sufrido en Fuenlabrada (Madrid, España) debido a la recalificación de un terreno rural a urbanizable (Molina y col., 2012).
- El **cambio climático** afecta de una manera muy importante al aumento de las temperaturas medias contribuyendo a una mayor actividad del flebótomo y por tanto una mayor incidencia de la enfermedad.

1.1.4.1 Coinfeción con VIH

La leishmaniosis es una de las enfermedades oportunistas asociadas al virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La coinfección por ambos patógenos está asociada a la superposición de sus zonas geográficas de influencia. Existen numerosos casos de coinfección en zonas, como India y África, donde ambas enfermedades tienen una gran

prevalencia. La prevalencia de la coinfección se estima en torno al 1,5-9% de los casos de SIDA. La mayoría de estos casos fueron declarados en España, Francia, Italia y Portugal, correspondiendo a España el mayor número de casos (58%) (Figura 14) (Desjeux y Alvar, 2003).



Figura 14.- Mapa de la distribución geográfica de infección por leishmaniosis (azul claro); y de coinfeción SIDAleishmaniosis (azul oscuro) (Cruz y col., 2006).

1.1.4.2 La leishmaniosis en España

En España la leishmaniosis es una enfermedad endémica que se da tanto en su forma visceral como cutánea. Los vectores descritos encargados de su transmisión son *P. perniciosus, P. ariasi* y *P. langeroni* cuya distribución abarca todo el territorio peninsular y las islas Canarias y Baleares. El reservorio principal es el perro aunque se han observado reservorios secundarios como la liebre (*Lepus granatensis*) (Maroli y col., 2013).



Figura 15.- Representación geográfica del número de casos de leishmaniosis registrados en el CMBD (Conjunto Mínimo Básico de Datos) entre 2000- 2010 en España por Comunidades autónomas. En las Comunidades autónomas sombreadas, la leishmaniosis no es una enfermedad de Declaración Obligatoria a la RENAVE (Amela y col., 2012).

Desde febrero de 1982 hasta diciembre de 1995 la leishmaniosis fue una enfermedad de declaración obligatoria en España, durante estos trece años el número de casos declarados fue de 1.574. A partir de 1996 la enfermedad dejó de ser de declaración obligatoria, para sólo serlo en determinadas comunidades autónomas.

La prevalencia de la enfermedad en nuestro país es de 0,41 casos por cada 100.000 habitantes, siendo mayor en comunidades como Baleares, llegando al 4,72/100.000 habitantes. Pero al no ser una enfermedad de declaración obligatoria, muchos de los casos no se notifican a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Según el registro de altas hospitalarias del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD), que recoge todos los casos de leishmaniosis sin necesidad de ser declarados, la incidencia asciende a 2,8/100.000 habitantes (Figura 15 y 16) (Suarez Rodriguez y col., 2012). También hay que tener en cuenta que todos estos datos se encuentran subestimados, ya que se cree que el 25-40% de los casos de leishmaniosis visceral no se declaran, y casi el 100% de los de leishmaniosis cutánea, por lo que la incidencia real podría ser mucho mayor (Schönian y col., 2008).



Figura 16.- Número de casos registrados en España de leishmaniosis visceral (triángulos azules) y leishmaniosis cutánea (círculos negros), según los datos de la OMS y Alvar y col. 2012 (Alvar y col., 2012).

El último brote de leishmaniosis se dio en Madrid a mediados del año 2009. Durante este periodo la tasa de incidencia aumentó de 3 casos por cada 100.000 habitantes a 30,64 casos en 2012. El 35,9% de los casos asociados al brote presentaban leishmaniosis visceral, mientras que el 64,1% restante presentaban leishmaniosis cutánea (Arce y col., 2013). Una de las particularidades de este brote fue el papel jugado por la liebre como reservorio (Molina y col., 2012).

1.1.4.3 Leishmaniosis canina

La leishmaniosis canina, no es solo importante como enfermedad clínica veterinaria, sino también por la importancia del perro como depósito del parásito. Se calcula que en algunas zonas endémicas el 80% de los perros infectados son asintomáticos (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

Jose Miguel Escudero Martínez

En Europa se estima que el 16,7% de los perros están infectados, aunque la prevalencia es mayor en Sudamérica llegando hasta el 33% (Moreno y Alvar, 2002). En España la seroprevalencia varía del 3,7% en Orense al 34,6% en Málaga (Miro y col., 2012); además en la zona de las Alpujarras se ha detectado un aumento en el número de casos, del 9,2% en 1984 hasta el 20,1% en 2006 (Antoniou y col., 2013).

La frecuencia y densidad de la enfermedad, depende de varios factores como el periodo de transmisión de la enfermedad, ligado a la actividad de los vectores que en Europa se extiende desde principios de primavera a finales de Otoño, mientras que en América del Sur dura todo el año; los hábitos alimenticios de los vectores de la zona; la densidad de los vectores; la densidad y susceptibilidad de los perros de la zona y el estilo de vida de los perros (Dantas-Torres y col., 2012).

El tratamiento de los perros infectados con los fármacos de primera elección no es siempre eficaz y se ha demostrado que un 80% de los perros tratados vuelve a recaer un año después. En ocasiones se postula el sacrificio de los animales para evitar la propagación de la enfermedad; sin embargo, esta práctica no ha demostrado ser efectiva para evitar la propagación de la enfermedad entre animales sanos, aparte de ser inaceptable desde un punto de vista ético y social. En un estudio realizado en Brasil, donde se sacrificaron perros seropositivos durante un periodo de 5 años, se consiguió disminuir la prevalencia de la enfermedad, aunque ésta volvió a incrementarse dos años después. Por otro lado, en un estudio en China, donde se sacrificaron los perros infectados y se trató con insecticida para eliminar los vectores, se consiguió controlar la enfermedad (Moreno y Alvar, 2002).

1.1.5 Diagnóstico y prevención

El diagnóstico de la leishmaniosis visceral se realiza mediante la combinación de la observación de signos clínicos y los análisis serológicos y parasitológicos. En el caso de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea se usan sobre todo análisis parasitológicos, pues los análisis serológicos tienen una validez muy limitada.

La técnica parasitológica más usada es la visualización del parásito en muestras obtenidas de las lesiones mediante tinción con giemsa. La preparación se debe observar al microscopio con aceite de inmersión, para identificar correctamente al parásito y no confundirlo con otro tipo de parásito intracelular, como *Histoplasma spp*. Esta técnica depende mucho del factor humano y la habilidad del técnico (Herwaldt, 1999). Otra técnica parasitológica es la amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que ha demostrado ser mucho más sensible que la microscopia y que no depende tanto del factor humano.

Las pruebas serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunoelectrotransferencia, han mostrado

una buena exactitud diagnóstica en la mayoría de los estudios, pero requieren equipos que no están bien adaptados al trabajo de campo. La OMS aconseja como prueba serológica de primera línea los kits comerciales basados en la detección del antígeno rK39, mediante aglutinación o inmunocromatografía. Las pruebas basadas en el antígeno rK39, son fáciles de realizar, rápidas y baratas (OMS, 2010).

Para el control de la leishmaniosis se utiliza un conjunto de medidas, algunas de las más importantes son:

- Diagnóstico temprano y efectivo de la enfermedad. El diagnóstico temprano de los casos de leishmaniosis y su rápido tratamiento, impiden que la persona afectada servir como reservorio de la enfermedad.
- Control del vector. La reducción del número de vectores impide que la enfermedad se transmita. Algunos de los métodos de control incluyen el empleo de insecticidas, mosquiteros rociados con insecticidas, la gestión ambiental y la propia protección personal. No sólo son necesarias las fumigaciones periódicas de las áreas endémicas, sino también el conocimiento de la biología y naturaleza de los flebótomos. Estos insectos adquieren resistencias que perjudican el control de la enfermedad e indirectamente afectan a la sostenibilidad medioambiental (OMS, 2010).
- Control de los reservorios. En las formas zoonósicas americanas la posibilidad de actuar contra los reservorios es prácticamente nula dado su carácter selvático (roedores, monos, perezosos...). En Europa, el más reservorio importante es el perro doméstico. Se calcula que el 50% de los perros son portadores asintomáticos de la enfermedad (Ready, 2010). El control de un reservorio de este tamaño es casi imposible, ya que además de los perros domésticos, los perros callejos, que representan el 22% del total de la población canina de España, también pueden estar infectados (Moreno y Alvar, 2002). Un método eficaz de prevenir la transmisión de la enfermedad es evitar la picadura del mosquito. Se ha demostrado que el uso de collares impregnados con insecticidas piretroides disminuye el riesgo de picadura y por tanto de propagar la enfermedad (Killick-Kendrick y col., 1997).
- Movilización social y educación de la comunidad. La información sobre la enfermedad, su tratamiento y profilaxis en las zonas endémicas facilita el trabajo del personal sanitario y evita nuevos casos. También el fomento de la investigación ayuda a poner fin a esta enfermedad.

1.1.6 Tratamiento de la leishmaniosis

1.1.6.1 Quimioterapia

Los tratamientos actuales que se utilizan frente a la leishmaniosis son muy limitados, caros y tóxicos, y en muchos casos requieren hospitalización. Además, en los últimos años se ha observado un aumento de la resistencia a los mismos.

1.1.6.1.1 Antimoniales pentavalentes (Sb^v)

A este grupo pertenecen el estibogluconato sódico (Pentostam[®]) y el antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (Figura 17), que constituyen el tratamiento clásico de primera línea contra la leishmaniosis, usándose en Europa y en el Nuevo Mundo desde hace más de 70 años. Para que el fármaco sea activo se requiere la reducción del estado de oxidación de Sb^V a Sb^{III}, siendo esta última forma la responsable de la toxicidad del fármaco y de sus efectos secundarios. La reducción tiene lugar tanto en el macrófago (Carter y col., 2005) como en el amastigote (Zhou y col., 2004), pero no en el promastigote, para el cual es inocuo. El principal efecto del fármaco es un descenso en los niveles de ATP del parásito, debido a la alteración de la glucolisis y de la oxidación de ácidos grasos (Balaña-Fouce y col., 1998).



Figura 17.- Estructuras químicas del Pentostan® (izquierda) y del Glucantime® (derecha).

La administración de Sb^v es por vía intramuscular durante 28 dias y en el caso de leishmaniosis cutánea por vía intralesional. Los inconvenientes de este tratamiento son sus efectos secundarios, dolor en la zona de inyección, mialgias, anorexia, nauseas, vómitos, malestar general, temblores, diarrea y fiebre entre otros (Navin y col., 1992). En perros los Sb^V son nefrotoxicos de manera que la función renal debe ser monitorizada para evitar daños iatrogénicos graves.

1.1.6.1.2 Anfotericina B (Fungizone®)

Es un antibiótico poliénico macrocíclico producido por *Streptomyces nodosus* que empezó a utilizarse como medicamento de segunda línea en 1996 (Figura 18). Su mecanismo de acción está basado en la unión al ergosterol, el esterol mayoritario en la membrana del parásito, produciendo una alteración del potencial de membrana que

conduce a un desequilibrio osmótico. También participa en el generación de especies reactivas de oxígeno (ROs), las cuales dañan la célula hasta su completa destrucción. La eficacia del compuesto aumenta con la administración en microcápsulas lipídicas (Ambisome®) que facilitan su acción y disminuye su citotoxicidad.

Las dos formas farmacéuticas se administran por perfusión intravenosa lenta en días alternos hasta 12 semanas y se usa en casos de leishmaniosis visceral refractaria. No es útil en otras formas como la leishmaniosis cutánea o mucocutánea. Posee una eficacia cercana al 100% en estos casos (van Griensven y Boelaert, 2011). Como efectos secundarios destacados están tromboflebitis, miocarditis, hipocalcemia y afecciones renales; además de fiebre, nauseas, etc.



Anfotericina B

Figura 18.- Estructura química de la Anfotericina B.

1.1.6.1.3 Miltefosina

La miltefosina es un derivado de la fosfocolina, de administración oral frente a la leishmaniosis visceral (Figura 19). Aunque fue diseñado como antitumoral, su eficacia como leishmanicida se comprobó en 1987 (Achterberg y Gercken, 1987; Croft y col., 1987). En India fue aprobado como fármaco frente a la leishmaniosis visceral en 2002, bajo el nombre de Impávido[®] (Zentaris, Alemania) (Sindermann y col., 2004) y en España se utiliza frente a la leishmaniosis canina desde 2007. Su mecanismo de acción no está definido, sus dianas parecen ser muy diversas. La miltefosina tiene un reconocido efecto inmuno estimulante produciendo la activación de los linfocitos T de la acción microbicida de los macrófagos. Este compuesto induce apoptosis en los parásitos (Verma y col., 2007). Origina disfunción mitocondrial en Leishmania con reducción del potencial electroquímico mitocondrial (Luque-Ortega y Rivas, 2007), así como la éter-lípidos inhibición de la síntesis de е inversión en la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina de la membrana plasmática (Rakotomanga y col., 2007).



Figura 19.- Estructura química de la hexadecilfosfocolina (miltefosina)

Se administra por vía oral en dosis repetidas durante 28 días. Dada su mayor adherencia al tratamiento, su eficacia es mayor que la de los Sb^v (Griewank y col., 2010), aunque varía dependiendo de la zona geográfica (Soto y col., 2004). Presenta varios efectos secundarios como anorexia, nauseas, vómitos, dolor de cabeza y diarrea que pueden obligar a interrumpir el tratamiento (Oliveira y col., 2011). Tiene además efectos teratogénicos que impiden la administración a mujeres gestantes infectadas.

1.1.6.1.4 Paromomicina

Es un antibiótico aminoglicósido, producido por *Streptomyces krestomuctitus*, que actúa impidiendo la síntesis de proteínas al inhibir diferente proteínas ribosomales del parasito (Figura 20).

Es un fármaco de autorización relativamente reciente, pues fue aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en 2008 para el tratamiento de la leishmaniosis visceral, bajo el nombre de Humatin[®]. En ensayos clínicos de leishmaniosis visceral en India el porcentaje de curación de la paromomicina es similar al obtenido con anfotericina B (Sundar y col., 2007) y se ha sugerido que podría ser aún mayor en combinación con ésta (van Griensven y Boelaert, 2011). Se administra por vía intramuscular y se han descrito diversas reacciones adversas como náuseas, vómitos y calambres abdominales. Actualmente, nuevas formulaciones como el sulfato paromomicina encapsulada en microesferas de albúmina o el sulfato de paromomicina liposomal, están exhibiendo mejores resultados que la molécula original (Khan y col., 2013).



Figura 20.- Estructura química de la paromomicina.
1.1.6.1.5 Alopurinol

El alopurinol (Zyloric[®]) (Figura 21) es un fármaco usado contra la gota que tienen efectos leishmanistaticos. Su mecanismo de acción se basa en la incapacidad de *Leishmania* para la síntesis *de novo* de las bases púricas. Este compuesto interfiere en la ruta de recuperación de las purinas, siendo un sustrato más específico de las enzimas del parasito que de las enzimas del hospedador, entre las que se encuentran, la foforibosil transferasa y la GMP reductasa (Krenitsky y col., 1969; Hitchings, 1975; Marr y col., 1978; Spector y col., 1984).



Figura 21.- Estructura química del alopurinol.

Se usa en casos raros de leishmaniosis cutánea recurrente y difusa, así como en la leishmaniosis canina, coadministrado con miltefosina y Sb^v.

1.1.6.1.6 Pentamidina

Es una diamidina aromática de efecto pleiotrópico (Figura 22). Actúa a distintos niveles, inhibe la síntesis y el transporte de poliaminas del parásito (Balaña-Fouce y col., 1989); se une de manera reversible al surco del ADNk previniendo su replicación; inhibe la ADN-topoisomerasa II del parásito y produce el colapso del potencial de membrana mitocondrial (Nguewa y col., 2005).





Su administración es intramuscular o intravenosa a dosis repetidas. Su uso es limitado debido a su elevada toxicidad, produciendo efectos secundarios como diabetes mellitus, hipoglucemia, isquemia cardiovascular y toxicidad renal. Se usa en casos de resistencia a antimoniales, en terapias de mantenimiento y en forma aerosolizada en pacientes con neumonía ligada a SIDA.

1.1.6.1.7 Azoles

Los fungicidas derivados del conazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol y miconazole son farmacos orales con estructura de imidazol, que se utilizaron por primera vez como tratamiento contra la leishmaniosis cutánea en 1988 (Figura 23). Inhiben la síntesis del lanosterol, intermediario en la síntesis del ergosterol de la membrana del parásito, dando lugar a la alteración de las membranas subcelulares que llevan a procesos autofágicos y a la muerte de la célula (Balaña-Fouce y col., 1998).



Figura 23.- Estructuras químicas del ketoconazol, miconazol, itraconazol y flucinazol.

La eficacia del ketoconazol en casos de leishmaniosis cutánea es del 76-90 %. Sus efectos secundarios son trastornos gastrointestinales y de los tejidos epidérmicos (prurito).

1.1.6.1.8 Combinaciones de fármacos

Dado que los monoterapias tienen efectos curativos limitados que pueden originar recaídas y resistencias, la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNSI) ha propuesto terapias combinas entre fármacos registrados con resultados prometedores. En un ensayo clínico en fase III en India, se han confirmado la eficacia casi completa (84-100%) de la combinación de anfotericina B con miltefosina en dosis repetidas durante 14 días (van Griensven y col., 2010).

1.1.6.2 Inmunoterapia

Una posibilidad para combatir las distintas formas de leishmaniosis es el desarrollo de vacunas que actúen tanto de forma terapéutica como profiláctica. Hasta la fecha, se han utilizado diferentes estrategias de vacunación contra *Leishmania* en ratones, perros y

humanos (Coler y Reed, 2005), sin embargo, la única estrategia de inmunización utilizada con cierto éxito en la protección contra estas enfermedades se ha restringido a la leishmaniosis cutánea zoonótica, ya que la exposición natural a muchas de estas cepas, provoca un alto nivel de inmunidad adquirida naturalmente y además, en muchas ocasiones, es una enfermedad "autocurable". La dificultad para generar una vacuna frente a la leishmaniosis radica, entre otras cosas, en la complejidad del ciclo biológico de su agente causal y de su capacidad para evadir la respuesta inmune.

1.1.6.2.1 Vacunas de Primera generación

Consiste en la inoculación del parásito vivo o muerto. La inoculación de parásitos vivos ha sido una práctica común en oriente próximo durante cientos de años, y fue utilizada por los servicios médicos de la ex Unión Soviética en los años 70 y 80 durante la ocupación militar de Afganistán. La vacunación se realizaba con una cepa cutánea (Nadim y col., 1983; Khamesipour y col., 2006), con el fin de adquirir inmunidad clínica, a cambio de sufrir una lesión controlada en una zona anatómica seleccionada. Desafortunadamente, esta práctica se ha asociado a muchos problemas, incluyendo el desarrollo de grandes lesiones de lenta curación e incluso, en ciertos casos, se producía la reactivación de la enfermedad, por lo que la OMS aconsejó el abandono de esta práctica. Las vacunas con parásitos muertos se han mostrado más seguras pero con resultados variables (Khamesipour y col., 2006).

1.1.6.2.2 Segunda generación

Se consideran vacunas de segunda generación, aquellas que utilizan parásitos atenuados, modificados genéticamente o antígenos purificados. También incluyen la inoculación de bacterias o virus que expresen un antígeno de Leishmania (Palatnik-de-Sousa, 2008). Existen estudios basados en este tipo de vacunas y algunas ofrecen cierto grado de protección frente a la enfermedad (Titus y col., 1995; Alexander y col., 1998). Uno de los últimos intentos es el uso de una cepa atenuada de *L. infantum*, deficiente en la proteína de choque térmico 70-II, como vacuna segura frente a la leishmaniosis visceral (Calvo-Álvarez y col., 2012).

1.1.6.2.3 Tercera generación

Las vacunas de tercera generación consisten en la inoculación de un plásmido de expresión eucariota con el gen clonado de un determinado antígeno. Hasta la fecha, al menos diez antígenos diferentes de *Leishmania* se han utilizado para vacunar ratones contra la leishmaniosis cutánea, incluyendo gp63, gp46, gp42, LACK (*Leishmania homologue of receptors for Activated C Kinase*) y hsp70 (Handman, 2001).

La vacuna recombinante Leish-111f es la primera vacuna que ha progresado a estudios clínicos en fase I y II. La Leish-111f se compone de tres proteínas del parásito, un antioxidante específico de tiol (TSA), la proteína inducible por estrés de *L. major*

(LmSTI1) y el factor de iniciación de la elongación de *L. braziliensis* (LeIF) (Chakravarty y col., 2011).

1.1.6.3 Resistencias

En la década de los 90 se notificaron en Bihar, la India, los primeros casos de resistencia de *Leishmania* a los antimoniales pentavalentes. En la actualidad, hay zonas donde este medicamento de primera línea ha dejado de ser eficaz, curando sólo a un tercio de los enfermos. Uno de los factores que explican esta resistencia es el mal uso, pues en muchos casos no se siguen las directrices marcadas para la administración del fármaco (Sundar y col., 2003).

El desarrollo de resistencias a fármacos puede ser multifactorial, pudiéndose alterar los mecanismos de transporte de fármacos, su metabolismo, las interacciones del fármaco con su diana o la expresión de las enzimas involucradas en el mecanismo de acción (Leprohon y col., 2015).

Recientemente también se han notificado casos de resistencia a anfotericina B en Sudán, donde muchos pacientes sólo responden a terapias combinadas (Mohapatra, 2014).

Con el fin de combatir la aparición de resistencias se utilizan asociaciones de fármacos. De este modo, se consigue aumentar la actividad de las mismos mediante un efecto sinérgico, que se traduce en una disminución de la dosis, la duración, los efectos secundarios y el coste del tratamiento (Mohapatra, 2014).

1.2 Microtúbulos y tubulina

En el citoplasma celular existe una red de filamentos proteicos que confiere a la célula importantes propiedades tales como su arquitectura y dinamismo. Esta red de filamentos se denomina citoesqueleto y está compuesta por tres tipos de filamentos: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. Los microtúbulos son polímeros cilíndricos huecos de 24-25 nm de diámetro formados por subunidades de la proteína globular tubulina (Hawkins y col., 2010). Los microtúbulos y la tubulina están presentes en todos los organismos eucariotas, mientras que en los organismos procariotas se encuentra una proteína homóloga a la tubulina que se denomina FtsZ (*filamenting temperature-sensitive mutant Z*) (Nogales y col., 1998a; Haeusser y Margolin, 2011).

Existen cinco familias de tubulinas: alfa(α), beta(β), gama(γ), delta (δ), épsilon (ϵ) y zeta (ζ) (Kaur y col., 2014). Dentro de cada familia hay diferentes subtipos por ejemplo, en el hombre se han descrito cinco subtipos de tubulina α y seis de tubulina β (Jayanarayan y Dey, 2002). Las subunidades α y β se asocian formando dímeros, que se ensamblan para dar lugar a los microtúbulos. Los dímeros α - β no suelen disociarse debido a la gran interacción existente entre ambas subunidades (Kaur y col., 2014), usándose generalmente el término tubulina para referirse a dichos dímeros. Las tubulinas γ , δ y ζ se asocian a los centriolos durante la formación del huso mitótico (McKean y col., 2001; Draber y Draberova, 2003). La tubulina ζ se ha descrito únicamente en tripanosomátidos (Vaughan y col., 2000).



Figura 24.- Disposición de los monómeros de α y β tubulina y ensamblado del microtúbulo (Hawkins y col., 2010).

La tubulina interviene en funciones fundamentales para la célula como, el movimiento celular formando parte de cilios y flagelos, el transporte de vesículas, el mantenimiento de la forma celular, la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la formación del huso mitótico (Hawkins y col., 2010). De este modo, si se inactiva la formación de microtúbulos y del huso mitótico, la división celular no se producirá. Por

ello la inhibición de la formación de microtúbulos se considera como una excelente diana contra cualquier tipo de proceso proliferativo (Werbovetz, 2002).

1.2.1 Dinámica de ensamblado de los microtúbulos

Durante la formación de los microtúbulos la tubulina se asocia formando protofilamentos lineales, constituidos por la unión de la subunidad β del dímero a la subunidad α del siguiente (Figura 24). El número de protofilamentos que forman un microtúbulo varia de 8 a 20, siendo lo normal 13 (Chretien y Wade, 1991). El dímero α - β de tubulina posee dos lugares de unión al GTP, uno en la subunidad α y otro en la β . Poco después de la unión a otro dímero el GTP de la subunidad β se hidrolizará a GDP y fosfato inorgánico (Pi) (Nawrotek y col., 2011). Esto introduce cambios estructurales en el dímero de tubulina, que pasa de una conformación tensa (unido a GTP) a una conformación relajada (unido a GDP). La conformación tensa facilita las interacciones laterales con otros protofilamentos y dímeros al ser una conformación recta, mientras que la forma relajada produce un desplazamiento de 12° entre las dos subunidades, dificultando las interacciones laterales y dando lugar a una conformación curva (Figura 25) (Ravelli y col., 2004; Wang y Nogales, 2005).



Figura 25.- Dímero de tubulina en conformación tensa (T) y en conformación curva (D) (Krebs y col., 2005).

Los microtúbulos están polarizados, con un extremo positivo formado por subunidades β y otro negativo formado por subunidades α (Figura 24). La adición de nuevos dímeros se produce por el extremo positivo (Horio y Murata, 2014). Además de GTP, el ensamblaje de la tubulina requiere una temperatura adecuada y una concentración de proteína, denominada concentración crítica, por debajo de la cual se produce la despolimerización. Los dímeros de tubulina se añadirán en conformación tensa, permitiendo las interacciones laterales con los dímeros adyacentes y formando una estructura de dos dimensiones en forma de hoja (Figura 26A). Los bordes longitudinales de la hoja se unirán entre sí, dejando una oquedad central, formando el microtúbulo (Horio y Murata, 2014). Tras la unión, en la subunidad β se hidroliza el GTP induciendo cambios conformacionales importantes en el dímero, los cuales favorecen la

despolimerización del microtúbulo y que no se producen debido a las interacciones con otros monómeros adyacentes. Mediante la adición de nuevos dímeros de tubulina se forma una "tapa" de GTP en el extremo; de modo que si la concentración de GTP en esta "tapa" disminuye por hidrolización del mismo, se producirá la despolimerización del microtúbulo (Figura 26B).



Figura 26.- Microtúbulo en diferentes fases: (A) polimerización (B) despolimerización y (C y D) sufriendo un "rescate" mediante la adición de tubulina GTP que frena la despolimerización (Horio y Murata, 2014).

Los microtúbulos se encuentran continuamente en un estado de polimerización y despolimerización que se denomina "inestabilidad dinámica" (Kirschner y Mitchison, 1986). Los microtúbulos se alargarán cuando la proporción de polimerización es mayor que la tendencia a la despolimerización (Figura 26A) y se acortarán en el caso contrario (Figura 26B). Los microtúbulos que se encuentran en fase de despolimerización, pueden volver a estado de polimerización mediante un proceso conocido como "rescate", que consiste en la nueva adición de tubulina y GTP (Figura 26 C y D) (Horio y Murata, 2014).

1.2.2 Estructura de la tubulina

La primera descripción de las tubulina fue realizada por Nogales en *Sus scrofa* (Nogales y col., 1998b), definiendo los diferentes dominios y motivos estructurales. Debido a la elevada conservación filogenética y la homología entre las diferentes tubulinas secuenciadas hasta el momento, esta descripción estructural puede servir como modelo para las tubulinas de diferentes especies.

Cada una de las subunidades α y β contienen alrededor de 450 aminoácidos. La homología entre ambas secuencias es del 40 %, y su estructura tridimensional es muy parecida. Las dos subunidades constan de dos láminas β de seis y cuatro cadenas respectivamente, flanqueadas por doce hélices α . Cada monómero se divide en tres grandes dominios (N-terminal, intermedio y C-terminal) y una cola C-terminal (Figura 27) (Nogales y col., 1998b).



Figura 27.- Modelo de dímero de tubulina en el que se observan las dos subunidades α y β , y los diferentes dominios estructurales: dominio N-terminal (verde), dominio intermedio (azul) y dominio C-terminal (violeta). En la figura no se representa la cola C-terminal. Modificación del modelo 4IHJ de Prota y col., 2013.

1.2.2.1 Dominio N-terminal

El dominio N-terminal incluye los 205 primeros aminoácidos, con un plegamiento de tipo Rossmann, compuesto por hélices y láminas intercaladas. El plegamiento de tipo Rossmann consta de una lámina β central que divide el dominio en dos mitades y es característico de los sititos de unión a nucleótidos (Figura 28A) (Rao y Rossmann, 1973). En un lado de la lámina se encuentran las hélices H1 y H2, disponiéndose de forma alterna a las láminas S1, S2 y S3 (Figura 28B); mientras que en la otra cara se encuentran las hélices H3, H4 y H5, flanqueadas por las láminas S3, S4, S5 y S6 (Figura 28C) (Nogales y col., 1998b; Lowe y col., 2001).



Figura 28.- (A) Tubulina α en la que se observa el domino N-terminal (verde) y la lámina β (naranja) que divide el dominio en dos partes: (B) una primera que corresponde a los 100 primeros aminoácidos y (C) una segunda que continúa hasta el final del dominio. Molécula de GTP (rojo) unida al dominio. Modificación del modelo 4IHJ de Prota y col., 2013.

1.2.2.2 Dominio intermedio

El dominio intermedio comprende una región desde el aminoácido 206 al 381 y está compuesto por una lámina β rodeada por cinco hélices α . El dominio comienza con las hélices H6 y H7, seguidas del lazo T7 y de la hélice H8 que forma la superficie de contacto entre monómeros (Nogales y col., 1998b). Entre la hélice H8 y la H9 se sitúa la primera lámina del dominio S7, unido mediante el lazo M a H9; dicho lazo participa estrechamente en la unión lateral de los monómeros (Sui y Downing, 2010). La hélice H9 es el nexo de unión entre las láminas S8 y S9, y el bucle entre S9 y H10 incluye una inserción de ocho aminoácidos (Figura 29) (Nogales y col., 1998b).



Figura 29.- Tubulina α en la que se observa el dominio intermedio (azul) y la lámina β (naranja) rodeada por las cinco hélices que forman parte del dominio. Modificación del modelo 4IHJ de Prota y col., 2013.

1.2.2.3 Dominio C-terminal

El dominio C-terminal está formado por dos largas hélices α antiparalelas H11 y H12, que se superponen sobre los dominios N-terminal e intermedio. Dichas hélices están unidas por dos lazos y la hélice H11' (Figura 30) (Lowe y col., 2001).



Figura 30.- Tubulina α donde se observan, el dominio C-terminal (morado) y los elementos que lo componen. Modificación del modelo 4IHJ de Prota y col., 2013.

1.2.2.4 Extremo C-terminal

Tiene dos características fundamentales que son su flexibilidad y su carga negativa. La cola C-terminal de la subunidad α se compone de 10 a 12 aminoácidos, mientras que en la subunidad β es más larga, entre 16 a 22 aminoácidos. Es una región que puede sufrir varios cambios post-traducionales y post-trascripcionales como acetilación, fosforilaciones y poliadenilaciones. Se sitúa cerca del sitio de interacción de proteínas de unión a microtúbulos (MAPs), y aunque no es una región esencial para la polimerización es fundamental para el funcionamiento de algunas proteínas motoras como la dineinas y kinesinas (Roll-Mecak, 2014).

Debido a su gran flexibilidad, el extremo C-terminal no se ha podido estudiar mediante técnicas de difracción de rayos-X y microscopia electrónica de gran resolución. Simulaciones bioinformáticas sugieren que esta zona es extremadamente flexible y que no adopta ninguna conformación estable (Luchko y col., 2008).

1.2.3 Interacciones

Dentro del microtúbulo los monómeros experimentan interacciones dentro del mismo protofilamento y lateralmente con protofilamentos adyacentes. Estas interacciones dan como resultado la red que forman los microtúbulos.

La estructura de los microtúbulos variará en función de: a) el número de protofilamentos; b) la disposición de la red en función de su tipo de rejilla, que puede

ser de tipo A ó B; y c) El número de incrementos de subunidades por vuelta, que puede ser de 2, 3 ó 4 (Figura 31) (Sosa y col., 1997).



Figura 31.- Redes de tubulina formando microtúbulos en función del número de protofilamentos (13 ó 14), de su tipo de rejilla (A ó B), y del incremento de subunidades por vuelta (3 ó 4) (Mandelkow y col., 1986).

1.2.3.1 Interacciones dentro del mismo protofilamento

Las interacciones entre las subunidades α - β de un mismo dímero y de distintos dímeros para formar un protofilamento son muy parecidas. Entre subunidades se han definido tres zonas de interacción, la Zona A formada por H10, S9 y el lazo que se forma entre ambos motivos; dicha zona interacciona con H6, el lazo H6-H7 y el lazo H11-H12 de la siguiente subunidad. La Zona B formada por H8, el lazo H3-S4 y el extremo N-terminal que interacciona con parte del lazo S5-H5 y el lazo S3-H3 de la siguiente subunidad. La Zona C formada por el lazo T7 que interacciona con las regiones T1, H2 y H7 de la siguiente subunidad (Figura 32A). La Zona A se sitúa cerca de la cara exterior del microtúbulo, mientras que la Zona C se sitúa más cerca de su lumen (Nogales y col., 1999).

Las diferencias entre las interacciones intra-dímero e inter-dímero se dan en las Zonas B y C (Figura 32B). En la Zona C, el aminoácido implicado en la unión intra-dímero es la Gln247 situada en el lazo T7 de la subunidad β , que interacciona con la Gly77, laThr73 y la Thr225 de la subunidad α . En las uniones inter-dímero los aminoácidos implicados son la Gly247, que se encuentra en el lazo T7 de la subunidad α y que interacciona con la Ser77, Gly73 y Gly225 de la β . Dentro de la Zona B en la unión intra-dímero están implicados los aminoácidos β Arg253 y α Asp98 que forman un puente

salino, mientras que en la unión inter-dímero los aminoácidos implicados son α Thr253 y β Gly98 que forman una unión mucho más débil (Nogales y col., 1999).



Figura 32.- (A) Esquema de las interacciones laterales entre dos subunidades mostrando las diferentes zonas de interacción: zona A (rojo), zona B (azul) y zona C (verde); y (B) las diferencias entre interacción intra-dímero (azul) e inter-dímero (B, verde)

1.2.3.2 Interacciones laterales

El motivo fundamental en las interacciones laterales es el lazo M que se forma entre S7 y H9 (Figura 29). En la subunidad α lo forman los aminoácidos comprendidos entre Tyr272 y Ser287, y en la subunidad β los aminoácidos comprendidos entre Phe272 y Val288. El lazo M interacciona lateralmente con los lazos H1'-S2 y H2-S3 de la subunidad adyacente (Nogales y col., 1999). El lazo H1'-S2 lo componen la secuencia de aminoácidos Phe53-Arg64 en la subunidad α y Thyr53-Arg64 en la β , mientras que el lazo H2-S3 lo forman los aminoácidos Gly81-Gln91 de la subunidad α y Gly81-Asn91 de la β (Sui y Downing, 2010).



Figura 33.- (a) Corte transversal de un microtubulo de 13 protofilamentos, (b) representación de interacción α - α y β - β ; y (c) representación de interacción α - β y β - α (Sui y Downing, 2010)

1.2.3.2.1 Interacción lateral α - α y β - β

Normalmente la interacción lateral entre protofilamentos es α - α y β - β (Figura 33). En la interacción α - α está implicada la Lys280 del lazo M, que interacciona con la Glu90 del lazo H2-S3 mediante un puente salino. Este aminoácido interacciona también con la His283 y la Glu55 formando un segundo puente (Sui y Downing, 2010).

En la interacción β - β el puente salino se produce entre la Arg284 y la Glu55. Se establece además un puente de hidrogeno entre Arg88, Asp90 y Pro89 con Ser280, Gln281 y Gln281 del lazo M (Sui y Downing, 2010).

1.2.3.2.2 Interacción lateral α - β y β - α

Este tipo de interacción solo se da en el caso concreto de microtúbulos con 3 subunidades por vuelta y rejilla tipo A (Figura 31). Dependiendo de la dirección del enlace α - β ó β - α los aminoácidos implicados van a ser distintos.

En la interacción α - β , la His283 del lazo M de la subunidad α forma un puente salino con el Glu55 conservado de la subunidad β , mientras que la His283 interacciona con la Asp90 (Figura 34) (Sui y Downing, 2010).

En el caso β - α , la Arg280 del lazo M de la subunidad β forma un puente salino con el Glu55 conservado, y la región formada por los aminoácidos His88, Pro89 y Glu90, forma un puente de hidrogeno con la región de la Ser280 (Figura 34) (Sui y Downing, 2010).



Figura 34.- Esquema de las interacciones laterales de dos monómeros de tubulina, dependiendo del tipo α - α , β - β , α - β y β - α ; con los diferentes puentes salinos (azul) y posibles puentes de hidrogeno (verde).

1.2.4 Sito de unión al GTP

Cada dímero de tubulina tiene dos sitios de unión al GTP, uno en la subunidad α denominado "Sitio N" (*non-exchangeable*), en él no se produce la hidrolisis de GTP a GDP, y otro en la subunidad β denominado "Sitio E" (*exchangeable*) en el que sí se produce el intercambio (Nogales y col., 1998b).

Tanto el Sitio E como el Sitio N se componen de dos partes, el bolsillo hidrofóbico donde se sitúa el nucleótido y una pequeña parte de la subunidad adyacente en el protofilamento. El Sitio N, está formado por el bolsillo de unión al GTP, que se encuentra en la subunidad α y una pequeña parte de la subunidad β de su mismo dímero de tubulina. En el caso del Sitio E, el bolsillo se sitúa en la subunidad β y la otra parte pertenece a la subunidad α del dímero adyacente (Figura 35) (Nogales y col., 1998b). Jose Miguel Escudero Martínez

Los sitios de unión N y E son muy similares y sólo difieren en algunos aminoácidos. El bolsillo se sitúa en el dominio N-terminal y se compone por los lazos S1-H1, S2-H2, S3-H3 y S5-H5; y parte de las hélices H1, H2, H7. El resto del dominio implicado, situado en la subunidad adyacente, se compone por el lazo H7-H8 (lazo T7) y parte de la hélice H7 (Lowe y col., 2001).

La diferencia más importante entre el Sitio E y el N es la posición 254 en la hélice H8. En la subunidad α esta posición está ocupada por una glutamina y en la β por una lisina. La α Glu254 actúa en el Sitio E como catalizador de la reacción de hidrolisis de GTP (Alushin y col., 2014).



Figura 35.- (A) Protofilamento de tubulina con dos dímeros, en verde se representa el Sitio E y en azul el Sitio N. (B) Detalle del sitio de unión N donde se ve una molécula de GTP y la interacción con el lazo H7-H8 y la hélice H7 de la subunidad β.

1.2.4.1 Cambios conformacionales durante la hidrolisis de GTP

Se producen dos grandes cambios durante la hidrolisis de GTP en el Sitio E (Figura 36). El primero se produce en el lazo S3-H3 donde el Asn101 forma un puente de hidrógeno con el fósforo y del GTP unido a la tubulina tubulina. Cuando se produce la hidrólisis a GDP el fosfato y desaparece y el As101 forma un puente de hidrógeno con el fosfato β . Este cambio provoca un desplazamiento del lazo S3-H3 y el lazo S5-H5, que origina el movimiento del Asp179 de una posición externa con GTP a una posición interna con GDP (Nawrotek y col., 2011). Estos cambios repercutirán finalmente en la topología del dímero, que pasará de una forma tensa (GTP) a una relajada (GDP).

Introducción



Figura 36.- Diferencias en el Sitio E en presencia de GTP (a) y GDP (b) (Nawrotek y col., 2011).

1.2.5 Inhibidores de la polimerización de tubulina

Los compuestos químicos que actúan sobre los microtúbulos, tanto estabilizándolos como despolimerizándolos, se han propuesto como principios activos para el tratamiento de patologías relacionadas con la proliferación celular. Durante el periodo de 2005 a 2007, el 25% de los compuestos testados como anticancerígenos tenían la tubulina como diana (Mikstacka y col., 2013). Los ligandos activadores, como el taxol, promueven la polimerización de microtúbulos, incluso en condiciones donde no se produciría la polimerización de forma espontánea, y además, una vez producida la polimerización, estos compuestos estabilizan el microtúbulo impidiendo su despolimerización (Prota y col., 2013). Por otra parte los desactivadores, como la colchicina, favorecen la despolimerización e impiden el ensamblaje (Kaur y col., 2014). La tubulina tiene dos sitos de unión a ligandos desestabilizadores y dos a ligandos estabilizadores.

Los dominios de unión a los derivados de la vinca, taxol, colchicina y otros se encuentran bien identificados en el heterodímero de la tubulina y algunos se muestran en la Figura 37 (Downing y Nogales, 1999; Lu y col., 2012).



Figura 37.- Distribución de los sitios de unión de la tubulina, donde se muestran las dos subunidades de la tubulina α y β ; el sitio de unión al taxol (T, en verde), sitio de unión a la vinca (V, en azul) y sitio de unión a la colchicina (C, en rojo) (Downing y Nogales, 1999).

1.2.5.1 Dominio de unión de la colchicina

A excepción de la curacina A, las moléculas que se unen a este dominio tienen una estructura formada por dos anillos aromáticos, uno de los cuales es un trimetoxibenceno (Werbovetz, 2002). El más conocido de estos ligandos y el que da nombre al domino es la colchicina, a este dominio también se unen las combrestatinas y los lignanos como la podofilotoxina (Figura 38). Los ligandos que se unen a este dominio producen la despolimerización de los microtúbulos a elevadas concentraciones, mientras que a bajas impiden la dinámica de creación de nuevos microtúbulos (Skoufias y Wilson, 1992). Se ha observado que producen la deslocalización espacial del cinetocoro y también detienen el ciclo celular en G2/M (Havens y col., 2000).



Figura 38.- Ligandos inhibidores de la polimerización de la tubulina que se unen al dominio de la colchicina.



Figura 39.- Subunidades α y β del dímero de tubulina. (A) En rojo se muestra el sitio de unión de la colchicina. (B) Los diferentes motivos implicados en el sitio de unión de la colchicina y una molécula de colchicina (violeta).

Introducción

El sitio de unión a la colchicina se sitúa entre las subunidades α y β . Está formado por las láminas S8 y S9, las hélices H7, H8, el lazo que se forma entre ellas en la subunidad β y el lazo T5 de la subunidad α . Tiene una gran importancia la región H7 que contiene la Cys241, la cual interacciona con el anillo trimetoxibenzeno presente en muchos de los ligandos que se unen a este sitio (Figura 39) (Ravelli y col., 2004).

1.2.5.1.1 Lignanos

Los lignanos son un grupo de compuestos de origen natural ampliamente distribuido en las plantas y biosinetizados a través de la ruta del ácido sikímico. Estructuralmente todos están formados por dos unidades de fenilpropano enlazados por el átomo central de sus cadenas laterales. Los compuestos derivados de otro tipo de unión entre las unidades de fenilpropano se denominan neolignanos. Los lignanos a su vez se dividen en lignanos simples y ciclolignanos. Los lignanos simples presenta una unión C-C a través de las posiciones 8 y 8'de sus cadenas laterales mientras que en los ciclolignanos se genera otro enlace adicional C-C que da lugar a un nuevo anillo (Figura 40) (Ayres y Loike, 1990)



Figura 40.- Unión C8-C8 entre las cadenas laterales de las unidades de fenilpropano y estructuras químicas de diversos lignanos simples y ciclolignanos.

La actividad farmacológica de estos compuestos es amplia, habiéndose demostrado su acción antiinflamatoria, antivírica, se ha visto que confieren protección frente a hepatotoxinas y que actúan sobre el tracto gastrointestinal, sistema cardiovascular y sistema nervioso central. Pese a todo esto, el mayor interés que han despertado se debe a las propiedades citotoxicidad y antitumoral mostradas por los ciclolignanos del grupo de la podofilotoxina (Figura 40) (Zhang y col., 2014)

La podofilotoxina es un compuesto natural que proviene de la raíz de *Podophyllum peltatum y Podophyllum hexandrum.* La podofilotoxina muestra una severa toxicidad gastrointestinal por lo que no es apta para uso clínico aunque sí lo son sus derivados glicosilados semisintéticos, el etopósido y el tenipósido que se emplean bien solos o junto con otros fármacos para el tratamiento de linfomas, el carcinoma de células pequeñas y la leucemia aguda (O'Dwyer y col., 1985). La podofilotoxina actúa durante la mitosis impidiendo la polimerización de la tubulina al unirse al sitio de la colchicina (Sackett, 1993). Sin embargo la citotoxicidad del etopósido y tenipósido es consecuencia de su capacidad de inhibir la ADN topoisomerasa II mediante la estabilización de complejos terciarios entre la enzima y el ADN (Islam y Iskander, 2004). Se cree que la podofilotoxina puede actuar también sobre una tercera diana desconocida pues se han encontrado derivados de la podofilotoxina con gran citotoxicidad con escasa acción sobre las dianas conocidas (Castro y col., 2010b).

1.2.5.2 Dominio de unión de la vinca

Al dominio de unión de la vinca se une la vincristina (Oncovin[®]) y la vinblastina (Velban[®]) generando la inestabilidad de los microtúbulos. Estos compuestos se usan actualmente para el tratamiento de linfoma de Hodgkin, cáncer testicular, sarcoma de Kaposi y enfermedad de Letterer-Siwe (Roditi y Liniger, 2002) (Figura 41). Otros compuestos que interacionan en esta misma región son: hemiasterlina, rhizoxina, maitainsina y dolactatina 10.

El dominio de unión de la vinca se encuentra en la interfase entre los dímeros, a diferencia del sitio de unión la colchicina que se encuentra en la interfase entre las subunidades α y β del mismo dímero de tubulina, cerca del sito E de unión al GTP (Gigant y col., 2005). El sitio de unión de la vinca está muy cerca del sitio de unión al taxol (que se describe a continuación); de tal manera que, cuando se une un derivado de la vinca como la viblastina, este inhibe la unión del taxol. La unión de un compuesto a esta zona inhibe la actividad GTPasa de la tubulina (Gupta y Bhattacharyya, 2003). En el sitio activo están implicados la hélice H-10, la lámina S9 y el lazo H7-H8 de la subunidad α , además de los lazos S5-H5 y H6-H7 de la subunidad β de otro dímero (Figura 42) (Cormier y col., 2010; Ranaivoson y col., 2012).



Figura 41.- Ligandos inhibidores de la polimerización de la tubulina que se unen al dominio de la vinca



Figura 42.- (A) Dos dímeros de tubulina donde se muestran las cuatro subunidades 2 α y 2 β ; en azul se muestra el sitio de unión de la vinca. (B) Los diferentes motivos implicados en el sitio de unión y una molécula de vimblastina (violeta).

Jose Miguel Escudero Martínez

1.2.5.3 Dominio de unión del taxol

La actividad antitubulina del taxol se descubrió en 1980, siendo el primer compuesto estabilizador de microtúbulos descrito. El taxol es capaz de inducir la polimerización de microtúbulos en ausencia de GTP y estabilizarlos en condiciones despolimerizadoras como el frío (Figura 43) (Prota y col., 2013).



Figura 43.- Ligandos estabilizadores de la tubulina que se unen al dominio del taxol.



Figura 44.- (A) Dímeros de tubulina en los que se muestra en verde el sitio de unión del taxol y (B) los diferentes motivos implicados en el sitio de unión y una molécula de taxol (violeta).

El sito de unión a taxol se sitúa en el lumen del microtúbulo, en un bolsillo hidrófobo cerca de la zona de interacción con otros protofilamentos en la subunidad β (Nogales y col., 1995). Los motivos implicados en el sitio de unión son los aminoácidos hidrófobos de la hélice H7, parte de los aminoácidos de la hélice H1, el lazo M y el lazo S9-S10. El lazo M tiene gran importancia en las interacciones laterales entre protofilamentos y es el elemento que favorece la unión fuerte de los ligandos a este sitio. En la tubulina despolimerizada la estructura del lazo M está desordenada, a diferencia de la estructura ordenada que presentan los microtúbulos (Figura 44) (Prota y col., 2013).

1.2.5.4 Dominio unión de la laulimalida

La laulimalida (Figura 46) es un compuesto que se descubrió en 1999 y procede de la esponja *Cacospongia mycofijinsis*, existente en el Océano Índico (Mooberry y col., 1999; Kingston, 2009). Al igual que el taxol, es capaz de inducir el ensamblaje de las subunidades de tubulina para formar microtúbulos, pero se une a un sitio alternativo, ya que un mismo dímero de tubulina puede tener unidos a la vez taxol y laulimalida. En este dominio se une también la pelorusida A (Figura 46) (Risinger y col., 2009).



Figura 45.- (A) Dímero de tubulina en el que se muestra el sitio de unión de la laulimalida y (violeta) (B) y los diferentes motivos implicados en el sitio de unión y una molécula de laulimalida (violeta).

El sitio de unión a la laulimalida se encuentra muy próximo al sitio de unión del taxol en la subunidad β , pero no interfiere con él. Se encuentra formado por las hélices H9 y H10 que flanquean el sitio de unión y el lazo H10-S9 (Figura 45) (Prota y col., 2014). También interacciona con las subunidad β del protofilamento adyacente, concretamente con los lazos H1-S2 y H3-S4 (Churchill y col., 2014).



Figura 46.- Ligandos estabilizadores de la tubulina que se unen al dominio de la laulimalida.

1.2.6 Tubulina en Leishmania

En *Leishmania*, como en el resto de Kinetoplastidos, la tubulina es una de las proteínas más abundantes (Havens y col., 2000). Aparece en tres grandes fracciones: citoplasmática, subpelicular y flagelar (Werbovetz, 2002). Además de tener las funciones comunes descritas en otros organismos, la tubulina juega un papel fundamental en la diferenciación celular de cada uno de los estadios de su ciclo biológico (Fong y col., 1984). La tubulina de *Leishmania* tiene una alta homología con la tubulina de otras especies, de modo que su porcentaje de identidad con la tubulina de mamífero es del 83% (*Ovis aries*) (Luis y col., 2013).

Los genes codificantes de los monómeros de tubulina aparecen dentro de agrupaciones génicas cuya composición depende de la especie (Jayanarayan y Dey, 2002).

Se han realizado estudios en los que se observó el efecto de diversos inhibidores de la polimerización de tubulina con la proteína purificada de *Leishmania*. Observándose, que compuestos que se sitúan en el lugar de unión de la colchicina, como la propia colchicina o el albendazol, no tienen ningún efecto sobre este proceso y otros que se fijan al lugar de unión de la vinca, como la vinblastina, muestran una menor sensibilidad con respecto a la proteína humana (Werbovetz y col., 1999). Estas diferencias de actividad entre los compuestos que se sitúan en el lugar de la colchicina parecen relacionarse con diversos polimorfismos existentes en esta región (Luis y col., 2013).

1.3 ADN topoisomerasas

Debido a la gran longitud del ADN, que puede llegar a ser hasta miles de veces el tamaño de la célula, se necesita un sistema para su empaquetamiento en el interior. Este sistema consiste en plegar el ADN sobre sí mismo varias veces reduciendo considerablemente su tamaño, a esta conformación del ADN se le denomina superenrollado (Vinograd y col., 1965). Como todo sistema de empaquetamiento, el ADN necesita de un sistema de desempaquetado que pase el ADN superenrollado a una forma relajada más accesible, en esta función participan las ADN topoisomerasas (Figura 47).



Figura 47.- Fotografía de microscopía electrónica de los dos estados de ADN. A la izquierda de la imagen se observa el estado topológico superenrollado, y a la derecha se observa la molécula en su conformación relajada (Vinograd y col., 1965).

Los organismos procariotas organizan sus pequeños cromosomas circulares mediante un enrollamiento plectonémico, en el que las dos cadenas de ADN se retuercen una alrededor de la otra (Figura 48A) (Vologodskii y Cozzarelli, 1994). Los organismos eucariotas organizarán su ADN lineal en forma de solenoides en torno a las histonas, dando lugar a un empaquetamiento más eficaz en forma de "collar de perlas" (Figura 48B), que a su vez se enrollaría sobre sí mismo varias veces dando lugar a diversas estructuras de empaquetamiento.



Figura 48.- (A) Ejemplo de superenrollamiento plectonémico y (B) solenoide. Las flechas muestran la orientación del enrollamiento, que en ambos casos es negativo.

El superenrollamiento puede ser de dos tipos, positivo cuando el sentido de giro de una hebra respecto a la otra es hacia la izquierda, o negativo cuando el sentido de giro es hacia la derecha. El superenrollamiento mayoritario en la naturaleza es el negativo.

Otra de las propiedades del superenrollamiento es el número de enlace topológico o *linking number* (LK), que es el número de veces que las dos hebras se cruzan entre si, o dicho de otra manera, el número de veces que una única hebra cruza el plano de proyección. El LK depende de dos variables geométricas: el giro (TW) y la torsión (WR). El TW cuantifica el número de veces que la hebra de ADN se enrolla alrededor del eje de la doble hélice. El WR indica el número de veces que la trayectoria del eje de la doble hélice se cruza sobre si misma cuando está dispuesta en un plano. También se puede definir como el número de giros de una superhelice, considerando como superhelice a la estructura formada por ambas hebras (Figura 49). Los cambios en el LK (ΔLK) son siempre números naturales, aunque no los cambios en TW y WR; cumpliéndose siempre que la suma de las variaciones en ambos parámetros es una constante (Travers y Muskhelishvili, 2015).

 $\Delta LK = \Delta TW + \Delta WR$



Figura 49.- Diferentes enrollamientos negativos y positivos con diferentes numeros de enlace, giro y torsion.

Las ADN topoisomerasas (Top) controlan el estado topológico del ADN celular. Para ello realizan cortes en la cadena de ADN restando o sumando vueltas, haciendo así más accesible el ADN a otras proteínas. Los cortes pueden ser simples con una rotura en una única hebra de ADN (topoisomerasas tipo I), o dobles con la rotura de las dos hebras de ADN; en este último caso, para pasar una hebra de ADN a través de otra que puede pertenecer a la misma molécula o a otra diferente (topoisomerasas tipo II). Las topoisomerasas catalizan el corte de la hebra mediante una reacción de transesterificación, entre una treonina del centro activo y un grupo fosfato de ADN que conduce a la formación de un complejo covalente enzima-ADN. Posteriormente el ADN es sellado por una segunda reacción de trans-

Durante los procesos de transcripción y replicación, los complejos polimerasahelicasa separan las cadenas de ADN, generando superenrollamientos en las regiones flanqueantes pues la hélice no puede girar libremente en el interior de la célula. Esto origina superenrollamientos positivos por delante de los lugares de replicación o transcripción y superenrollamientos negativos por detrás de éstos (Figura 50) (Liu y Wang, 1987). La acción de las topoisomerasas impide estos superenrollamientos, que en el caso de los positivos detendrían los procesos de replicación y transcripción, mientras que los superenrollamientos negativos favorecerían la formación de estructuras anormales de ADN, tales como los D-loops (una hebra sencilla complementaria de ADN queda atrapada en un dúplex), R-loops (un ARN se mantiene ancladoa su molde de ADN tras la ARN polimerasa), cuartetos de guanina, así como estructuras de ADN en forma Z. Todas estas alteraciones interfieren en mayor o menor medida con el funcionamiento normal del ADN (Pommier y col., 2010).



Figura 50.- Representación esquemática de un origen de transcripción y replicación, donde se ve como se separan las dos cadenas de la hebra de ADN y como al avanzar el origen de transcripción y replicación (R), se forman superenrollamientos positivos delante y negativos detrás de éste (Liu y Wang, 1987).

En la actualidad hay descritas cuatro familias de topoisomerasas: TopIA, TopIB, TopIIA y TopIIB. Hay una TopV descrita en 1993 por Alexei Slesarev, pero hasta la fecha solo se ha descrito en un especie de arquea: *Methanopyrus kandleri* (Tabla 3) (Slesarev y col., 1993; Forterre, 2008).

	Tipo I		Tipo II	
	ΤορΙΑ	ТорІВ	TopIIA	TopIIB
Dominio ATPasa	No	No	Si	Si
Dependencia metálica	Mg ²⁺	No	Mg ²⁺	Mg ²⁺
Ruptura de ADN	Cadena sencilla	Cadena sencilla	Cadena doble	Cadena doble
Polaridad de ruptura	5′	3′	5′	5′
Δικ	+1	±1	± 2	± 2
Enzimas	Topl, Topll y girasa reversa (eubacterias)	Topl, Top V	Top II, girasa	Top VI

 Tabla 3.- Características y diferencias de las diferentes familias de topoisomerasas.

1.3.1 ADN topoisomerasas de tipo II

Las ADN topoisomerasas de tipo II (TopII) son enzimas homodiméricas que participan en el relajado, desanudado o desencadenado del ADN, rompiendo de manera transitoria las dos hebras del ADN y utilizando la hidrolisis de una molécula de ATP (Wang, 1998). Durante el proceso de ruptura y posterior ligación, se produce una estructura de transición formada por la unión covalente de los extremos 5'de las hebras de ADN y cada una de las subunidades enzimáticas (Bates y col., 2011). Esta ruptura formará un espacio abierto en la hebra de ADN, denominado segmento G, que permite el paso de la hebra de ADN, que puede ser de la misma cadena (relajación, anudado o desanudado), o de otra diferente (encadenado, desencadenado) (Figura 51). Las TopII siempre cambian el Δ LK en bloques de dos (Bates y col., 2011).



Figura 51.- Las topoisomerasas tipo II, cortan ambas cadenas de la hebra de ADN (verde) y pasan otra hebra de ADN (rosa) a través de la rotura reversible, en una reacción asociada a gasto de ATP. Una vez se ha producido la religación de las hebras de ADN los productos son liberados (Bates y col., 2011).

Las topoisomerasas de tipo II se subdividen a su vez en tipo IIA y tipo IIB. Son estructuralmente muy parecidas y poseen un sistema mecánico similar. La única diferencia está en el corte: las tipo IIA dejan cuatro pares de bases salientes, mientras que las tipo IIB solo dejan dos (Buhler y col., 2001).

1.3.2 ADN topoisomerasa de tipo I

Las topoisomerasas de tipo I (TopI), a diferencia de las de tipo II, solo cortan una de las hebras de la cadena de ADN, relajando dicha hebra para, acto seguido volver a religarla (Champoux y Dulbecco, 1972). El producir una ruptura parcial de la cadena de ADN permite que las TopI puedan cambiar ΔLK en múltiplos de 1. La rotura de la hebra se produce mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de una tirosina presente en el centro activo que origina un enlace fosfodiester transitorio. De este modo la hebra mellada gira alrededor de su complementaria, generando un estado topológico más relajado. Las TopI se subdividen en dos familias según la polaridad del corte: la TopIA donde el extremo implicado es el 5´, mientras que en la TopIB es el 3´ (Leppard y Champoux, 2005).

1.3.2.1 TopIA

Se clasifican como TopIA las enzimas TopI y TopIII pertenecientes a eubacterias, la TopIII de levaduras y mamíferos, así como las girasas reversas de eubacterias y arqueobacterias. Salvo el caso excepcional de la girasa reversa de *Methanopyrus kandleri*, que es un heterodímero, estas enzimas son siempre monoméricas (Kozyavkin y col., 1994). El mecanismo de acción de estas enzimas guarda cierta similitud con el de las TopIIA, ya que ambas forman un intermediario covalente con el ADN mediante un enlace fosfodiester 5' con el residuo Tyr del centro activo. Estas enzimas son también capaces de catalizar el "anudado", "desanudado" y "entrelazado" de círculos de ADN de cadena sencilla, así como el "anudado", "desanudado", "encadenado" y "desencadenado" de círculos de ADN de cadena doble, mellados o rotos. Al igual que la familia TopII requiere Mg²⁺, pero no ATP.

Para que se produzca una interacción entre la enzima y el ADN se han de dar ciertas condiciones: i) la enzima sólo se unirá al ADN con un alto número de superenrollamientos negativos, ii) el ADN debe de tener una región de cadena sencilla para que se produzca la interacción. Finalmente, la enzima nunca consigue una relajación completa de los superenrollamientos (Champoux, 2001).

1.3.2.2 TopIB

Las TopIB se diferencian de las TopIA, tanto estructuralmente como funcionalmente. A diferencia de las TopIA, las TopIB si puede relajar completamente el ADN superenrollado, tanto positiva como negativamente; no necesitan de ADN en forma de cadena sencilla; el enlace covalente entre el ADN y la enzima se produce en el extremo 3', y no requieren de iones metálicos para su funcionamiento.

Las topoisomerasas de Tipo IB, se dividen a su vez en dos grupos estructurales divergentes: las TopIB virales, siendo la TopI de *Vaccinia* la más estudiada, y las TopIB eucariotas, de las cuales la más estudiada es la humana (Leppard y Champoux, 2005). Dentro de las eucariotas cabe destacar la TopIB de *Leishmania* y *Trypanosoma* pues presentan diferencias estructurales relevantes con respecto a la humana (Bodley y col., 2003; Villa y col., 2003)

La TopIB humana es una enzima monomérica de 765 aminoácidos con un peso molecular de 91 KDa y en la cual se pueden diferenciar cuatro dominios estructurales: el dominio N-terminal, el dominio *core*, el dominio *linker* y el dominio C-terminal (Figura 52) (Stewart y col., 1996; Redinbo y col., 1998)



Figura 52.- Representación lineal de los dominios estructurales de la TopIB humana con los diferentes dominios: N-terminal (aa 1-214), central (*core*) (aa 215-634), linker (aa 635-712) y C-terminal (aa 713-765). En el esquema se muestran los cinco aminoácidos que constituyen el centro activo de la proteína. Las señales de localización nuclear (NLS) están representadas por triángulos negros.

Los primeros 214 aminoácidos de la proteína constituyen el dominio N-terminal. Esta región se encuentra poco conservada filogenéticamente y no participa en las reacciones catalíticas, aunque está implicada en los procesos de localización e interacción, encontrándose en ella diferentes señales de localización nuclear (Alsner y col., 1992; Redinbo y col., 1999).

Jose Miguel Escudero Martínez

El domino core comprende los aminoácidos del 215 al 635 y es una región altamente conservada. El dominio *core*, a su vez se subdivide en tres dominios: *core* I (aa 215-232 y 320-433), II (aa 233 y 319) y III (aa 434-635) (Figura 53). Los subdominios I y II forman el CAP, que constituye uno de los dos lóbulos que envuelven la cadena de ADN. El otro lóbulo, denominado CAT, está formado por el subdominio y el dominio C-terminal (Figura 54). El lóbulo CAT contendrá los aminoácidos catalíticos Arg488, Arg590 y His632 del subdominio y la Tyr723 del dominio C-terminal (Redinbo y col., 2000).



Figura 53.- Esquema tridimensional de la topoisomerasa IB de humna con un dúplex de ADN de 22 pb (morado), donde se ven los difrentes dominios *core*, *subcore* I (amarillo), *subcore* II (azul) y *subcore* III (rojo); el dominio linker (naranja) y el extremo C-terminal (verde) (Redinbo y col., 1999).

El dominio C-terminal está formado por los aminoácidos situados al final de la proteína, desde el 713 al 765. En el interior de este dominio se sitúa la Tyr723 que forma el centro catalítico de la enzima. Este dominio junto con el *core* forma una cavidad de aproximadamente 20 Å en la que encajará el ADN.

El dominio *linker* Lo forman los aminoácidos 637 al 712, que adquieren una conformación de dos hélices antiparalelas que sobresalen del resto de la enzima (Redinbo y col., 1999).

La TopIB de *Leishmania* (LdTopIB) a diferencia de la humana es una proteína heterodimérica formada por dos subunidades: una subunidad grande de 635 aminoácidos y un peso molecular de 73 kDa (LdTopIL) y una subunidad pequeña de 262 aminoácidos y 28 kDa (LdTopIS). Este tipo de organización también se da en otros tripanosomátidos (Bodley y col., 2003; Villa y col., 2003).

Introducción



Figura 54.- Esquema de la topoisomerasa IB de humana en la que se muestran los dos grandes lobulos que rodean la cadena de ADN (morado). El CAT formado por el subdominio *core* III (rojo) y el extremo C-terminal (verde); y el CAP formado por los subdominios *core* I (amarillo) y II (azul) (Redinbo y col., 1999).

La comparación estructural de las TopIB de tripanosomátidos con la enzima ortóloga humana, permite asignar dominios y subdominios funcionales que son similares en ambos casos (Figura 55).



Figura 55.- Representación esquemática lineal de la LdTopIB. Nt representa el dominio N-terminal y Ct el dominio C-terminal. Los aminoácidos señalados constituyen la péntada catalítica en el centro activo de la enzima.

La subunidad LdTopIL contiene el extremo N-terminal y el dominio *core*. El extremo N-terminal es más corto que la enzima humana y muy poco conservado filogenéticamente. El dominio *core* guarda una alta homología con el de otras topoisomerasas IB, y en él se encuentran la mayoría de aminoácidos que interaccionan con el ADN (Figura 55), como la Arg314 (Arg488 en la enzima humana), Lys352 (Lys532 en la enzima humana), Arg410 (Arg590 en la enzima humana) e His453 (His632 en la enzima humana) (Figura 56). Finalmente esta subunidad presenta una extensión C-terminal que carece de homología con otras proteínas ortólogas (Diaz-Gonzalez y col., 2008).



Figura 56.- Representación tridimensional del centro activo de la TopIB de *Leishmania* (B), y humana (A) con los diferentes aminoácidos que participan en la reacción catalítica. En el centro activo de la TopIB de Leishmania se observan las dos subunidades que componen la enzima, la subunidad pequeña (verde) que contiene la Tyr 222 y la subunidad grande (azul) (Davies y col., 2006).

La subunidad LdTopIS contiene un extremo N-terminal largo, no conservado y rico en residuos serina susceptibles de ser fosforilados, que podrían constituir un sitio de regulación post-traduccional. Su extremo carboxilo guarda una alta homología con el extremo C-terminal de otras TopIB, y es donde se sitúa la Tyr222 (Tyr723 en la enzima humana), esencial para la ruptura transitoria de la cadena nucleotídica del ADN (Reguera y col., 2006).

En la TopIB de *Leishmania* no se conoce la disposición del *linker*. Se cree que podría estar formado por parte de los extremos de la dos subunidades, que al interaccionar entre sí estabilizarían el conjunto, o que podría generarse como consecuencia de modificaciones post-trasduccionales que eliminasen parte de los grupos amino y carboxilo de las diferentes subunidades (Das y col., 2004).

El mecanismos de catálisis y relajación de la TopIB se ha estudiado ampliamente en la enzima humana y el modelo que actualmente se considera más correcto para su explicacion es el de "rotación controlada" (Stewart y col., 1998), donde el extremo 5'libre rota controladamente en el interior de la enzima por la fricción generada entre esta y el ADN antes de la religación (Koster y col., 2005).

Este mecanismo se compone de cuatro etapas que se suceden de forma secuencial: i) unión del ADN a la enzima, ii) reacción de trans-esterificación de la enzima con el ADN; iii) relajación del ADN por la tensión helicoidal acumulada; iv) religación del enlace fosfodiester y liberación del ADN (Figura 57).

Introducción



Figura 57.- Esquema del mecanismo de relajación del ADN mediado por la TopIB. Tras la unión al ADN (A y B) la forma cerrada de la enzima cataliza el corte de la hebra a escindir (C y D). El ADN cortado rota (E) alrededor de una serie de enlaces en la cadena intacta. Existe la posibilidad de que sucedan múltiples rotaciones antes de que los pasos sean revertidos, y el ADN puede entonces ser cortado de nuevo o liberado. (Champoux, 2001).

La TopIB se unirá solo a regiones específicas del ADN, estas regiones se componen por la secuencia de nucleótidos 5'-(A/T)(G/C)(A/T)T-3' situadas en la posición -4 a -1 desde el sitio de corte. La enzima se unirá covalentemente con la timidina -1, formándo un puente de hidrógeno entre la Lys532 y el O-2 de la imidina. En algunas ocasiones la posición -1 puede estar ocupada por una citosina (Tanizawa y col., 1993).

La ruptura se producirá cuando el O-4 de la Tyr723 realice un ataque nucleofilico contra el fosfato de la hebra de ADN, produciendo una reacción de trans-esterificación, que dará lugar a un enlace fosfodiester transitorio entre la Tyr723 y el fosfato en posición 3'de la timidina -1; y liberando el grupo hidroxilo de la posición 5 del ADN (Figura 58) (Krogh y Shuman, 2000). En este proceso van a actuar, además los residuos de Arg488 y Arg590, que forman enlaces de hidrógeno con átomos de oxígeno del fosfato que va a ser escindido, y la His632 que se unirá a otro oxígeno (Redinbo y col., 1998; Champoux, 2001).



Figura 58.- Reacción de trans-esterificación de la TopIB. (1) En el primer paso, His263 actúa como un nucleófilo, atacando el enlace fosfodiéster. La His493 acepta un protón para el grupo saliente (HO-R). (2) Se forma el complejo intermediario en el que His263 está unida covalentemente al extremo 3 'del ADN a través de un enlace fosfoamida. (3) Un segundo ataque nucleofílico por una molécula de agua activado por His493. (4) El sitio activo se regenera y el extremo 3 'de ADN-fosfato se libera (Krogh y Shuman, 2000).

Una vez producido el corte, la hebra de ADN rotará libremente debido a la tensión acumulada en los superenrollamientos (Champoux, 2001). Una vez relajado el ADN, se produce el resellado del enlace fosfodiester, utilizando para ello la energía almacenada en el complejo covalente intermedio ADN-TopIB, de modo que la escisión-religación no precisa de la hidrólisis de ATP. Bajo condiciones normales, los intermediarios de escisión son transitorios y el proceso de religación está favorecido.

1.3.2.2.1 Inhibidores de la Topoisomerasa IB

Debido a la importancia de su interacción directa con el ADN, la topoisomerasa IB se considera una buena diana terapéutica, ya que un fallo en su actividad supone la muerte celular. Algunos de los antineoplásicos con mayor éxito clínico han sido descritos como inhibidores TopIB (Pommier, 2006). Además, como ya se ha descrito la TopIB de tripanosomátidos difiere estructuralmente de la de su hospedador, lo que abre una nueva vía hacia el diseño de moléculas que actúen específicamente sobre la enzima del parásito.

Los inhibidores de la TopIB se han clasificado en dos categorías: i) los compuestos que estabilizan el complejo de escisión entre la enzima y el ADN, denominados inhibidores de tipo I o venenos enzimáticos; ii) los compuestos que interfieren las funciones catalíticas de la enzima, que se denominan de tipo II (Pommier, 2006).

1.3.2.2.1.1 La camptotecina

La camptotecina (CPT) es un alcaloide pentacíclico natural aislado de la corteza y el tallo de la planta *Camptotheca accuminata*, un árbol ornamental de la familia Nyssacea, originario del sudeste de China y del Tibet (Figura 59) (Wall y col., 1966). Debido a su alta toxicidad su registro no fue aprobado, pero dio lugar a numerosos derivados que han sido utilizados en terapias contra el cáncer (Pommier, 2006).



Figura 59.- Estructura de la camptotecina.

La CPT estabiliza el estado covalente enzima-DNA e impide el religado de la hebra de ADN escindida (Liu y col., 2000; Pommier, 2006). La molécula de CPT se intercala en el punto de escisión de la cadena de ADN imitando un par de bases nitrogenadas. Dentro del sitio de intercalación, la cadena lateral del Asp353 de LdTopIL, establece un puente de hidrógeno con el alcohol en posición C-20 de la CPT (Figura 59), mientras que la Arg190, se une mediante otro puente de hidrógeno con un átomo de N del anillo B de la

Introducción

CPT. La Asn221, cercana a la Tyr catalítica de la subunidad pequeña, también interviene en la inhibición de la CPT, aunque no establece ningún puente de hidrógeno con el fármaco. Otro residuo importante involucrado en el mecanismo de inhibición de la CPT es el motivo conservado Phe361-X-Gly363 y la Arg364del dominio *core* de la subunidad grande de la LdTopIB (Staker y col., 2005).

1.3.2.2.1.2 Topotecán

El topotecán es un derivado hidrosoluble de la CPT, utilizado principalmente para el tratamiento de cáncer ovárico y de pulmón, además de otros tipos de cáncer. El topotecán tiene un anillo de lactona que se hidroliza de manera reversible hacia un anillo carboxilado inactivo (Figura 60) (Kollmannsberger y col., 1999).



Figura 60.- Estructura del topotecán.

1.3.2.2.1.3 Irinotecán (CPT-11) y SN38

El irinotecán es un profármaco hidrosoluble semisintético de la CPT (Di Francesco y col., 2005). El irinotecán es activado metabólicamente a 7-etil-10-OH-CPT (SN38) por carboxilesterasas microsomales hepáticas (Figura 61), una mayor actividad inhibitoria sobre la TopIB purificada y sobre células tumorales humanas y murinas. El irinotecán ha sido comercializado para el tratamiento del cáncer colorectal, tanto en las terapias de primera como de segunda línea, y de otros tumores sólidos (Potmesil, 1994).



Figura 61.- Estructura del irinotecán y su metabolito activo SN38, así como el mecanismo de transformación metabólica.

1.3.2.2.1.4 Indolocarbazoles (rebecamicina y derivados)

La rebecamicina y sus derivados son producidos naturalmente por el actinomiceto *Saccharotrix aerocolonigenes* (Figura 62) (Yamashita y col., 1992). La estructura poliheterocíclica plana de los indolocarbazoles les permite intercalarse entre los pares de bases de ADN, donde finalmente se establecen los complejos ternarios junto con el ADN y la enzima (Prudhomme, 2003).



Figura 62.- Estructura del compuesto indolocarbazólico rebecamicina.

1.3.2.2.1.5 Indenoisoquinolinas

Las indenoisoquinolinas son inhibidores sintéticos que actúan capturando y estabilizando el complejo transitorio enzima-ADN (Figura 63). Algunas indenoisoquinolinas, son capaces de unirse e intercalarse dentro de la hebra de ADN, incluso en ausencia de la enzima, en contraposición a la CPT y los indolocarbazoles, que necesitan que la enzima esté activa para formar el complejo ternario (Meng y col., 2003). Las indenoisoquinolinas presentan ciertas ventajas frente a otros inhibidores de la TopIB, como una mayor estabilidad química y que no son expulsados de la célula por los transportadores ABC (Pommier y Cushman, 2009).



Figura 63.- Diferentes estructuras de indenoisoquinolinas.

Introducción

1.3.2.2.1.6 Quinonas

Dentro del grupo estarían las naftoquinonas, pigmentos naturales que aparecen mayoritariamente en plantas superiores aunque también pueden encontrarse en ciertos hongos, erizos y estrellas de mar.

El lapachol es un compuesto de origen vegetal procedente del árbol *Tabebuia avellanedae* (lapacho) originario de Brasil (Figura 64). La β -lapachona se obtiene mediante un simple tratamiento con ácido sulfúrico sobre el lapachol, o a partir del lomatiol aislado de las semillas de la *lomatia*, que crece en Australia (Figura 64). Las dos naftoquinonas tienen una amplia variedad de actividades como antitumorales, bactericidas, fungicidas, antivirales y tripanocidas (Li y col., 1993).

La β -lapachona inhibe la actividad catalítica de las TopIB interaccionando directamente con la enzima. A diferencia de la CPT y otros venenos enzimáticos, estos compuestos bloquean la formación del complejo de escisión, aunque la TopIB afectada todavía sea capaz de unirse al ADN sustrato. Sin embargo, no es la única actividad de estas moléculas, el lapachol y la β -lapachona pueden inducir la formación de ROS. La ausencia de catalasa y el bajo nivel de superóxido dismutasa en *T. cruzi* y en células tumorales, se han considerado factores propicios para explicar la citotoxicidad de estos compuestos.

Uno de los compuestos más representativos de este grupo es la una diospirina naftoquinona que se extrae de la especie *Diospyros chloroxylon* de la Familia Ebenaceae. Estructuralmente es un dímero asimétrico de la 7-metiljuglona, que forma cristales cúbicos rojo-anaranjados (Figura 64). La diospirina ha demostrado ser un inhibidor específico de la TopIB de *Leishmania* con una sensibilidad diez veces mayor en el parasito que en células de mamífero. Su mecanismo de acción consiste en estabilizar el complejo enzima-ADN, al igual que la CPT (Ray y col., 1998).



Figura 64.- Estructura del lapachol, β -lapachona y diospirina.

1.3.2.2.1.7 Ácido betulínico y derivados

Son derivados triterpenoides pentacíclicos que pueden ser aislados, a través de diferentes técnicas, de la corteza del abedul blanco y que han demostrado actividad como agentes antitumorales (Figura 65). Uno de los derivados más estudiado del ácido betulínico es el ácido dihidrobetulínico que ha demostrado actividad sobre la TopIB y TopII de *Leishmania*. A diferencia de la CPT, el ácido dihidrobetulínico no estabiliza el complejo ternario de escisión, sino que actúa sobre la enzima, evitando que se una al ADN sustrato (Chowdhury y col., 2003).



Figura 65.- Estructura del ácido dihidrobetulínico.

1.3.2.2.1.8 Berberina

La berberina es un alcaloide bencilisoquinolínico cuaternario hallado en ciertas plantas de las Familias Annonaceae, Berberidaceae y Menispermaceae, que ha demostrado su eficacia leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 66) (Merschjohann y col., 2001). Este compuesto y alguno de sus derivados se comportan como inhibidores de la TopIB dificultando el primer paso de la catálisis, en el que se produce la rotura de una de las hebras del ADN, sin intervenir en el paso de la religación (Vieira y col., 2015).



Figura 66.- Estructura química de la berberina.
1.3.2.2.1.9 Bisbencimidazoles

Los bisbencimidazoles inhiben la unión de la TopIB con el ADN, uniéndose a regiones ricas en adenina y timidina del surco menor de la doble hélice (Chen y col., 1993). Los compuestos más representativos de este grupo son el Hoechst 33342 y el Hoechst 33258 que estabilizan el complejo de escisión enzima-ADN, pero no son capaces de inhibir el ciclo catalítico de las TopII (Figura 67).

Además de la capacidad de estabilizar el complejo de escisión, el compuesto Hoechst 33342 parece inducir enlaces cruzados enzima-ADN, rupturas en las cadenas del material genético, interrupción de la fase G2 y endoduplicación cromosómica. Esta molécula muestra una gran variabilidad en sus niveles de citotoxicidad dependiendo de la especie de *Leishmania* tratada (Wilson y col., 2008).



Figura 67.- Estructura de los bisbencimidazoles Hoechst 33342 y Hoechst 33258.

1.3.2.2.1.10 Diamidinas aromáticas

De la misma manera que los derivados bisbencimidazólicos, las diamidinas aromáticas (Figura 68) se unen a regiones del ADN ricas en adenina y timidina del surco menor de la doble hélice (Johnson y col., 1998). Al unirse a estas regiones específicas, interfieren la catálisis de las Topl y ToplI pero no son capaces de estabilizar los complejos de escisión (Jean-Moreno y col., 2006).



Figura 68.- Estructura de las diamidinas aromáticas pentamidina y berenil.

1.3.2.2.1.11 Ácidos grasos acetilénicos y otros compuestos

Los derivados ramificados de los ácidos penta, hepta y octadecenoico, procedentes de esponjas del Caribe y algunos derivados acetilénicos de los ácidos heptadecanoicos e icosanoicos (Figura 69), han mostrado actividad inhibitoria frente a LdTopIB a concentraciones micromolares (Carballeira y col., 2009a; Carballeira y col., 2009b).



Figura 69.- Ácidos grasos ensayados frente a LdTopIB (Carballeira y col., 2009b).

1.4 Bioinformática

La bioinformática es la disciplina que aplica las tecnologías computacionales a la gestión y análisis de los datos biológicos, usando herramientas matemáticas para extraer información útil, o ampliar la información de los datos obtenidos mediante técnicas biológicas. El origen de la bioinformática se remonta a finales de los años 60 (Levitt, 2001). En un primer momento, la bioinformática sólo era usada por expertos en este campo, actualmente es usada por investigadores que utilizan esta herramienta para completar otros estudios. Este cambio se debe a un aumento de la accesibilidad a los programas bioinformáticos (Young, 2001).

Los principales campos de la bioinformática son: alineación de secuencias, predicción de genes, montaje de genoma, alineamiento de estructuras de proteínas, predicción de estructuras de proteínas, predicción de expresión génica, interacción proteína-proteína, modelos de evolución, modelado molecular y cribado virtual de compuestos (Kanehisa y Bork, 2003; Rollinger y col., 2008).

1.4.1 Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias tanto de ADN como de aminoácidos es una de las herramientas bioinformáticas más utilizadas. El alineamiento de secuencias cortas se puede realizar manualmente pero las secuencias más largas y complejas requieren de la aplicación de algoritmos y herramientas informáticas.

El protocolo más simple de alineamiento entre dos secuencias se conoce como *Edit distance*, y se define como el número mínimo de operaciones (inserciones, deleciones y sustituciones) necesarias para transformar una secuencia en la otra. En este proceso se define con una ecuación, que calcula los costes de todas las operaciones, de forma que el coste de un alineamiento de dos secuencias, será la suma del coste de cada operación. El alineamiento óptimo será aquel que muestre el mínimo coste entre todos los posibles (Navarro, 2001).

Existen diferentes modelos para definir la ecuación: *Hamming distance, Levenshtein distance, Unit Cost Model*. Estos modelos se clasifican generalmente en tres categorías:

- Alineamientos globales en los que se fuerza al alineamiento a ocupar la longitud total de todas las secuencias. Se usa en secuencias de tamaño similar y el algoritmo más usado se denomina Needkenab-Wunsch.
- Alineamientos locales que identifican secuencias similares dentro de secuencias largas muy divergentes entre sí. El algoritmo más característico es el Smith-Wterman.
- Métodos híbridos o semiglobales que intentan buscar el mejor alineamiento que incluya el inicio y el final de una u otra secuencia.

1.4.2 Predicción de genes

La predicción de genes es el proceso de identificación de genes y secuencia reguladoras de las secuencias de ADN, utilizando algoritmos que identifican las zonas que son biológicamente funcionales. La necesidad de esta predicción surgió con el aumento del material genético obtenido de las secuenciaciones de diversos organismos y la necesidad de identificar las regiones funcionales. Estas predicciones, en un primer momento, solo se basaban en el análisis de homología con otros genes identificados en el laboratorio; pero a medida que la información obtenida ha sido mayor, se ha conseguido identificar características comunes como señales funcionales, patrones o periodicidades (Alioto, 2012).

1.4.3 Predicción de estructuras

La diferencia entre número de secuencias de proteínas conocidas y el número de estructuras resueltas es cada vez mayor, debido al rápido ritmo al que aumentan las secuenciaciones y al bajo ritmo al que se resuelven las estructuras. La cristalografía de rayos X y la espectroscopia de RMN son los únicos métodos experimentales para resolver aproximadamente la estructura tridimensional de las proteínas. Los dos son muy laboriosos y requieren equipos muy complejos. Para paliar este desfase entre nuevas secuencias y modelos tridimensionales se ha acudido, al modelado molecular y la predicción de estructuras.

El principio en el que se basa la predicción de estructuras es que las proteínas están formadas por cadenas de aminoácidos que adoptan una única forma tridimensional activa (Anfinsen y col., 1961), lo que supone que el número de plegamientos activos que pueden adoptar sea limitado (Chothia, 1992). Se prevé que en pocos años se hayan resuelto la mayoría de estos plegamientos (Holm y Sander, 1996). En la actualidad hay dos formas de abordar la búsqueda de estructuras tridimensionales: modelos basados en plantillas, o comparativos, y modelos libres (Zhang, 2008).

Los modelos comparativos utilizan una estructura ya resulta experimentalmente como punto de partida, esta se denomina platilla. Los únicos requisitos necesarios para la creación del modelo son: conocer la secuencia de la proteína y que esta posea un mínimo de similitud no inferior al 30-40% con las platillas (Rost, 1999). Los modelos comparativos se dividen a su vez en modelos por homología y por enhebrado de proteínas:

 El modelo por homología se basa en que las estructuras tridimensionales están más conservadas que las secuencias peptídicas. De modo que, si tenemos una proteína con una estructura tridimensional desconocida y una secuencia similar a una proteína con estructura tridimensional conocida (platilla), la proteína de estructura desconocida adquirirá una distribución similar a la proteína modelo.

 El enhebrado de proteínas, se usa para proteínas que no tienen una proteína homóloga con estructura conocida. Se contrasta cada tramo de la secuencia de aminoácidos con bases de datos de estructuras conocidas, y se evalúa la compatibilidad de la secuencia y la estructura, obteniendo así posibles modelos tridimensionales. Este método también se conoce como reconocimiento de plegamiento 3D-1D (Bowie y col., 1991).

En contraposición a los métodos de predicción basados en plantillas están los métodos de modelo libre, *ab intio* o *de novo*; que tratan de construir modelos proteícos desde cero basándose en principios físicos y no en estructuras descritas (Fiser y col., 2000). Este método también se puede usar para el refinamiento de zonas, como los lazos, en los modelos generados por homología.

1.4.4 Docking

El *docking* molecular es un método utilizado para predecir la orientación preferente de una molécula con respecto a otra cuando forman un complejo estable (Jorgensen, 1991). El objetivo del *docking* es simular informáticamente el proceso de reconocimiento molecular ligando-receptor, encontrando la unión más probable, es decir, la interacción que menos energía requiera y mayor energía libre.

Hay dos grandes estrategias de docking:

- Complementariedad de forma. Se considera al ligando y a la proteína como un conjunto de rasgos que los hacen acoplables. Estos rasgos pueden ser la superficie, hidrofobicidad u otras técnicas de descripción. La complementariedad de forma permite la comparación de muchas moléculas sobre una proteína, pero durante el proceso se considera al ligando como una estructura rígida (Shoichet y col., 1992)
- Simulación. En el docking por simulación con el ligando y el receptor comienza separado por un espacio físico, el ligando encuentra su posición en el sitio activo de la proteína tras una serie de movimientos en el espacio conformacional. En cada uno de estos movimientos se calculan las energías de interacción entre el ligando y el receptor, buscado la conformación de más baja energía. Este sistema tiene la ventaja de considerar al ligando como una estructura flexible, además de ser un proceso más cercano a la realidad, pero es un sistema mucho más lento y que requiere un número mayor de cálculos. El docking por simulación es el sistema más usado (Chen, 2015).

El resultado de un docking se caracteriza por dos aspectos: El docking en sí mismo, es decir, el método seguido para muestrear el espacio conformacional del complejo

ligando-receptor; y la función de *scoring* utilizada para evaluar la afinidad de las interacciones. Las funciones *scoring* se clasifican en:

- Basadas en campos de fuerza. La afinidad se calcula mediante la suma de las interacciones electorstaticas y de van der Waals. Frecuentemente incluyen también términos empíricos como la entropía y la solvatación.
- Empíricas. Estiman la energía libre de unión como la suma ponderada de los términos derivados de las interacciones estructurales como, numero de puentes de hidrogeno, interacciones iónicas, contactos apolares, entropía, etc.
- Basadas en datos. Representan la afinidad como la suma de las interacciones de pares de átomos proteína-ligando. Estos potenciales de afinidad se obtienen a partir de complejos de estructuras conocidas del *Protein Data Bank (PDB)*, donde las distribución de probabilidad de las distintas interacciones entre diferentes pares de tipos de átomos proteína-ligando se conocen, asumiendo distribuciones energéticas de tipo Boltzmann, en funciones de potencial. La energía libre de interacción se calcula sumando las contribuciones de los pares de átomos dentro de cierta distancia.

1.5 Nuevas estrategias para el descubrimiento de fármacos antiparasitarios

Con objeto de utilizar nuevas plataformas de cribado de pequeñas moléculas bajo las premisas de miniaturización, robustez, reproducibilidad y alto rendimiento se han desarrollado modelos ajustados a formato de lectura en microplaca de 96 y 384 pocillos que permiten analizar la potencia y toxicidad de librerías de compuestos (*High Throughput Screening*: HTS).

1.5.1 Cribados basados en dianas (TBS)

El objetivo de los TBS se basa en interrumpir proteínas específicas del patógeno que: i) sean esenciales para su supervivencia; ii) estén ausentes o sean estructuralmente diferentes a las del hospedador y iii) que a pesar de no ser únicas, se expresen mayoritariamente en el parásito.

El TDR de la OMS, ofrece un banco de dianas potenciales obtenidas a partir de datos bioquímicos, genéticos y farmacológicos de varios patógenos conocidos que satisfacen las premisas anteriores de exclusividad y expresión diferencial respecto al hospedador (http://tdrtargets.org/). En los primeros puestos de esta lista se encuentran enzimas que no tienen réplica en el anfitrión y que son necesarias para la supervivencia del parásito como la tripanotión reductasa, una enzima involucrada en el mantenimiento de equilibrio redox de los tripanosomatidos (Eberle y col., 2011); la dihidrofolato reductasa, enzima necesaria para la síntesis de *novo* de purinas; la cisteín proteasa B, un factor de virulencia que es secretado por la forma amastigote en los fagolisosomas del macrófago (Caffrey y col., 2011); se incluyen también las ADN topoisomerasas, enzimas implicadas en la replicación, transcripción y recombinación del ADN, cuya estructura difiere radicalmente de la del anfitrión (Prada y col., 2013); y las tubulinas estructurales esenciales (Werbovetz, 2002).

1.5.2 Cribados basados en Fenotipo (PBS)

Los modelos de cribado PBS utilizan el patógeno completo como diana independientemente del modo de acción de las moléculas utilizadas. Para su validación, estas plataformas deben imitar lo más posible el entorno real en el que se produce la interacción con el hospedador definitivo. Los PBS diseñados para parásitos heteroxenos como *Leishmania* deben utilizar la forma parasitaria responsable de la infección en el hospedador definitivo, ya que se han demostrado variaciones de sensibilidad a fármacos dependientes de estadío (de Freitas-Junior y col., 2012). Estos resultados refuerzan el criterio de que el cribado fenotípico de parásitos intracelulares debe basarse en la forma amastigote. De acuerdo con esta premisa se han realizado cribados de miles de compuestos frente a amastigotes axénicos de *Leishmania spp.* y *T. cruzi* en ausencia de las células hospedadoras (Bustamante y col., 2011). Sin embargo, una crítica a este

modelo de estudio es que el perfil de expresión génica de los amastigotes axénicos presenta marcadas diferencias con el de los amastigotes derivados de lesión (Holzer y col., 2006). En este contexto, el uso de líneas celulares monocíticas parece ser una alternativa interesante aunque técnicamente compleja. Con este sistema se han cribado más de 300.000 moléculas pequeñas procedentes de diferentes librerías de compuestos en *L. donovani* que infectaban cultivos de leucemia monocítica humana (THP-1) mediante un sistema de detección múltiple de imágenes de microscopía confocal de alto contenido (HCS) (Siqueira-Neto y col., 2012).



Figura 70.- (A) Placa de 384 pocillos usada para el cribado de compuestos. (B) Imagen de una placa 384 pocillos, obtenida con un equipo de captación ODYSSEY[®], obtenida en un ensayo de dosis respuesta utilizando parásitos modificados genéticamente capaces de emitir en el espectro infrarrojo.

Existe un nuevo enfoque consiste en la utilización de explantes de órganos infectados por *Leishmania* en ensayos fenotípicos HTS. En estos modelos, los roedores (ratones o cricetos) están infectados experimentalmente con cepas de *Leishmania* transgénicas cuyos órganos diana – ganglios, hígado o bazo – se van a recoger una vez establecida la infección para desarrollar el explante. Los ratones BALB/c reproducen leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea aguda por *L. infantum* y *L. major*, respectivamente, debido al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa de tipo Th2. Un HTS fenotípico de 4035 compuestos basado en explantes de bazo de hámster ha sido validado por el grupo del Dr. Melby en la Universidad de Texas Medical Branch en Galveston (TX, EE.UU.). Para ello utilizaron los bazos de cricetos infectados con una cepa de *L. donovani* (luc) cultivados en un formato de placa de 96 pocillos (Osorio y col., 2011). Recientemente, este grupo ha publicado la validación de un HTS fenotípico de explante de ganglio linfático murino utilizando en este caso, una cepa de *L. major* (luc) (Peniche y col., 2014).

1.5.3 Aplicación de patógenos modificados para el cribado fenotípico de fármacos

El uso de parásitos vivos modificados genéticamente para el cribado masivo de moléculas pequeñas tiene evidentes ventajas sobre los métodos clásicos de tinción y recuento, que son muy laboriosos y lentos. Con este fin, los parásitos modificados

bioluminiscencia tienen ciertos inconvenientes con respecto a la fluorescencia: i) las proteínas bioluminiscentes necesitan la adición de un sustrato emisor de luz específico, caro y con una pobre penetración en las células diana; ii) las placas o tejidos deben fijarse con el fin de grabar la señal, que junto con su corta vida media hace que sea inservible para obtener mediciones repetidas de la misma muestra. Por su parte la fluorescencia cubre la totalidad del espectro de luz visible – incluido el infrarrojo cercano – lo que nos permiten seleccionar la longitud de onda que mejor se ajusta a nuestro modelo experimental. Además, los marcadores fluorescentes permiten usar varias proteínas simultáneamente sin interferencia entre ellas, por lo que se hace factible el estudio de diferentes interacciones moleculares y/o celulares in vitro. Sin embargo, la fluorescencia no está desprovista de inconvenientes: i) la exposición de las células a ciertas longitudes de onda de excitación puede perturbar las funciones celulares normales; ii) la baja penetrabilidad de la emisión fluorescente la hace inapropiada, al día de hoy, para los estudios in vivo con patógenos que colonicen órganos internos del animal (Tabla 4).

Proteína	color	λex	λem
GFP	verde	395 nm	504nm
EGFP	verde	488 nm	507nm
YFP	amarillo	514 nm	527 nm
Citrina	verde	516 nm	519 nm
DsRed	rojo	558 nm	583 nm
mCherry	rojo	587 nm	610 nm
tdTomato iF1.4	rojo	554 nm	581 nm
	infrarrojo	683 nm	708 nm
iFRP	infrarrojo		

Tabla 4 Proteínas fluorescentes usa	adas en estudios fenotípicos H	ITS (Calvo-Álvarez	y col., 2015)
-------------------------------------	--------------------------------	--------------------	---------------

1.5.4 El uso de tripanosomátidos fluorescentes en HTS

Los patógenos modificados genéticamente con reporteros fluorescentes se han convertido en una herramienta útil y versátil en el descubrimiento de nuevas moléculas en HTS fenotípicos. Como dijimos anteriormente, la selección de la plataforma HTS tiene como objetivo dirigirse específicamente a la etapa intracelular de estos parásitos que es la realmente lesiva para el hospedador. A pesar de esto, y probablemente debido a las dificultades encontradas en el manejo de estas formas intracelulares en su forma axénica, los investigadores se han centrado en estudiar la etapa de promastigote. La alternativa más interesante a las dos anteriores son las infecciones experimentales ya sea realizadas in vitro en una línea celular o ya sea ex vivo a partir de explantes cultivados procedentes de un órgano infectado de forma natural. Hay muchos factores que deben tenerse en cuenta al diseñar un HTS de patógenos intracelulares: i) la tasa de infección disminuye gradualmente con el tiempo como resultado de la replicación del parásito en los fagolisosomas de los macrófagos; ii) los fármacos deben mantenerse en

el medio de cultivo el tiempo suficiente para asegurar su eficacia; iii) la posibilidad de monitorear el estado del cultivo a diferentes tiempos sin perturbar su crecimiento. Todos estos puntos los satisfacen los patógenos modificados con proteínas fluorescentes ya que pueden obtenerse imágenes de los mismos a diferentes tiempos sin la necesidad de proceder a su fijación – proceso irreversible que acaba con la viabilidad del cultivo. La Tabla 5 muestra diferentes estudios en los que se han utilizado parásitos fluorescentes y luminiscentes para cribar moléculas pequeñas.

Especie	Forma	gen	Expresión	Aplicación	
Leishmania					
L. donovani	Promast.	gfp	Integrativo Episomal	HTS	
	Promast.	luc	Episomal	HTS	
	Promast.	luc	Episomal	HTS	
	Promast.	luc	Integrativo Episomal	Infección in vivo	
L. major	Promast.	luc	Integrativo Episomal	Infección in vivo	
	Amast.	gfp	Integrativo	Infección in vivo	
	Promast.	mcherry	Integrativo	Vacuna	
	Amast.	ifp1.4	Integrativo	HTS	
L. mexicana	Amast.	gfp	Integrativo	Infección in vivo	
L. amazonensis	Amast.	luc	Integrativo	Cribado	
	Promast.	gfp	Episomal	Cribado	
	Promast.	gfp/rfp	Integrativo	Cribado	
Trypanosoma					
T. brucei	Trypomast.	egfp ecfp eyfp mrfp1	Integrativo	Parasitemia	
	Trypomast.	egfp/rfp	Integrativo	Insectos	
	Trypomast.	gfp mrfp1	Integrativo	Intercambio génico	
T. cruzi	Epimast.	gfp/DsRed	Integrativo Episomal	Ciclo	
	Epimast.	gfp/rfp	Integrativo	Parásito/ hospedador	

Tabla 5.- Estudios realizados usando tritryps fluorescentes o luminiscentes (Calvo-Álvarez y col., 2015).

Los primeros resultados obtenidos comparando amastigotes axénicos con intracelulares fueron obtenidos por el grupo Canadiense del Centre for Host-Parasite Interactions (CHPI) de la Universidad de Laval, Quebec (Canadá). En estos trabajos pioneros se evaluó la actividad leishmanicida de dos agentes antimicrobianos de uso clínico – Pentamidina[®] y Glucantime[®] – en una cepa transfectada de *Leishmania spp*. con la luciferasa de luciérnaga (luc). Papadopoulou y colaboradores llegaron a la conclusión de que los amastigotes intramacrofágicos eran más sensibles a los dos fármacos que los axénicos. Por su lado Lang y colaboradores demostraron resultados semejantes cuando se evaluaron varios derivados quinolínicos en amastigotes de *L. amazonensis* (luc) que infectaban macrófagos murinos de médula ósea. Un estudio realizado con posterioridad con aislados clínicos de *L. donovani* resistentes a antimoniales se transfectaron con GFP y sirvieron para infectar macrófagos murinos J744A.1. Los amastigotes resultantes mostraron sensibilidad a miltefosina, pentamidina,

paromomicina y anfotericina B, pero conservaron la resistencia a los antimoniales después de la manipulación genética. Se ha demostrado la idoneidad de una cepa transgénica de *L. infantum* (mCherry) como plataforma de cribado de fármacos en amastigotes intracelulares. Esta cepa ha demostrado una sensibilidad semejante a la salvaje con fármacos de uso clínico frente a leishmaniasis visceral como la anfotericina B, paromomicina y miltefosina (Calvo-Álvarez y col., 2015).

Una crítica frecuente al uso de infecciones *in vitro* es la escasa semejanza en el modo en que estas llegan a ser infectadas comparado con el proceso natural. Los sistemas HTS deben imitar al máximo esas condiciones o sino tomarlas prestadas de la misma naturaleza. Los cultivos de explantes orgánicos procedentes de roedores infectados experimentalmente con patógenos fluorescentes o luminiscentes se presenta como una interesante alternativa. Este método tiene además la ventaja de incluir el repertorio completo de células del sistema inmunitario que cohabitan en el sitio de la infección.



2 Objetivos

Se establecen como objetivos a alcanzar en el presente trabajo:

- Determinar el potencial terapéutico de dos series de compuestos lignánicos, derivados de la podofilotoxina, y del aldehído podofílico, y de dos tipos de terpenil-quinonas (hidroquinónicos), en la lucha contra en la lucha las leishmaniosis producidas por *L. major* y *L. infantum*; utilizando para la evaluación de su actividad *in vitro*, parásitos modificados genéticamente, capaces de expresar una proteína fluorescente infrarroja.
- 2. Establecer el efecto de los lignanos derivados de la podofilotoxina y del aldehído podofílico sobre la polimerización de la tubulina purificada de *Leishmania,* como diana de esta familia de compuestos.
- 3. Realizar un estudio teórico del lugar de unión de la colchicina en la tubulina de *Leishmania*, analizando los polimorfismos existentes en la misma tras la comparación con la enzima de mamífero, y estudiar los complejos de interacción lignano-tubulina.
- 4. Establecer el efecto de los derivados lignánicos y quinónicos sobre la ADN topoisomerasa IB purificada de *Leishmania*.
- 5. Relacionar la estructura y la funcionalidad química de las distintas series de compuestos con su actividad antiparasitaria y con su interacción con las dianas correspondientes.

M_{aterial y métodos}

3 Material y métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Cepa bacteriana

La cepa utilizada para los experimentos de transformación y amplificación de plásmidos fue *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) (Clontech Laboratories, Inc.; Palo Alto, CA. EEUU).

DH5 α : deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺) relA1 supE44 thi-1 Δ (lacZYA-argFSV169) f80 δ lacZDM15 F λ^{-}

3.1.2 Cepa de Levadura

Para la expresión y purificación de LdTopIB, se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EKY3. Cedida amablemente por la Dra. Mary A. Bjornsti (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, EE. UU.). Dicha cepa es deficiente en TopIB, permitiendo la purificación de la proteína del parásito sin contaminación por proteína endógena de levadura.

ΕΚΥ3: ΜΑΤα, *ura*3-52, *his*3Δ200, *leu*2Δ1, *trp*1Δ63, *top*1: :TRP1

3.1.3 Cepas de Leishmania

3.1.3.1 Promastigotes

En este estudio se han utilizado dos cepas de *Leishmania, Leishmania major LV39c5*, cedida por Dr. Stephen Beverley de Washington University School of Medicine y *Leishmania infantum BCN-150* cedida por el Dr. Jose Mª. Requena, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

3.1.3.2 Promastigotes que sobrexpresan la proteína infrarroja fluorescente (IRFP: Infrared Fluorescent Protein):

En el presente trabajo se utilizaron cepas de *L. major LV39c5* y *L. infantum* BCN-150, modificadas genéticamente en el laboratorio, mediante transfecciones estables con el vector pLEXSY-hyg2 (Jena Bioscience, Germany), fusionado a la proteína IRFP y la 3' región UTR de la histona Hsp70 de *Leishmania*, la cual aumenta la expresión de las proteínas situadas corriente arriba de la misma. La construcción del plásmido (pLEXY-IRFP.70) y la transformación de las cepas salvajes, fueron realizadas previamente en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de León por la Dra. Estefanía Calvo Álvarez bajo la supervisión de la Dra. Rosa Mª Reguera.

El gen codificante para la proteína fluorescente infrarroja IRFP, fue amablemente cedido por el Dr. Roger Y Tsien del Departamento de Farmacología de la Universidad de

California (UCSD) EEUU. El vector plasmídico de expresión en *Leishmania* pLEXSY-hyg2 fue adquirido a Jena Bioscience.

El método elegido para introducir el ADN exógeno en los promastigotes de *Leishmania* fue la electroporación. El protocolo seguido fue básicamente el publicado por LeBowitz (1994) y se describe a continuación:

Partimos de 20 mL de cultivo con una densidad de 1×10^6 parásitos/mL por cada transformación que se desea realizar, y cuando este alcanzó una densidad de 5×10^6 parásitos/mL, se eliminó el medio de cultivo mediante centrifugación a 3.000 g durante 10 min a 4 °C. Seguidamente los promastigotes se lavaron con disolución de electroporación fría (CYTOMIX), y se resuspendieron en 0,5 mL de CYTOMIX, colocándose junto con el ADN en cubetas de electroporación estériles y refrigeradas de 0,4 mm (Bio-Rad). Para el ensayo se utilizó 10 µg de ADN plasmídico (pLEXSY-IRFP.70), linearizado previamente con la enzima de restricción Swa I.

La electroporación se llevó a cabo utilizando el electroporador "Gene Pulser[®] II" con "Capacitance Extender Plus" (Bio-Rad). Los parámetros empleados fueron de 1500 V/cm (450 V en una cubeta de 0,4 mm) y 500 µF de capacitancia.

Tras aplicar el pulso eléctrico, el contenido de las cubetas se transfirió a frascos de cultivo celular estériles, que contenían 10 mL de medio M199 1X, los cuales se incubaron hasta el día siguiente a 26 °C, para su completa recuperación tras el choque eléctrico y la expresión de los genes reporteros presentes en los plásmidos transfectados.

Tras este periodo los promastigotes se recogieron mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, y se sembraron en placas de medio M199 con 30 μ g/mL de higromicina (marcador de selección presente en pLEXSY-hyg2).

CYTOMIX: KCl 120 mM, CaCl₂ 0,15 mM, K_2 HPO₄ 10 mM, HEPES 25 mM, EDTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM.

3.1.4 Línea celular HepG2

La línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2 (Knowles y col., 1980), fue cedida por el profesor José Luis Mauriz del Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Universidad de León.

3.1.5 Ratones

Se utilizaron dos líneas genéticas estandarizadas de ratones (*Mus musculus*): Swiss Webster (CFW[®]) y BALB/c. Los animales se mantuvieron en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León, hasta que fueron empleados para los diferentes experimentos y se trataron según la legislación española (Ley 32/2007) y la legislación de

la Unión Europea (2010/63/UE). Los protocolos usados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de León.

Los **ratones Swiss Webster (CFW®)** con genotipo silvestre, se utilizaron en los experimentos que requerían la obtención de macrófagos intraperitoneales.

Los **ratones BALB/c** tienen una mutación en el gen *Slc11a1*, que promueve una respuesta inmunitaria de tipo Th2, lo que aumenta las susceptibilidad a las infecciones por patógenos (Nieto y col., 2011). Estos ratones se utilizaron para generar infecciones experimentales *in vivo*, a partir de los cuales se obtuvieron explantes esplénicos.

3.2 Vectores

3.2.1 pLEXSY-hyg2

El plásmido pLEXSY-hyg2 (Figura 71) (Jena Bioscience) tiene un tamaño de 9133 pb y ha sido diseñado para conseguir una expresión constitutiva de proteínas en *Leishmania*, tras su integración en el locus del ARN ribosómico 18S (ssu), haciendo así uso del alto nivel de transcripción de la ARN-polimerasa. Flanqueando los lugares de inserción de las proteínas a expresar contiene regiones no traducidas, que proporcionan las señales necesarias para el procesamiento post-transcripcional del ARN mensajero. Además, contiene el gen de resistencia a ampicilina, para realizar el clonado y la selección bacteriana, y el gen de resistencia a higromicina (hyg), para la selección de transformantes en *Leishmania*.



Figura 71.- Mapa del vector plasmídico LEXSY-hyg2.

Este vector fue la base para la generación de la cepa de *Leishmania* modificada genéticamente, capaz de expresar la proteína fluorescente infrarroja (IRFP), una vez generada la construcción pLEXSY-hyg2- IRFP.70 (Calvo-Álvarez y col., 2015).

3.2.2 pESC-URA

El vector pESC-URA (Figura 72) (Agilent Technologies), que está diseñado para servir de plataforma para la expresión de proteínas eucariotas en *S. cerevisiae*, es un vector biscistronico que permite la expresión simultánea de dos genes. Esta es una propiedad que lo convierte en una herramienta especialmente útil para la expresión de la LdTopIB. Por ello se generó el plásmido pESC-URA TopIB, resultado de la fusión a pESC-URA de los dos genes que codifican la producción las subunidades de la Top IB de *Leishmania* (Villa y col., 2003).



Figura 72.- Mapa del vector plasmídico pESC-URA.

3.3 Medios de cultivo

3.3.1 Medio SOC

El SOC es un medio de cultivo utilizado para el crecimiento y mantenimiento de *E. coli* (Inoue y col., 1990). Se preparó disolviendo 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura (Pronadisa Hispanlab) y 0,5 g de NaCl en 1 L de H₂O _{dd}, con un pH final de 7,0. Para su uso como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro de medio. Finalmente se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 °C, e inmediatamente antes de ser utilizado, se añadieron 5 mL de MgCl₂ 2M y 20 mL de D-glucosa 1M, ambas disoluciones estériles.

3.3.2 Medio YPD

YPD (Yeast Peptone Destrose) es el medio de cultivo usado para el crecimiento de las levaduras. Se preparó disolviendo 20 g de extracto de levadura y 10 g de bactopeptona (Oxoid LTD) en 900 mL de H₂O _{dd}, la mezcla se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 °C. Antes de su uso, se añadió glucosa hasta alcanzar una concentración final del 2% (p/v).

3.3.3 Medio S.C. ura-

El medio S.C ura- (*Synthetic complete*) se usó para la selección de levaduras que habían reparado la auxotrofia para uracilo tras la transformación con el plásmido pESC-URA TopIB.

El medio se preparó disolviendo 1,7 g de medio para levadura sin aminoácidos ni $(NH_4)SO_4$ (Sigma-Aldrich), 5 g de $(NH_4)SO_4$ (Fisher Scientific), 0,72 g de una mezcla de aminoácidos sin uracilo y 2 mL de NaOH 1N en 898 mL de H₂O _{dd}. Tras el proceso de esterilización en autoclave durante 20 min a 120 °C, se añadieron 100 mL de la disolución del azúcar requerido al 20% (p/v).

Cuando se utilizó como medio sólido se añadió agar al 2%.

3.3.4 Medio M199

Medio de cultivo básico para el crecimiento de promastigotes *de Leishmania spp*. La preparación de este medio para las distintas especies, se realizó a partir de un stock concentrado 5X. Dicho stock se obtuvo disolviendo 53,15 g de medio de cultivo M199 (Sigma-Aldrich) en 1 L de H₂O _{dd}, HEPES (Sigma-Aldrich) 25 mM y NaHCO₃ 20,83 mM. El pH se ajustó a 7 y finalmente se esterilizó a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro (Fisher Scientific).

Para el crecimiento de promastigotes de *L. major* se diluyeron 100 mL de medio M199 5X en 400 mL de H₂O _{dd} estéril. Esta disolución se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 40 mM HEPES pH: 7,4, 0,1 mM adenina, 0,0005% (p/v) hemina, 0,0001% (p/v) biotina, 2 ng/mL de biopterina, 100 µg/mL de penicilina (Sigma-Aldrich) y 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich).

Para el crecimiento de promastigotes de *L. infantum* se diluyeron 100 mL de medio M199 5X en 400 mL de H₂O _{dd} estéril. Esta disolución se suplementó con el 10% (v/v) de FBS, 40 mM HEPES pH: 6,9, 2 mM de glutamina, mezcla de vitaminas (Sigma-Aldrich), 0,1 µg/mL de ácido fólico y 0,25 mM de adenosina, 0,00025% (p/v) hemina, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

3.3.5 Medio Schneider

El medio Schneider fue utilizado en el crecimiento de cultivos de promastigotes destinados a la infección de ratones, debido a su mayor rendimiento de biomasa. Para su preparación, se diluyeron 24,35 g de Schneider's insect Medium (Sigma-Aldrich) y 0,4 g de NaHCO₃ en 800 mL de H₂O _{dd}. Tras su disolución, se ajustó el pH: 9,2 usando NaOH, transcurridos 10 min en agitación el pH se ajustó a 6,7 usando HCl (Merck). Posteriormente se añadieron 50 mL de una disolución 0,11 M de CaCl₂, poco a poco para evitar la precipitación del medio. A continuación se ajustó el pH: 7,2 y se esterilizó por

filtración en membranas de 0,22 μ m de diámetro de poro. Finalmente se añadió FBS al 20% (v/v), 100 μ g/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina.

3.3.6 Medio RPMI

Se usó para el mantenimiento de macrófagos peritoneales de ratón y esplenocitos. El medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) a pH: 7,2 se preparó siguiendo las indicaciones del proveedor y se suplementó con FBS al 10% (v/v), 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich), 24 mM de NaHCO₃ (Fisher Scientific), 25 mM de HEPES, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

En el caso de cultivo de esplenocitos procedentes de ratones infectados, el medio fue suplementado con FBS al 20% (v/v).

3.3.7 Medios MEM y DMEN Glutmax

Para el crecimiento de la línea celular HepG2 se necesita un medio suplementeado con L-glutamina y glucosa. Se usaron dos medios con estas características: El medio DMEN Glutmax (Gibco[®]) y medio MEM (Gibco[®]) suplementado con glucosa 1 g/L, piruvato 1 mM. A los dos medios se le añadió FBS hasta alcanzar una concentración del 10% (v/v), 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina

El medio DMEN Glutmax se utilizó para el crecimiento inicial de las células, tras su descongelación, y el medio MEM para los ensayos y el mantenimiento de la línea celular.

3.4 Mantenimiento de microorganismos

3.4.1 Bacterias y levaduras

Las cepas bacterianas y de levaduras, se mantuvieron a 4 °C en su correspondiente medio sólido, o congeladas a -80 °C tras ser resuspendidas en su correspondiente medio liquido (SOC para las bacterias y S.C. ura- o YPD para las levaduras) suplementado con DMSO 10% (v/v).

3.4.2 Promastigotes de Leishmania spp

El almacenamiento de las diferentes cepas de *Leishmania* se realizó en N₂ líquido. Para ello se resuspendieron 10^6 células/mL en M199 suplementado con DMSO al 10% (v/v), FBS al 20% (v/v) en ausencia de HEPES y antibiótico.

3.4.3 HepG2

Siguiendo las recomendaciones de la ATCC estas células se almacenaron en N₂ líquido a una concentración de 10^6 células/mL en medio MEM suplementado con DMSO al 5% (v/v).

3.5 Determinación de la citotoxicidad y la selectividad

La citotoxicidad de los compuestos se determinó *in vitro*, midiendo la viabilidad de los distintos cultivos en presencia de concentraciones crecientes de cada compuesto. La concentración inhibitoria (CI₅₀) se obtuvo, como la concentración capaz de reducir la viabilidad celular en un 50% respecto al control tratado con el vehículo. Tras calcular la CI₅₀ de los diferentes compuestos estudiados, tanto en promastigotes de las dos especies de *Leishmania*, como en macrófagos peritoneales murinos y explantes esplénicos obtenidos de ratones no infectados, se calculó el índice de selectividad (IS) como el cociente entre la CI₅₀ de un determinado compuesto en macrófagos o esplenocitos y la CI₅₀ en promastigotes después de 48 horas de exposición. También se calculó la CI₅₀ de los compuestos en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2.

3.5.1 Calculo de Cl₅₀ en cepas de *Leishmania* que sobreexpresan IRFP.70

3.5.1.1 Ensayo dosis respuesta en promastigotes modificados con la proteína IRFP.70

Las cepas *L. major* y *L.infantum* modificadas genéticamente y que sobreexpresan la proteína infrarroja IRFP se subcultivaron a una densidad de 10^6 células/mL. Estos cultivos se dispusieron en placas de 96 pocillos negras con fondo transparente (Nunc, Fisher Sci), alícuotados en volúmenes de 200 µL por pocillo, y se enfrentaron a diferentes concentraciones de cada compuesto incubándose a 26 °C. Los compuestos estudiados se encontraban disueltos en DMSO (Sigma-Aldrich), y siempre se añadió un volumen constante de 2 µL de una disolución preparada inmediatamente antes de su adición a los pocillos. Después de 48 horas se efectuó la lectura de la señal infrarroja emitida (708 nm) por los cultivos, procedente de las células viables, en un equipo de captación de imagen ODYSSEY® (Li-Cor). Los datos obtenidos se procesaron mediante un ajuste de curvas no lineal con el programa SigmaPlot 10.0®.

3.5.2 Calculo de Cl₅₀ en células de mamífero

Para determinar la viabilidad en macrófagos murinos, esplenocitos obtenidos de ratones no infectados y células HepG2, se usó la tinción vital Azul Alamar (CellTiter-Blue®Cell viality assay; Promega Biotech), que contiene Resazurin (10-óxido de 7-hidroxi-3-oxo-3H-fenoxaz-10-inio). Las células expuestas a las distintas concentraciones de compuesto se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y con un 20% (v/v) de azul alamar. El tiempo de incubación, permite a las células, reducir este compuesto a resofurin, que emite fluorescencia a 290 nm. La conversión de resazurin en resofurin es proporcional a la actividad metabólica de las células, y por tanto, al número de células viables en el cultivo. Transcurrido el tiempo de exposición, se midió la señal emitida con un lector multimodal de placas Synergy HT. Los datos obtenidos se procesaron mediante un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot 10.0[®].

3.6 Extracción de macrófagos peritoneales

Para la extracción de macrófagos, se utilizaron ratones Swiss de entre 8 y 10 semanas, adquiridos en el animalario de la Universidad de León. 24-48 horas antes de la extracción, se les inyectó intraperitonealmente 1 mL de una disolución estéril de almidón (Sigma-Aldrich) al 2% (p/v) en H₂O _{dd}. Tras el sacrificio, los macrófagos se extrajeron mediante doble lavado intraperitoneal con 10 mL de medio RPMI no suplementado y refrigerado. Los macrófagos recuperados se centrifugaron a 1.400 rpm durante 14 min en una centrífuga Eppendorf 5702R (Rotor: A-4-38) y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con FBS al 10% (p/v) precalentado a 37 °C. Tras su recuento en una cámara de Neubauer (Zuzi), se sembraron en placas de 96 pocillos (Nunc, Fisher Sci.) a una densidad de 20.000 células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% Antes de añadir los compuestos a testar, se incubaron durante 24 horas para permitir su perfecta adhesión a la placa. Pasado este tiempo, las células fueron enfrentadas a distintas concentraciones de cada compuesto durante un periodo de 48 h.

3.7 Obtención de explantes esplénicos de ratón

Los cultivos primarios de células esplénicas se obtuvieron de ratones BALB/c de 8 a 10 semanas, adquiridos en el animalario de la Universidad de León. Los animales fueron sacrificados y a continuación se les extrajo asépticamente el bazo. Para obtener la suspensión de células individuales se pasó el bazo suavemente a través de un filtro de nylon de 100 μ M (Fisherbrand) ayudándonos con PBS. Éste se lavó dos veces por centrifugación a 500 g durante 7 min a 4 °C y se resuspendió en medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con FBS al 5% (v/v), 1 mM piruvato sódico (Gibco), 1X MEM mezcla de aminoácidos (Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES, 100 μ g/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Tras el recuento celular en una cámara de Neubauer, los esplenocitos se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5x10⁵ células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Al igual que con los macrófagos peritoneales, antes de añadir los compuestos a testar, se incubaron durante 24 horas para permitir su perfecta adhesión a la placa. Pasado este tiempo, las células fueron enfrentadas a distintas concentraciones de cada compuesto durante un periodo de 48 h.

3.8 Calculo de Cl₅₀ en amastigotes de *Leishmania*

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos en amastigotes, se obtuvieron explantes esplénicos de ratones infectados experimentalmente con *L. infantum* IRFP.70. Para ello se aplicó el procedimiento ya descrito para la obtención de explantes esplénicos, utilizando ratones infectados. Las células esplénicas se sembraron en placas de 384 pocillos negras con fondo transparente (Nuc[™], thermoscientific), de modo que

cada pocillo tuviera un volumen constante en 50 μ L y una emisión de fluorescencia de 2x10⁵ UA en un equipo de captación de imagen ODYSSEY[®] (Calvo-Álvarez y col., 2015).

Los esplenocitos infectados con los amastigotes se expusieron a distintas concentraciones de compuesto añadiendo un volumen fijo de 50 µL, y se midió la emisión de fluorescencia infrarroja a lo largo del tiempo. Como control positivo se empleó anfotericina B (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,2 mM y DMSO al 1% como control negativo, por ser el vehículo de los distintos compuestos. Los datos obtenidos se midieron mediante un ajuste de curva no lineal con el programa SigmaPlot[®].

3.8.1 Infecciones experimentales

Las infecciones experimentales para reproducir una leishmaniosis visceral por *L. infantum* IRFP.70 se realizaron en ratones BALB/c. Los promastigotes recuperados de otras infecciones experimentales se cultivaron en medio Schneider durante 3-4 días a 26 °C y agitación hasta alcanzar la fase estacionaria (300x10⁶ cel/mL). Posteriormente se lavaron dos veces con PBS recogiendo las células por centrifugación a 4.400 rpm durante 15 min en una centrifuga Eppendorf 5702. Para la infección, los parásitos se resuspendieron en PBS y se inocularon intraperitonealmente a razón de 10⁶ parásitos por animal usando jeringuillas de 1 mL (Terumo) con una aguja de 23G (Terumo). Antes de la inyección los ratones se anestesiaron con isoflurano.

3.9 Purificación de la Tubulina de Leishmania

El efecto de los diferentes compuestos sobre la polimerización de la tubulina de *Leishmania* se determinó sobre proteína purificada a partir de cultivos de promastigotes, utilizando una modificación de un protocolo previamente establecido (Werbovetz y col., 1999).

Se partió de 2 L de cultivo de promastigotes de *L.infantum*, sembrados a una concentración de 10⁶ células/mL en medio M199. Este cultivo se incubó en agitación a 26 °C hasta alcanzar una concentración de 10⁹ células/mL. Las células se recogieron mediante centrifugación a 5.000 rpm en una centrífuga Sorvall RC5B plus (Rotor: 1391 GSA) durante 15 min, y se realizaron dos lavados con PBS a 4 °C. El precipitado obtenido se guardó a -80 °C para su uso posterior. Estas células se resuspendieron en 10 mL del tampón PME con inhibidores de proteasas, y se lisaron en hielo con un sonicador IKASONIC U50, mediante 5 ciclos de 5 pulsos de 30 segundos cada uno, con sus correspondientes paradas de igual duración.

El lisado obtenido se incubó en hielo durante 30 min y se ultracentrifugó a 33.000 rpm en una centrífuga Beckman Optima XL 100K (Rotor: 70.1 Ti), durante 45 min a 4 °C. De la ultracentrifugación se recuperó el sobrenadante que se filtró con lana de vidrio a 4

°C. El paso por lana de vidrio permite retirar la capa de lípidos que se forma en el sobrenadante.

La purificación de la tubulina se realizó con una columna DEAE-Sepharosa Fast Flow (GE- Healthcare) de 6 mL equilibrada previamente con 26 mL del tampón PME. Por ella se eluyó el clarificado obtenido tras el paso por lana de vidrio y se procedió a realizar un lavado con 2 volúmenes de columna de tampón PME+P, seguido de un lavado con 4 volúmenes de columna de tampón PME+P, 0,1 M KCl y 0,25 M glutamato pH: 6,9. Finalmente se procedió a eluir la proteína con 2 volúmenes de columna de tampón PME+P, 0,3 M KCl y 0,75 M glutamato pH: 6,9, recogiéndose fracciones de 1,5 mL, que se guardaron a 4 °C.

Se seleccionaron las fracciones con mayor concentración de proteína y se dializaron con una membrana de 10 kDa (Fisher Scientific), frente a una disolución de PME y 50% de glicerol. Con este paso se consigue eliminar el exceso de sales presentes en las fracciones y reducir su volumen. Como en todos los pasos anteriores, la diálisis se realizó a una temperatura de 4 °C. La tubulina purificada se cuantificó mediante Bradford (1976) y alicuotó en fracciones a -80 °C.

Tampón PME: 0,1 M de Pipes (Sigma-Aldrich) pH: 6,9; 1 mM de MgCl₂ (Sigma-Aldrich) y 1 mM de EGTA ("ethylene glycol tetraacetic acid") (Sigma-Aldrich).

Tampón PME+P: Buffer PME suplementado con inhibidores de proteasas: *"Protease inhibitor Cocktail Tablets"* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.10 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para el análisis de la proteína purificada se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) (Shapiro y col., 1967; Laemmli y col., 1970).

3.10.1 Preparación del gel

El gel consta de dos partes diferenciadas, una concentradora, con un diámetro de poro grande que permite la concentración de la muestra; y una segunda parte separadora de un diámetro de poro menor, que facilita la separación de las diferentes partes de la muestra.

3.10.1.1 Preparación del gel separador

Las concentraciones necesarias para preparar el gel separador variarán en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, según muestran en la Tabla 6.

Antes de añadir el persulfato amónico y el TEMED la mezcla se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 10 min. La mezcla se dejó polimerizando de 20 a 30 min a temperatura ambiente.

	10%	12%	15%
H ₂ O _{dd}	4 mL	3,3 mL	2,3 mL
30% acrilamida/bisacrilamida	3,3 mL	4 mL	5 mL
1,5 M Tris-HCl pH: 8,8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
10% SDS	100 μL	100 μL	100 μL
10% persulfato amónico	100 μL	100 μL	100 μL
TEMED	4 μL	4 μL	4 μL

Tabla 6.- Concentraciones para preparación de 10 mL de gel separador (Harlow and Lane 1988(Wright, 1989).

3.10.1.2 Preparación del gel concentrador

Este se preparó con: 6,1 mL de H₂O _{dd}; 2,5 mL de Tris-HCl pH: 6,8; 1,3 mL mezcla de acrilamida/bisacrilamida y 100 μ L de SDS al 10% (p/v). Tras desgasificar la muestra en un baño de ultrasonidos durante 10 min, se añadieron 50 μ L de persulfato amónico al 10% (p/v) y 10 μ L de TEMED. La mezcla se dejó polimerizar durante 15 min.

3.10.2 Preparación de la muestra

Las muestras se mezclaron con ½ de volumen de tampón de carga y se hirvieron durante 5 min, tras lo cual se procedió a cargarlas en los pocillos del gel concentrador.

El marcador de peso molecular fue adquirido en Bio-Rad e incluye las proteínas: fosforilasa b (101 kDa), BSA (87 kDa), ovoalbumina (52 kDa), anhidrasa carbonica (35 kDa), inhibidor de la tripsina de soja (27 kDa) y lisozima (19 kDa) (Figura 73).



Figura 73.- Marcador de pesos moleculares en un gel SDS-PAGE al 12% (Bio-Rad).

Tampón de Carga: 4,8 mL de H₂O _{dd}; 0,5 mL de azul de bromofenol al 0,05% (p/v); 1 mL de glicerol; 0,5mL de β-mercaptoetanol; 2mL de SDS al 10% (p/v) y 1,2mL de Tris-HCl 0,5M pH: 6,8

3.10.3 Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta "Mini-Protean II" (Bio-Rad) con tampón de electroforesis. Se aplicó una diferencia de potencial de 8 V/cm hasta que el frente penetró en el gel separador, posteriormente se incrementó hasta 15 V/cm que se mantuvo hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel separador.

Tampón de electroforesis: 14,42 g de glicina; 1 g de SDS; 3,03 g de Tris y H_2O_{dd} hasta completar 1 L.

3.11 Tinción con Azul de Coomassie

La tinción de las proteínas presentes en los geles SDS-PAGE se realizó con azul brillante de Coomassie R250 (Bio-Rad)(Meyer y Lamberts, 1965). Para ello, se colocó el gel en una cubeta, cubierto con suficiente disolución de teñido y se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación lenta durante 30 min. Transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de tinte mediante dos lavados de 15 min con disolución de desteñido.

Disolución de teñido: 100 mL de ácido acético glacial; 50 mL de H_2O_{dd} ; 0,5 g de azul brillante de Coomassie R250; 450 mL de metanol.

Disolución de desteñido: 70 mL de ácido acético glacial; 730 mL de H_2O_{dd} ; 200 mL de metanol.

3.12 Transferencia de Western

La técnica de Western permite la transferencia de las proteínas presentes en un gel a una membrana (Towbin y col., 1979; Burnette, 1981).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon-FL (Millipore[™]), mediante una unidad de transferencia (Mini Trans-Blot[®] Cell Bio-Rad). En primer lugar la membrana se equilibró en metanol durante 15 segundos y posteriormente se colocó en buffer de transferencia, al igual que cuatro láminas de papel Whatman 3MM. Posteriormente se colocaron desde el cátodo hasta el ánodo de la siguiente forma: primero una esponja, dos láminas de papel Whatman 3MM, la membrana de transferencia, el gel de poliacrilamida, dos láminas de papel Whatman 3MM y finalmente otra esponja.

La transferencia se realizó aplicando una diferencia de potencial de 12V durante toda la noche. Para evitar el sobrecalentamiento del equipo la trasferencia se realizó a 4 °C.

Disolución de Transferencia: 25 mM Tris; 90 mM glicina; 20% metanol (v/v).

3.12.1 Inmunodetección de proteínas fijadas a una membrana

Las proteínas fijadas a membrana, pueden ser identificadas mediante hibridación con anticuerpos primarios dirigidos específicamente contra esa proteína. Una segunda hibridación con anticuerpos secundarios marcados permite la detección.

En primer lugar la membrana se lavó con PBS durante 15 min, para eliminar los restos de metanol procedentes de la disolución de transferencia. Posteriormente se incubó durante 2 horas en la disolución de bloqueo carente de tween-20 a temperatura ambiente, para neutralizar los sitios de unión inespecíficos. Transcurrido este tiempo, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en 10 mL de la disolución de bloqueo, junto con un título adecuado del anticuerpo primario y 0,1% (v/v) de Tween-20. Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con un exceso de disolución de lavado durante 5 min y se procedió a añadir el anticuerpo secundario unido a un fluorocromo con emisión dentro del infrarrojo (IRDye®800), disuelto en disolución de bloqueo y 0,1% (v/v) Tween-20. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 30 min, tras la cual se realizaron tres lavados de 5 min con un exceso de disolución de lavado a temperatura ambiente y en oscuridad. La detección de la radiación infrarroja emitida por el anticuerpo secundario se realizó en un equipo de captación imágenes ODYSSEY[®].

Disolución de Bloqueo: PBS + 0,1% (v/v) caseína

Disolución de lavado: PBS + 0,1% (v/v) Tween-20

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el Kit "Protein Assay" (Bio-Rad). La recta de calibrado se estableció utilizando albúmina de suero bovino (Sigma) como patrón.

3.13 Medida de la polimerización de la tubulina de Leishmania

Con el fin de conocer como afectaban los distintos compuestos a la polimerización de la tubulina de *Leishmania*, se realizaran ensayos *in vitro* en presencia de dichos compuestos. Para ello se emplearon 37 μ L de enzima purificada a una concentración de 1,2 mg/mL. Las reacciones se realizaron en placas negras de 324 pocillos con fondo transparente, donde se colocaron los 37 μ L anteriormente mencionados y los diferentes concentración se dispararon añadiendo 2 μ L de GTP 40 mM 37 °C durante 45 min. A partir de este momento se midió la absorbancia a 450 nm o 350 nm, dependiendo del rango de emisión de cada compuesto, a intervalos de 1 min en un lector multimodal de placas Synergy HT.

Paralelamente se valoró el fondo de emisión de cada ensayo colocando 37 μ L de enzima, 1 μ L de cada compuesto en ausencia de GTP. Como control positivo se usó vinblastina (Sigma-Aldrich) y como control negativo el vehículo de los compuestos, en este caso DSMO.

3.14 Purificación de ADN-topoisomerasa IB de Leishmania

Se determinó también la acción de los compuestos sobre la ADN toposiomerasa IB de *Leishmania*. Para obtener dicha proteína se utilizó un sistema de expresión heteróloga en *S. cerevisiae* carente de ADN-topoisomerasa IB (EKY3) trasformadas con el plásmido pESC-URA GAL TopIB (Villa y col., 2003).

3.14.1 Transformación de levaduras

Las levaduras EKY3 fueron transformadas por el método de acetato de litio (Ito y col., 1983). Para ello, se inoculó una colonia en 10 mL de medio YPD suplementado con glucosa al 2% (p/v). Se incubó durante 16 horas a 30 °C y una agitación constante de 120 rpm Transcurrido este periodo de tiempo se ajustó mediante dilución la OD_{600} del cultivo a 0,7, y se dejó crecer durante a 30 °C y 120 rpm hasta alcanzar una OD_{600} aproximada de 1,6 – 2. Las células se recogieron médiate centrifugación a 2300 rpm en una centrífuga Sorvall RC5B plus (Rotor: 1391 GSA) durante 10 min, y se lavaron con ¼ del volumen inicial del cultivo de disolución 1. Finamente se resuspendieron en un volumen final de 300 µL de esta misma disolución.

Para cada transformación se mezclaron, en el siguiente orden: 30 μ L de células (resuspendidas en la Disolución 1), 8 μ L de ADN de esperma de salmón (6,6 μ g/ μ L), 120 μ L de Disolución 2 y un mínimo de 100 ng del ADN a transformar; esta mezcla se incubó durante 30 min a 30 °C y 150 rpm Transcurrida esta incubación las células fueron sometidas a un choque térmico a 42 °C durante 15 min y, acto seguido, se sembraron en placas de medio S.C. ura- suplementadas con glucosa al 2% (p/v). Las placas se incubaron a 30 °C hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado.

Disolución 1: 40 mL H₂O _{dd}; 5 mL TE 10X; 5 mL LiOAc 10X

Disolución 2: 8 mL PEG 50%; 1 mL TE 10X; 1 mL LiOAc 10X

3.14.1.1 Sobrexpresión y purificación de proteínas

3.14.1.1.1 Crecimiento e inducción de cultivos

Una colonia aislada de levaduras modificadas con el plásmido pESC-URA GAL TopIB se inoculó en 10 mL de cultivo S.C. ura- suplementado con glucosa al 2% (p/v) y se incubó a 30 °C con agitación continua durante una noche. Se tomó una alícuota del cultivo que se diluyó cien veces en medio S.C. ura- con rafinosa al 2% (p/v) y se incubó durante 24 horas a 30 °C. Este paso se realizó para eliminar la glucosa remanente en el medio de

cultivo, ya que actúa como agente represor de los promotores GAL. A este cultivo se añadió galactosa procedente de una disolución al 20% (p/v) para alcanzar una concentración final en el cultivo del 2% (p/v), induciéndose así la expresión de los genes de la LdTopIB clonados bajo el promotor GAL presente en el plásmido pESC-URA. Tras 6 horas de incubación, las células se recogieron por centrifugación a 2500 rpm en una centrífuga Sorvall RC5B plus (Rotor: 1391 GSA) a 4 °C, se lavaron dos veces con un volumen de H₂O _{dd} fría y finalmente se resuspendierón en 15 mL de tampón de lisis.

Tampón de lisis: tampón TEEG (Tris-HCl 50 mM pH: 7.4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10% (p/v), suplementado con KCl 0.2 M y con inhibidores de proteasas: *"Protease inhibitor Cocktail Tablets"* 2X (Roche).

3.14.1.1.2 Obtención de extractos

La lisis de las células se inició con un ciclo de congelación-descongelación a -80 °C, seguido de 30 ciclos de agitación de 1 min (30 s agitación / 30 s reposo en hielo cada uno) con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (GLASS BEADS BioSpect), a una temperatura de 4 °C. La suspensión se centrifugó a 16.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5702R (Rotor: A-4-38) y 4 °C durante 45 min, recogiéndose el sobrenadante para continuar la purificación.

3.14.1.1.3 Purificación

La purificación de la proteína LdTopIB recombinante procedente de cultivos sobreexpresantes de *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante la precipitación de los extractos de levadura con (NH₄)₂SO₄ y elución en columnas de intercambio iónico (fosfocelulosa P-11) e hidrofobicidad (fenil-Sepharosa CL-4B) (Bjornsti y Fertala, 1999).

Los extractos solubles procedentes de la sobrexpresión en levaduras se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ sólido, hasta alcanzar una saturación entre el 35% (p/v) (para precipitar proteínas nucleares que comparten características físico-químicas con la LdTopIB) y el 75% (p/v). Las proteínas precipitadas en este intervalo se recogieron por centrifugación a 1.0000 rpm y se resuspendieron en 20 mL de tampón TEEG 1X 0,2 M KCl, suplementado con inhibidores de proteasas.

La disolución proteica obtenida se aplicó cuidadosamente en la interfase de una columna de polipropileno empaquetada con 5 mL de resina de fosfocelulosa P-11 (Whatman®), equilibrada previamente con 10 mL del tampón TEE 5X G 1X 2 M KCl y 10 mL de TEEG 1X 0,2 M KCl para ajustar la conductividad de la columna. Una vez que la disolución proteica penetró en el gel por gravedad, se efectuaron dos lavados de la resina con 10 mL de TEEG 1X 0,2 M KCl. Con un gradiente ascendente discontinuo de KCl, la elución de la LdTopIB se produjo con 0,6 M KCl.

Las disoluciones proteicas enriquecidas en la enzima se aplicaron sobre una columna cromatográfica de interacción hidrofóbica de Phenyl Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich) equilibrada con 10 mL de TEEG 1X 2 M (NH₄)₂SO₄.

La columna se lavó con 5 mL de TEEG 1X 1 M $(NH_4)_2SO_4$ y posteriormente con 3 mL de TEEG 1X 0,8 M $(NH_4)_2SO_4$. Finalmente, se procedió al eluido de la columna con 4 mL de TEEG 1X recogiéndose fracciones de 1 mL.

El volumen eluído de la columna anterior, se colocó en una bolsa de diálisis previamente hervida durante 15 min y lavada con agua fría. Seguidamente se sumergió en un litro de tampón de diálisis durante 2 h, a 4 °C. El proceso se repitió tres veces.

La proteína dializada se aplicó en un concentrador centrífugo Amicon Ultra-4 50K (Millipore[®]) cuyo diámetro de poro permite el paso de proteínas de masa molecular inferior a 50 kDa, lo que produce una purificación extra además de la concentración. Las proteínas así concentradas se recogieron. Para su conservación se añadió el mismo volumen de glicerol y se almacenaron -20 °C.

TEEG 1X: Tris-HCl 50 mM pH: 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol al 10% (v/v); NaF 80 μ g/mL; NaSO₃ 10 g/mL; IP 0,2X [Inhibidor de proteasas Complete Mini[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals)]

TEE 5X G 1X: Tris-HCl 250 mM pH: 7,4; EDTA 5 mM; EGTA 5 mM; glycerol al 10% (v/v); NaF 80 μ g/mL; NaSO₃ 10 μ g/mL; 0,2 x IP.

Pretratamiento de la resina de fosfocelulosa P-11: una vez tratada según las instrucciones del fabricante, se resuspendió el mismo volumen de resina húmeda en tampón de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH: 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 50% (v/v); KCl 1 M). Una vez decantada la resina, se lavó dos veces con un tampón reducido en sales (Tris-HCl 50 mM pH: 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 50% (v/v); KCl 0,2 M) y se colocó el volumen deseado en la columna de polipropileno.

Pretratamiento de la resina Phenyl Sepharose CL-4B: La resina de Phenyl Sepharose CL-4B no necesita ser activada. Para su compactación y lavado se procedió de manera similar a la mencionada para la columna P11. Se compactaron 3 mL de la resina y se añadieron cuidadosamente 10 mL de agua fría, para eliminar el etanol en el que se presenta resuspendida. Para que la columna compactada estuviese lista para ser utilizada, se hicieron pasar a través de la misma 10 mL de TEEG 1X frío, seguidos de otros 10 mL de TEEG 1X 1 M (NH₄)₂SO₄ con una mezcla de inhibidores de proteasas, 1X IP: 1 pastilla de inhibidor de proteasas Complete mini[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals) por cada 50 mL de disolución.

Tampón de diálisis: Tris-HCl 10 mM pH: 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 0,1 mM; albúmina sérica bovina (BSA) 150 μ g/mL; glicerol 10% (v/v).

3.14.2 Determinación de la actividad TopIB

La principal reacción de las enzimas Topl es la relajación del ADN supenrollado, el cual posee una movilidad electroforética en un gel de agarosa diferente de la del ADN relajado. Ya que el ADN aislado a partir de la mayoría de los organismos está superenrollado negativamente, se puede utilizar cualquier plásmido aislado de *E. coli* para medir la actividad de relajación de la enzima (Martin y col., 1983). El ensayo que se describe a continuación está diseñado para enzimas de tipo IB por lo que ni la ToplI ni posibles TopIII son activas bajo estas condiciones experimentales.

Antes de valorar la actividad de los inhibidores de TopIB, se realizó un ensayo destinado a cuantificar la actividad de la misma sobre el ADN superenrollado. La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 μ L y contenía 2 μ L de tampón TOP 10X, y como sustrato 0,5 μ g de ADN superenrollado circular pBluescripSK. A la mezcla se añadieron 0,5 μ g de la proteína purificada, realizándose diluciones 1:3 hasta no observar topoisómeros. Los tubos de reacción se incubaron durante 30 min en un baño a 37 °C a partir del momento de adición del extracto, y posteriormente se digirieron con 2 μ g de proteinasa K y SDS al 1% (p/v). La visualización de los topoisómeros se realizó tras separarlos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) preparada en 200 mL de TBE 1X. La electroforesis se resolvió a razón de 2 V/cm durante 16 h, y se tiñó con una disolución de bromuro de etidio (agente intercalante) (0,5 μ g/100 mL) para obtener imágenes digitales, usando un sistema de adquisición de geles con transiluminador de luz UV integrado (Sistema de adquisición de imagenes G-Box Syngene UK).

Gracias a este ensayo se define una Unidad Enzimática TopIB (U) como, la cantidad de enzima necesaria para relajar completamente 0,5 µg de ADN supenrollado en 30 min a 37 °C. Esto permitió normalizar todos los ensayos realizados.

Tampón TOP 10X: Tris 100 mM pH: 7,5; KCl 150 mM; MgCl₂ 50 mM; EDTA 0,2 mM; 150 μ g/mL BSA.

Tampón TBE 10X: Tris 890 mM; ácido bórico 890 mM; EDTA 20 mM pH: 8,0.

3.14.3 Ensayo de Inhibición de la actividad de relajación

Para comprobar el posible efecto inhibitorio sobre la actividad de relajación TopIB de los diferentes compuestos, se llevaron a cabo ensayos dependientes de concentración a tiempo fijo. La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 μ L y contenía 2 μ L de tampón TOP 10X, 0,5 μ g de ADN pBluescripSK, 1 U TopIB y 1 μ L de las diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C durante 15 min. La reacciones fueron detenidas añadiendo SDS al 1% (p/v) y posteriormente se digirieron con 2 μ g de proteinasa K. Los topoisómeros fueron resueltos en geles de agarosa al 1% (p/v) preparada en 200 mL de TBE 1X, a razón de 2 V/cm durante 16 h. Los geles se tiñeron con una disolución de bromuro de etidio (0,5 µg/100 mL) para posteriormente obtener imágenes digitales de los mismos con el sistema G-BOX (Syngene UK). Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles Gene Tools (Syngene) y representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot[™].

3.15 Estudios de bioinformática

Para los diferentes trabajos de bioinformática se partió de las secuencias genéticas, obtenidas de la base "GeneDB"(Logan-Klumpler y col., 2012) para *Leishmania* y tripanosomatido; mientras que para el resto de especies, se usó la base de datos de NCBI. La búsqueda de modelos tridimensionales de proteínas se realizó en la base de datos "PDB".

3.15.1 Alineamiento de secuencias

Para el alineamiento de secuencias peptídicas y genéticas con el fin de comparar proteínas y genes de diferentes especies o isótipos de una misma especie, se utilizó para las secuencias grandes el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011) y para las secuencias medias el MUSCLE (Edgar, 2004).

3.15.2 Construcción de modelos tridimensionales de proteínas

Debido a la alta conservación de la tubulina entre diferentes especies, el método utilizado para la creación del modelo de la proteína de *Leishmania* fue el comparativo por homología. Este método parte de la premisa que dos proteínas con una secuencia similar adoptaran una estructura tridimensional similar. Para la creación del modelo se superpondrá la secuencia de la proteína incógnita sobre una plantilla formada por las estructuras tridimensionales conocidas de las proteínas similares.

3.15.2.1 Selección de la secuencia

Primero se seleccionó la secuencia peptídica que se va a usar para el modelado, para ello se buscaron los genes que codifican para la tubulina en *L.Infantum* JPCM5 en la base de datos GeneDB. Los diferentes genes encontrados que codifican para una misma proteína, se analizaron mediante alineamiento con el programa Clustal Omega, para determinar que gen era el mejor conservado y si había diferentes isotipos de la proteína en *Leishmania*. Finalmente se eligió la secuencia mas conservada.

3.15.2.2 Creación de las plantillas y modelos

Para la creación de la plantilla necesaria para la generación del modelo de la tubulina de *Leishmania*, se buscaron los modelos de las proteínas cristalizadas con mayor porcentaje de homología con nuestra secuencia. Se usó el programa Blast (Altschul y col., 1997) sobre la base de datos PDB (Berman y col., 2000), que recoge todos los modelos tridimensionales obtenidos mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. Para una misma secuencia se obtendrán varios modelos
tridimensionales con igual grado de homología, descartándose aquellos con mayor resolución cristalográfica (menor resolución) y los que contengan ligandos que interfieran con nuestro futuro modelo.

Los modelos seleccionados fuerón procesados con el programa Modeller9.13 (Šali y Blundell, 1993; Fiser y col., 2000; Martí-Renom y col., 2000) para crear la plantilla; y utilizando este mismo programa, se superpuso la secuencia peptídica para obtener el modelo. A su vez los modelos obtenidos por el programa Modeller9.13 fueron refinados con el servicio PELE (Madadkar-Sobhani y Guallar, 2013).

Durante el proceso de creación de las plantillas y los diferentes modelos para nuestra secuencia peptídica se usaron varios programas de interface grafico: VMD (Humphrey y col., 1996) y UCSF Chimera (Pettersen y col., 2004; Yang y col., 2012); y de análisis MEAN (Benkert y col., 2008; Benkert y col., 2009a; Benkert y col., 2009b; Benkert y col., 2011) y Procheck (Laskowski y col., 1993) para comprobar la calidad de los modelos creados.

El proceso de selección de los modelos, creación de las plantillas y superposición de la secuencia se repitió modificando los diferentes parámetros hasta obtener un resultado satisfactório.

3.15.3 Creación de modelos con mutaciones puntuales

Para el análisis de que aminoácidos implicados en la unión de la podofilotoxina a la tubulina de mamíferos y de *Leishmania*, se usó el modelo PDB: 4O2B, sobre el cual, mediante el programa informático Swiss-PdbViewer se realizaron las diferentes mutaciones puntuales.

3.15.4 Docking

Con el fin de comprender la unión de los compuestos sobre la tubulina y sus diferencias estructurales, se realizó un estudio de ensamblado, tomando como diana la tubulina y como ligandos, los compuestos. Para la realización de las aproximaciones de ensamblaje molecular se tomó como referencia la estructura 3D del cristal de tubulina, con número de entrada PDB: 402B y los diferentes modelos creados.

El ensamblaje molecular se realizó con el software Autodock Vina (Trott y Olson, 2010) y el programa gráfico Chimera. El software Autodock es capaz de buscar las mejores aproximaciones, para ajustar dos moléculas en un ensamblaje de alta fiabilidad. Para ello se delimita la zona de búsqueda, en nuestro caso el centro activo de la colchicina, el cual queda encerrado dentro de una rejilla (X=66.0 Y=44.0 Z=66.0). El ensamblaje consistió en una serie de búsquedas independientes que dieron lugar a las conformaciones finales del ligando en la diana. Dichas conformaciones equivalen a las conformaciones de mínima energía encontradas durante cada búsqueda. Finalmente, la visualización y análisis de los resultados se realizó con el software UCSF Chimera. Jose Miguel Escudero Martínez



4 Resultados

4.1 Generación de las cepas infrarrojas

En nuestro laboratorio se han generado, mediante transfección estable con un fragmento del vector pLEXSY-PAC-IRFP.70 (descrito en material y métodos), dos líneas de promastigores de *L. major* (*L. major* IRFP) y *L. infantum* (*L. infantum* IRFP), que sobreexpresan la proteína fluorescente infrarroja IRFP. Dicha proteína es una modificación de la proteína fluorescente infrarroja IFP1.4 procedente de la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas palustris* que, unida al cromóforo biliverdina, emite fluorescencia en el infrarrojo cercano ($\lambda_{exc.}$ 690 nm/ $\lambda_{emm.}$ 713 nm) (Shu y col., 2009). De este modo la modificación genética de las cepas de *Leishmania* ha permitido generar una plataforma HTS fenotípica para el cribado de compuestos.

La transformación de las cepas de *Leishmania* se realizó mediante electroporación con el fragmento lineal de 6.110 pb procedente de la digestión con la *Swa*I del plasmido pLEXSY-PAC-IRFP.70. Dicho fragmento contiene el gen que codifica la proteína IRFP, el gen de resistencia a puromicina que permite la selección de colonias, la región 3' intergenica de la histona HSP70 II de *L. infantum*, que aumenta la expresión de los genes colocados corriente arriba de la misma y las secuencias que permiten su integración en el locus ARN ribosómico 18S (ssu), mediante recombinación homóloga (Figura 74). Después de la electroporación y selección en placa con 200 µg/ml de puromicina, las colonias individuales obtenidas se sembraron en medio líquido M199 suplementado con 10% de SFB inactivado.



Figura 74.- Estrategia de integración del gen irfp en el locus 18s rARN de *L. infantum* BCN150. Esquema de la estructura del locus 18s rARN de la cepa salvaje y lugar planeado de clonaje. Clave: utr1: 5'UTR del gen aprt; iRFP: gen que codifica la proteína; HSP70: región 3'intergenica de la proteína HSP70 y utr3: 5'UTR del gen dhfr-ts; PAC; cassette de resistencia a puromicina.

La transformación no afecta a la tasa de crecimiento de la cepa transformada con respecto a la de la tasa de la cepa salvaje. En la Figura 75 se puede ver como el

crecimiento de la cepa salvaje y de la cepa transformada es similar para ambas especies. Además, la construcción demostró ser estable en el tiempo, durante un periodo de seis meses después de la transfección, no observándose cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida durante este periodo, incluso en ausencia de puromicina.

La emisión de radiación infrarroja tiene lugar sin la adición de biliverdina, debido a la presencia de otros cromóforos como la hemina en el medio de cultivo.



Figura 75.- Estudio del crecimiento de las cepas L. infantum IRFP y L. major IRFP frente a sus homólogas salvajes.

4.2 Establecimiento del modelo de fluorescencia en promastigotes

Para realizar una evaluación de la actividad de los compuestos frente a los promastigotes de *Leishmania*, se desarrolló un modelo en cultivos *in vitro* de los mismos. Solo las células viables podrían transcribir el gen irfp y emitir radiación infrarroja; sin embargo, la expresión de proteínas está íntimamente ligada al crecimiento de un cultivo celular y, por lo tanto, es esperable que la cantidad de IRFP activa (capaz de emitir luz infrarroja) cambie en función del estado proliferativo celular. Por esta razón se determinó la emisión de fluorescencia infrarroja a lo largo del tiempo en los cultivos *de L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP crecidos en condiciones estándar.

Se realizaron cuatro ensayos independientes, con tres replicas cada uno, midiendo a diferentes tiempos la densidad celular con un contador Beckman Coulter Z1[®]. Una vez realizado el recuento celular se llevó a cabo la medida de la emisión infrarroja de un número determinado de células. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 76. Los resultados muestran curvas de crecimiento similares tanto, para *L. major* IRFP como para *L. infantum* IRFP. En ellas se puede observar una fase de adaptación (fase lag) que dura aproximadamente 20 horas y a la que sigue una fase de crecimiento exponencial (fase log), hasta las 80 h, en que el cultivo alcanza un máximo de 30x10⁶ células/mL. Posteriormente el cultivo entra en una fase estacionaria, con apenas crecimiento neto y

en la que la emisión de la fluorescencia decrece. En ambos casos la mayor emisión de fluorescencia se obtiene a las 18 horas.



Figura 76.- (A) Representación gráfica que relaciona la fluorescencia total emitida por *L. major* IRFP y (B) *L. infantum* IRFP durante las diferentes fases de crecimiento de cultivos de promastigotes. En rojo se muestra la emisión infrarroja por cada 200.000 células y en negro la densidad celular del cultivo.

Se estableció también la relación entre emisión de radiación infrarroja y número de células. Para ello, se cultivaron las dos cepas modificadas y sus homólogas salvajes durante un periodo de 48 h. A partir de estos cultivos se realizaron diluciones seriadas en medio M199, determinándose la fluorescencia infrarroja emitida por los mismos en un equipo ODYSSEY[®] (Li-Cor). Se determinó igualmente la fluorescencia procedente únicamente del medio de cultivo (con el fin de restar la posible autofluorescencia del medio), comprobando que la emisión en las cepas salvajes no es significativa frente a la que presentan las transformadas.



Figura 77.- (A) Placa de 96 pocillos con promastigotes de *L. infantum* IRPF y diferentes concentraciones de podofilotoxina (PPT), registrada a las 48 horas por el dispositivo ODYSSEY (LI-COR). (B) Representación de los datos obtenidos de la Figura 77A, ajustados no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®], para determinar la CI₅₀.



Figura 78.- Relación entre el número de células y la emisión de fluorescencia infrarroja. Ajuste lineal realizado con el programa SigmaPlot.

En la Figura 78 se muestran los resultados obtenidos, observándose correlaciones lineales entre el número de células y la emisión de fluorescencia con una sensibilidad de 10⁴ células, por debajo de la cual se pierde la linealidad.

Una vez caracterizado y según se describe en el apartado material y métodos, el modelo fue usado para la evaluar la citotoxicidad de los compuestos utilizados en el estudio frente a promastigotes de *L. major* y *L. infantum.* En la Figura 77 se muestra, a modo de ejemplo, la determinación del efecto citotóxico de la podofilotoxina en promastigotes de *L. infantum* IRFP, utilizando el método descrito.

4.3 Establecimiento y optimización del modelo de explantes esplenicos

Con el fin de evaluar y probar la actividad de compuestos frente a la leishmaniosis visceral, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un sistema basado en el cultivo de explantes procedentes de bazos de ratones BALB/c, tras 5 semanas de infección con la cepa infrarroja *L. infantum* IRFP (Figura 79A). En este modelo, la replicación del parásito puede ser cuantificada fácilmente mediante el registro de la fluorescencia infrarroja

emitida por los amastigotes intracelulares y se puede adaptar a una plataforma HTS con formato de 96 ó 384 pocillos (Calvo-Álvarez y col., 2015).



Figura 79.- Puesta a punto del modelo de leishmaniosis visceral en ratones BALB/c infectados con promastigotes estacionarios de *L. infantum* IRFP. (A) Numero de amastigotes procedentes de bazos murinos después de 1 a 5 semanas post-infección. (B) Replicación de los amastigotes dentro de los esplenocitos a diferentes densidades de siembra al comienzo del cultivo (•) 2×10^5 AU; (o) 1×10^5 AU; (•) 0.5×10^5 AU y (Δ) 0.25×10^5 AU. La emisión fluorescente se registró diariamente durante 5 días.

Para caracterizar el modelo, se procedió a registrar el rango dinámico de fluorescencia en el que se espera la replicación eficaz y cuantificable de los parásitos intracelulares dentro de los macrófagos. La Figura 79B muestra la capacidad proliferativa de los amastigotes dentro de los explantes en función del tiempo, respecto de las diferentes cantidades de esplenocitos infectados sembrados en la placa, que correspondían a $0,25 \times 10^5$, $0,50 \times 10^5$, 1×10^5 y 2×10^5 unidades de fluorescencia infrarroja (UA). El seguimiento de la fluorescencia emitida por los cultivos durante 5 días, muestra únicamente un incremento significativo en aquellos cultivos que se sembraron con 2×10^5 UA, lo que indica una multiplicación continua de los amastigotes dentro de la célula hospedadora. También se caracterizó la relación entre el número de amastigotes y la emisión infrarroja a diferentes tiempos, siendo esta relación lineal (Figura 80A).

Se estableció el grado de discriminación entre los pocillos control no tratados, con respecto a los tratados con un fármaco leishmanicida de referencia, la anfotericina B (Figura 80B). A los cultivos de esplenocitos sembrados con una densidad equivalente a $2x10^5$ UA, se añadieron cantidades crecientes de anfotericina B equivalentes a concentraciones: 0,74; 2,20; 6,60 y 20 μ M, respectivamente. La carga parasitaria se midió diariamente durante 72 horas mediante la emisión de fluorescencia infrarroja. Considerando que en los pocillos no tratados se permite la proliferación adecuada de los amastigotes, la reducción de la fluorescencia con respecto a la concentración de fármaco administrada a un tiempo dado, servirá como marcador de la actividad leishmanicida. De manera semejante y según se describe en material y métodos, se realizaron ensayos en placas negras de 384 pocillos con fondo transparente, que contenían los explantes tratados con diferentes concentraciones de los compuestos

utilizados en el estudio y en las que la intensidad de la fluorescencia infrarroja (transformada en una señal visible en rojo) reflejaban la viabilidad de los amastigotes de cada pocillo (Figura 80C).



Figura 80.- (A) Correlación entre el número de amastigotes aislados de lesión de bazo y la emisión fluorescente infrarroja emitida por los mismos después de 3, 4 y 5 semanas post-infección. (B) Efecto de diferentes concentraciones de anfotericina B en los amastigotes intracelulares a una densidad de 2x10⁵ AU, registrándose la fluorescencia emitida diariamente a lo largo 72 horas. (C) Imagen de una placa de 384 pocillos registrada por el dispositivo ODYSSEY (LI-COR). (D) Imágenes de microscopía confocal tomadas con un microscopio confocal Zeiss de bazo infectados con amastigotes *L. infantum* IRFP procedentes de una infección experimental murina de 5 semanas: (I) microscopia de interferencia, (II) tinción con DAPI, (III) emisión infrarroja por parte de los amastigotes *L. infantum* IRFP y (IV) Combinación DAPI y fluorescencia infrarroja (Calvo-Álvarez y col., 2015).

4.4 Actividad citotóxica en cultivos primarios de células de mamífero

Inicialmente, para cuantificar la toxicidad de los compuestos en cultivos primarios de mamífero, se utilizaron dos métodos, macrófagos murinos intraperitoneales y explantes esplénicos de ratón. Con ambos métodos se obtuvieron valores similares (Tabla 7), de modo que se decidió continuar sólo con el método de explantes esplénicos. La utilización de explantes tiene una serie de ventajas frente a los macrófagos; entre ellas,

que permite obtener más células por ratón sacrificado, de un modo mucho más sencillo y rápido.

	Esplenocitos	Macrófagos
JAP-30	> 200	> 200
JAP-31	> 200	> 200
JAP-32	71,82 ± 6,03	60,61 ± 5,29
JAP-34	135,79 ± 30,35	> 200
JAP-42	22,90 ± 0,89	37,31 ± 8,89
JAP-44	126,79 ± 11,12	130,38 ± 16,78
JAP-47	31,16 ± 1,11	35,44 ± 2,71
JAP-49	108,58 ± 14,2	134,06± 17,90
JAP-51	> 200	> 200
JAP-52	176,41 ± 52,89	171,31 ± 18,82
JAP-60	20,98 ± 2,30	33,16 ± 4,38

Tabla 7.- Valores de CI₅₀ (μM) de macrófagos murinos intraperitoneales y esplantes esplénicos de ratón, obtenidos con algunos de los compuestos utilizados en el estudio.

Se evaluó también la citotoxicidad de los compuestos en la línea hepática HepG2 como referencia de la toxicidad hepática de los mismos.

Los resultados de los ensayos con promastigotes, amastigotes, esplenocitos y células HepG2, se muestran en las tablas como la concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀) expresada en μ M; junto con el índice de vida selectivo (IS), resultado del cociente entre la Cl₅₀ obtenida frente a esplenocitos y la Cl₅₀ frente a los amastigotes de *L. infantum*.

$$IS = \frac{CI_{50 \ Esplenocitos}}{CI_{50 \ Amastigotes \ L. \ infantum}}$$

4.5 Lignanos

Los lignanos que se han evaluado en este trabajo corresponden a elementos representativos de diversas series de compuestos, que se han preparado por vía semisintética (Gordaliza y col., 1995a; Miguel del Corral y col., 1995; Medarde y col., 1996; Gordaliza y col., 1997; Miguel del Corral y col., 1997; Gordaliza y col., 2000b; López-Pérez y col., 2000; Castro y col., 2003a; Castro y col., 2004; López-Pérez y col., 2007; Castro y col., 2010a; Abad y col., 2012; Castro y col., 2012), principalmente a partir de la podofilotoxina, un lignano natural relativamente abundante en varias especies del género *Podophyllum* y accesible mediante técnicas selectivas de extracción y purificación ya descritas (San Feliciano y col., 1989a; San Feliciano y col., 1989b; San Feliciano y col., 1992).



Figura 81.- Estructuras de la podofilotoxina y del aldehído podofílico, junto con las de los tipos estructurales principales de los lignanos tetracíclicos (TE), tricíclicos (TR) y otros evaluados en este trabajo. La numeración naftalénica utilizada para facilitar la discusión, no es la sistemática recomendada por la IUPAC.

La podofilotoxina y sus congéneres estructurales próximos se caracterizan por su capacidad para inhibir la polimerización de tubulina (Skoufias y Wilson, 1992). Entre los compuestos ensayados se encuentran varios inhibidores más potentes que aquella, y algunos que han mostrado gran selectividad entre células cancerosas y normales, y

diferencias muy notables de citotoxicidad relativa frente a distintos tipos de células cancerosas (San Feliciano y col., 1993; Gordaliza y col., 1995a; Miguel del Corral y col., 1995; Miguel del Corral y col., 1997). Otros derivados de podofilotoxina, que se encuentran actualmente en la clínica oncológica común, actúan como inhibidores de las ADN topoisomerasas tipo II (Chen y col., 1993; Ray y col., 1998), y otros incluidos en este estudio, parecen actuar a través de un mecanismo diferente, aún por establecer (Castro y col., 2010).

En total se evaluaron *in vitro* 77 compuestos derivados de la podofilotoxina y del aldehído podofílico. Para facilitar la comparación y discusión de resultados en términos de relación estructura-actividad, los compuestos se han agrupado en varios tipos y subtipos estructurales, según se presentan en la Figura 81 y en las tablas de resultados. Las dos primeras tablas (Tabla 8 y Tabla 9) contienen los compuestos tetracíclicos (TE), que mantienen la fusión lineal de los anillos de la podofilotoxina, las tres siguientes (Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12) contienen los compuestos tricíclicos (TR) y una última que agrupa aquellos compuestos que no se han incluido dentro de ninguna de las tablas anteriores. La nomenclatura utilizada se especifica en la Figura 81.

4.5.1 Compuestos con sistema polianular tetracíclico: Lactonas

El primer grupo está formado por varios compuestos naturales y sus derivados sencillos como podofilotoxina (JAP-01), acetil peltatina (JAP-02), epipodofilotoxina (JAP-03), desoxipodofilotoxina (JAP-04) y picropododilotoxina (JAP-05) entre otros (San Feliciano y col., 1989a; San Feliciano y col., 1989b) y un conjunto de compuestos semisintéticos derivados de la alquilación formal de la posición C-4 (Tabla 8). En la tabla se presentan los valores de CI_{50} (μ M) obtenidos para este grupo de compuestos frente a promastigotes de *L. major* y *L. infantum*, amastigotes de *L. infantum*, esplenocitos y células humanas HepG2.

Como puede observarse, los compuestos con mayor actividad frente a los promastigotes son la podofilotoxina (JAP-01) y los derivados alquilados con sustituciones R₁ de tipo alquilo o alquenilo ramificado, como isopropilo (M3R), isobutilo (CSD-12, CSD-15) e isobutenilo (CSD-02, CSD-01). En esos casos el tamaño de los radicales sustituyentes no disminuye la actividad leishmanicida, aunque se sabe que los compuestos con sustitución C4- β (CSD-15 y CSD-01) presentan menor citotoxicidad frente a células cancerosas humanas y menor capacidad para inhibir la polimerización de la tubulina de mamífero (Abad y col., 2012).

También se observa en la tabla que casi todos los compuestos demuestran ser mucho más efectivos sobre promastigotes de *L. major* que de *L. infantum*. Los compuestos M3R, CSD-12, CSD-09, CSD-03 y CSD-05 presentan Cl₅₀ mayores en amastigotes de *L. infantum* que en promastigotes de la misma especie. Sin embargo, los compuestos JAP-01, CSD-02, CSD-01, CSD-10, CSD-04, CSD-11 y M10E muestran Cl₅₀ menores en la forma

amastigote, comparadas con las observadas en la forma promastigote. En este sentido, resulta interesante resaltar el comportamiento de las moléculas JAP-01, CSD-02 y M10E, que mostraron valores de CI_{50} mayores que 100 μ M en promastigotes, mientras que en amastigotes, los valores obtenidos fueron 13,4 μ M, 7,4 μ M y 5,9 μ M respectivamente; es decir, más de 17 veces más potentes, en el caso de M10E. Dentro de este grupo, el compuesto con un mejor índice de selectividad frente al parásito es la podofilotoxina (JAP-01), pero también se observa que este compuesto es el que presenta una menor CI_{50} frente a las células HepG2, que se han tomado como referente de toxicidad hepática.

En general, a excepción de la podofilotoxina (JAP-01), los compuestos de este grupo que fueron activos frente amastigotes o promastigotes mostraron una elevada toxicidad en esplenocitos, dando malos índices de selectividad.

Tabla 8.- Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de algunas lactonas lignánicas TE.



Resultados

	Proma	istigotes	Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-04	81,12 ± 13,1	> 100	> 100	98,60 ± 3,08	-	102 ± 8,09
JAP-09	60,47 ± 3,07	> 100	> 100	140,17 ± 16,8	-	37,7 ± 2,54
JAP-05	> 100	> 100	> 100	119,19 ± 7,41	-	> 200
JAP-01	63,74 ± 11,81	> 100	13,36 ± 0,82	> 200	> 15,0	0,736 ± 0,0276
JAP-02	41,93 ± 6,58	> 100	> 100	> 200	-	$1,74 \pm 0,18$
JAP-03	86,14 ± 7,62	> 100	> 100	101,19 ± 1,42	-	30,6 ± 2,05
JAP-10	76,28 ± 6,61	> 100	> 100	60,56 ± 7,73	-	10,3 ± 0,85
M3R	20,7 ± 0,04	23,22 ± 0,46	> 100	0,38 ± 0,03	-	> 200
CSD-12	13,7 ± 0,92	13,79 ± 0,23	15,62 ± 0,07	16,41 ± 1,71	1,1	> 200
CSD-15	15,7 ± 0,13	24,90 ± 0,39	6,70 ± 0,29	17,96 ± 1,75	2,7	152,57 ± 15,73
CSD-02	21,5 ± 1,75	> 100	7,38 ± 0,44	6,40 ± 0,76	-	33,09 ± 2,12
CSD-01	20,03 ± 0,65	14,54 ± 0,29	9,28 ± 0,45	1,75 ± 0,17	-	> 200
CSD-10	79,3 ± 7,9	> 100	53,7 ± 5,18	57,08 ± 2,46	1,1	> 200
CSD-09	9,07 ± 0,41	10,44 ± 0,61	44,3 ± 3,22	6,78 ± 0,25	-	> 200
CSD-04	> 100	> 100	46,35 ± 8,78	15,92 ± 0,14	-	> 200
CSD-03	83,6 ± 4,03	61,23 ± 7,79	> 100	55,48 ± 3,25	-	75,89 ± 15,28
CSD-11	78,3 ± 5,74	> 100	79,14 ± 5,32	38,02 ± 2,45	-	> 200
CSD-05	55,61 ± 5,49	66,44 ± 6,82	> 100	11,35 ± 1,98	-	158,13 ± 28,89
M10E	> 100	> 100	5,86 ± 1,07	4,35 ± 0,60	-	> 200

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.5.2 Compuestos con sistema polianular tetracíclico TE. Lactama y otras Lactonas.

Los compuestos de este grupo presentan modificaciones en los anillos C, D o E de la podofilotoxina como podemos observar en la Tabla 9.

La sustitución del anillo lactona (anillo D) por un anillo lactama (JAP-14) no mejora la eficacia del compuesto con respecto a la podofilotoxina, tampoco la sustitución del anillo trimetoxifenilo por un anillo 3 metoxi 1,2 benzoquinona (JAP-45) mejoró la eficacia del compuesto en promastigotes o amastigotes, pero si aumentó considerablemente la toxicidad en esplenocitos.

 Tabla 9.- Estructuras y resultados de actividad frente a L. major IRFP y L. infantum IRFP y toxicidad de una lactama y otras lactonas lignánicas TE, con cambios importantes de funcionalidad o geometría.



	Promastigotes		Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-14	80,01 ± 9,83	> 100	83,09 ± 2,23	98,23 ± 10,19	1,2	35,7 ± 4,86
JAP-44	69,25 ± 5,39	85,82 ± 4,88	42,11 ± 3,43	126,79 ± 11,12	3,0	86,80 ± 2,52
JAP-08	> 100	> 100	n.e.	6,07 ± 0,56	-	24,0 ± 1,51
JAP-45	> 100	> 100	> 100	$4,69 \pm 0,41$	-	53,23 ± 2,81
CSD-08	> 100	> 100	> 100	2,27 ± 0,11	-	> 200
CSD-13	17,5 ± 1,58	12,28 ± 0,44	11,61 ± 0,87	20,86 ± 2,27	1,8	161,79 ± 23,03

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

n.e. - no ensayado

Las estructuras de este conjunto de moléculas son bastante dispares, poco comparables entre sí en geometría y funcionalidad. No obstante, en algunos casos pueden compararse sus resultados con los de los lignanos incluidos en la tabla anterior. Así, se observa que la presencia de un doble enlace en posición 2-3 del anillo C (JAP-44, β -apopodofilotoxina) y configuración de 1,4-dihidronaftaleno, aumenta la eficacia frente a amastigotes, con respecto a su análogo JAP-04, con menor grado de insaturación; teniendo en cuenta que adicionalmente también cambia la orientación espacial del anillo lactónico fusionado D, ya que el sistema tetracíclico se hace prácticamente plano. En contraste, si el doble enlace se encuentra en posición 3-4 (JAP-08) y además cambia la configuración de la posición C-3, disminuye considerablemente su eficacia.

La aromatización del anillo C (CSD-08), tampoco aumenta la eficacia con respecto a la de sus análogos. Por otra parte, hay que mencionar que, tanto la presencia de una insaturación adicional, como la aromatización completa del anillo C, conducen a aumentar la citotoxicidad de estos compuestos frente a esplenocitos; destacando la citotoxicidad de la lactama olefínica JAP-14 frente a la línea hepática humana.

El cambio de configuración de la posición C-2 del anillo C a beta, originando una *cis*picrolactona (CSD-13), no varió significativamente la eficacia con respecto a la del compuesto de partida (CSD-01), con fusión *trans* de los anillos C y D. Esto sorprende significativamente, porque la podofilotoxina (JAP-01) y su análogo *cis*-lactónico, picropodofilotoxina (no considerada para este trabajo), presentan citotoxicidades diferentes en dos órdenes de magnitud sobre células neoplásicas humanas.

4.5.3 Compuestos con sistema polianular tricíclico: con función aldehído unida a la posición C-3

Los compuestos de la Tabla 10 son derivados del aldehído podofílico (JAP-51), que aparece como cabeza de serie, debido a que destacó por su selectividad antineoplásica frente a carcinoma de colon HT-29 resistente a adriamicina. En esta tabla se pueden diferenciar dos subgrupos: compuestos con radicales que contienen anillos aromáticos y compuestos con otros tipos de radicales.

Como puede apreciarse, el aldehído podofílico (JAP-51) es bastante potente frente a amastigotes y presenta una selectividad alta (IS > 21,6), pero la agrupación que origina los mejores resultados es la del diéster lignoglicólico-etílico (JAP-55), con la que se alcanza una eficacia doble y un IS mayor que 46. Los ésteres alílico (JAP-52) y trimetoxibencílico (JAP-54) tienen selectividades menores, siendo el segundo bastante potente frente a las líneas de *Leishmania*; mientras que los dos ésteres bromados (JAP-56 y JAP-16) presentan la citotoxicidad concordante con su naturaleza de agentes alquilantes. Es destacable que su potencia leishmanicida se relaciona con el tamaño de la cadena halogenada, pero en forma opuesta sobre promastigotes y sobre esplenocitos, siendo más potente leishmanicida el de cadena más corta (JAP-16, cadena butílica), y más tóxico sobre esplenocitos el JAP-56, con cadena hexílica.

Tabla 10.- Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de los compuestos con sistema polianular tricíclico y función aldehído unida a la posición C-3.



	Proma	stigotes	Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-51	65,27 ± 4,40	89,49 ± 4,29	9,26 ± 0,47	> 200	> 21,6	136,94 ± 4,67
JAP-52	51,12 ± 2,72	57,04 ± 4,21	29,78 ± 1,60	176,41 ± 52,89	5,9	116,11 ± 6,00
JAP-16	15,88 ± 2,16	35,2 ± 7,49	n.e.	98,23 ± 10,19	-	-
JAP-56	28,96 ± 1,85	25,69 ± 3,56	18,12 ± 0,12	46,77 ± 6,98	2,58	68,95 ± 5,96
JAP-55	91,73 ± 7,66	64,78 ± 4,87	4,28 ± 0,13	> 200	> 46,7	10,37 ± 0,78
JAP-59	30,90 ± 4,51	> 100	56,26 ± 1,38	41,98 ± 1,91	-	73,53 ± 11,63
JAP-60	16,98 ± 0,43	17,46 ± 0,86	20,89 ± 0,08	20,98 ± 2,30	1,0	45,48 ± 5,61
JAP-15	> 100	> 100	> 100	80,12 ± 4,86	-	27,20 ± 2,23
JAP-57	18,83 ± 1,39	79,93 ± 5,69	51,93 ± 0,32	34,12 ± 3,47	-	18,53 ± 0,73
JAP-54	13,45 ±0,53	14,49 ± 1,07	10,16 ± 0,46	51,29 ± 2,97	5,0	89,95 ± 3,98
JAP-53	12,22 ± 0,66	9,28 ± 0,73	9,92 ± 0,55	> 200	> 20,1	> 200
JAP-58	> 100	94,81 ± 7,93	> 100	154,50 ± 4,62	-	14,32 ± 1,25
JAP-61	> 100	> 100	> 100	> 200	-	169,14 ± 15,2

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

n.e. - no ensayado

Los compuestos con radicales aromáticos muestran una elevada citotoxicidad en esplenocitos a excepción del compuesto JAP-53, con el que se alcanzó un índice selectivo de más de 20. Los compuestos con sustituyentes tipo purina (JAP-59 y JAP-60) mostraron una actividad citotóxica similar en amastigotes y esplenocitos, mientras que el compuesto JAP-15, con resto de pirrolidida, no mostró citotoxicidad frente a los parásitos, pero si contra las células de mamífero, tanto esplenocitos como células HepG2. De los tres compuestos con radicales derivados del benceno (JAP-57, 54 y 53), el compuesto JAP-53 fue el que presentó la mejor selectividad (IS >20). Por el contrario el compuesto JAP-57 mostró una elevada citotoxicidad en células de mamífero, y el compuesto JAP-61, con sustitución del grupo trimetoxifenilo (anillo E), por un sistema bicíclico de metoxiquinolaxina, resultó inactivo frente a todas las líneas celulares.

4.5.4 Compuestos con sistema polianular tricíclico: con función nitrogenada (imina o hidrazona) unida a la posición C-3.

La Tabla 11 abarca los compuestos con sistema polianular tricíclico fusionado y funciones nitrogenadas asociadas a la posición C-3 y los resultados de su biovaluación.

Se observa que el único compuesto selectivo de este grupo de compuestos, que no mostró citotoxicidad frente a esplenocitos, siendo moderadamente eficaz en las células de parásito fue la amina (JAP-50); pero también resultó altamente tóxico para las células HepG2. El resto de compuestos sin anillos en el fragmento unido al átomo de nitrógeno (JAP-38, JAP-18 y JAP-49), mostraron índices de selectividad menores.

El compuesto JAP-20, con un anillo fusionado al nitrógeno, mostro una cierta actividad citotóxica frente a esplenocitos pero fue bastante eficaz frente a amastigotes originando una IS de 13,1. Este compuesto también fue altamente toxico en células hepáticas.

Tabla 11.- Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de los compuestos con sistema polianular tricíclico y función imina o hidrazona unida a la posición C-3.



	Prom	astigotes	Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-50	34,94 ± 2,01	38,35 ± 3,70	31,74 ± 2,09	> 200	> 6,3	6,56 ± 0,36
JAP-38	51,29 ± 3,11	59,3 ± 4,25	65,63 ± 6,96	59,34 ± 5,42	-	92,92 ± 3,90
JAP-18	10,25 ± 0,45	24,54 ± 1,55	24,54 ± 1,55	123,07 ± 13,54	5,0	114,78 ± 11,1
JAP-49	49,93 ± 1,49	61,30 ± 0,71	59,38 ± 0,77	108,58 ± 14,2	1,8	114,46 ± 2,04
JAP-19	17,89 ± 0,59	19,94 ± 2,06	19,90 ± 2,06	127,14 ± 18,58	6,4	n.e.
JAP-20	8,59 ± 0,05	9,37 ± 0,75	9,37 ± 0,75	122,80 ± 14,12	13,1	$1,11 \pm 0,04$
JAP-21	21,81 ± 1,22	14,17 ± 1,85	53,45 ± 4,53	79,26 ± 7,87	1,5	6,83 ± 0,57
JAP-22	19,81 ± 2,68	> 100	n.e.	n.e.	-	n.e.
JAP-39	27,95 ± 1,72	41,08 ± 2,36	70,49 ± 3,69	38,70 ± 1,53	-	118,32 ± 5,52
JAP-25	36,33 ± 4,08	94,49 ± 3,02	15,6 ± 0,80	105,06 ± 5,30	6,7	$1,54 \pm 0,14$
JAP-24	54,89 ± 1,94	91,03 ± 1,98	67,36 ± 1,98	105,05 ± 3,26	1,6	32,39 ± 0,58
JAP-23	54,77 ± 1,86	51,6 ± 1,82	7,53 ± 0,48	58,09 ± 2,66	7,7	n.e.
JAP-40	15,01 ±0,49	14,19 ± 2,09	25,32 ± 0,99	8,76 ± 0,53	-	164,49 ± 13,59
JAP-41	> 100	> 100	> 100	161,49 ± 4,38	-	145,47 ± 5,67
JAP-42	21,24 ±0,77	45,17 ± 2,80	24,32 ± 0,51	22,90 ± 0,89	-	87,35 ± 6,40

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

n.e. - no ensayado

4.5.5 Compuestos con sistema polianular tricíclico: con grupos heterocíclicos unidos directamente a la posición C-3

En la Tabla 12 se recogen las estructuras y resultados de la bioevaluación de los derivados lignánicos tricíclicos que contienen un sistema heterocíclico directamente unidos a la posición C-3.

Como se puede observar en la Tabla 12 la mayoría los compuestos presentaron una alta citotoxicidad en promastigotes, con las excepciones de los lignanos JAP-28 y JAP35, unidos a un benzotiazol por la posición C-2, y del análogo JAP-37, unido a un resto de purina por la posición equivalente C-8. Todos los compuestos de la serie fueron más eficaces sobre amastigotes, salvo el mencionado benzotiazol JAP-28, que fue poco activo en las dos formas. A excepción del JAP-28, los índices de selectividad de todos los compuestos fueron positivos, siendo el derivado bencimidazólico JAP-29, el que mejor selectividad mostró (IS > 66.3). Los dos compuestos con el sistema heterocíclico del benzoxazol (JAP-30 y JAP-31), no presentaron toxicidad apreciable para esplenocitos, y el primero alcanzó un IS mayor que 16. Como puede finalmente apreciarse a través de las sustancias y valores en la Tabla 12, la hibridación de los lignanos del tipo del aldehído podofílico con restos heterocíclicos comunes en algunos fármacos, o en metabolitos endógenos, condujo a una familia de compuestos muy eficaces y selectivos frente a *Leishmania*.



Tabla 12.- Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de los compuestos con fragmentos heterocíclicos directamente unidos a la posición C-3 del lignano.

Resultados

	Proma	stigotes	Amastigotes			
	<i>L. major</i> IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-27	12,70 ± 1,82	16,3 ± 1,93	9,68 ± 1,79	86,23 ± 0,10	8,9	n.e.
JAP-28	> 100	> 100	99,45 ± 6,27	15,65 ± 0,58	-	47,46 ± 0,27
JAP-29	28,31 ± 1,35	> 100	2,24 ± 0,35	148,68 ± 66,95	66,8	9,91 ± 0,56
JAP-30	28,34 ± 4,66	13,90 ± 2,82	12,1 ± 0,41	> 200	> 16,5	46,77 ± 1,27
JAP-31	83,00 ± 6,39	19,4 ± 2,15	4,50± 0,0	> 200		8,83 ± 0,30
JAP-32	25,89 ± 5,09	16,1 ± 2,24	2,48 ± 0,21	71,82 ± 6,03	29,0	n.e.
JAP-33	10,36 ± 0,54	11,0 ± 0,69	8,89 ± 0,64	71,01 ± 1,50	8,0	65,90 ± 3,30
JAP-34	34,86 ± 1,28	34,3 ± 1,73	7,27 ± 0,21	135,79 ± 30,35	18,7	51,16 ± 3,65
JAP-35	> 100	> 100	42,31 ± 3,09	> 200	> 4,7	168,95 ± 17,62
JAP-36	30,88 ± 3,58	46,96 ± 5,25	21,24 ± 1,07	40,75 ± 6,52	1,9	95,31 ± 14,18
JAP-37	> 100	> 100	43,41 ± 2,08	53,31 ± 3,49	1,2	92,50 ± 6,85

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

n.e. - no ensayado

4.5.6 Otros compuestos tricíclicos y tetracíclicos angulares

Los compuestos pertenecientes a este grupo no tienen cerrado el anillo D o el anillo A. La mayor parte presentan una cierta diversidad funcional en los carbonos unidos a las posiciones 2 y 3 del conjunto hidronaftalénico, y otros contienen un anillo heterocíclico fusionado al sistema tricíclico entre las posiciones 3 y 4. Las estructuras y los resultados de su bioevaluación se muestran en la Tabla 13.

Como puede apreciarse, la mayoría de los cambios estructurales llevados a cabo para generar este grupo heterogéneo de sustancias, resultaron infructuosos. Tanto los cambios del grado de oxidación de los sustituyentes de las posiciones 2 y 3, como la apertura del anillo dioxólico A, o la fusión del isoxazol en las posiciones 3-4 condujeron a sustancias con baja o mediana actividad leishmanicida en comparación con el aldehído podofílico y la propia podofilotoxina: el cianocompuesto JAP-48, que resulto ser el más potente frente a la forma amastigote de *Leishmania*, resulto aún más tóxico para esplenocitos; mientras que los más selectivos, el lignoacrilato JAP-17 (IS = 4,5) y el isoxazol JAP-26 (IS = 3,5), resultaron también tóxicos para los hepatocitos humanos.

 Tabla 13.- Estructuras y resultados de actividad frente a L. major IRFP y L. infantum IRFP y toxicidad otros lignanos tricíclicos y tetracíclicos con fusión angular.



JAP-11











JAP-43

JAP-26

R₁

соон

COOCH3



	R
JAP-46	СООН
JAP-47	COOCH ₃
JAP-48	CN
JAP-17	ZZZ COOCH3

	Proma	stigotes	Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-11	> 100	76,82 ± 19,07	72,35 ± 2,72	38,02 ± 2,45	-	> 200
JAP-12	> 100	> 100	80,19± 2,86	37,31 ± 4,00	-	62,3 ± 5,65
JAP-13	> 100	> 100	27,15 ± 2,03	25,58 ± 3,32	-	57,3 ± 3,78
CSD-06	53,3 ± 5,82	> 100	76,07 ± 6,34	190,25 ± 15,99	2,5	> 200
JAP-07	> 100	> 100	> 100	115,31 ± 22,44	-	> 200
JAP-06	> 100	> 100	> 100	> 200	-	> 200
JAP-46	> 100	> 100	> 100	> 200	-	161,29 ± 5,43
JAP-47	30,13 ± 2,60	57,69 ± 5,69	84,88 ± 0,45	31,16 ± 1,11	-	159,88 ± 17,59
JAP-48	33,33 ± 1,57	33,21 ± 0,71	15,94 ± 0,42	6,44 ± 0,54	-	114,26 ± 3,77
JAP-17	41,08 ± 3,25	> 100	30,67 ± 1,85	137,37 ± 19,50	4,5	15,65 ± 0,79
JAP-43	> 100	> 100	> 100	> 200	-	62,94 ± 9,09
JAP-26	90,58 ± 8,11	> 100	30,45 ± 2,46	106,25 ± 126,7	3,5	23,64 ± 0,11

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.6 Quinonas

Existen numerosos compuestos quinónicos con usos farmacológicos, utilizados como antitumorales, antimicobacterianos, tripanocidas, antimaláricos o antivirales. Como ejemplo de este tipo de moléculas destacan las antraciclinas doxorubicina y daunorubicina y sus relacionados, aclarubicina, epirubicina, valrubicina etc., fármacos que se utilizan regularmente en la terapéutica antineoplásica, comportándose como inhibidores de la ADN topoisomerasa II, actuando como agentes intercalantes entre las bases de ADN e inhibiendo la transcripción y la síntesis proteica. Entre los fármacos antiparasitarios de naturaleza quinónica destaca la atovacuona, un derivado naftoquinónico relacionado con la ubiquinona, que inhibe el complejo citocromo bc1 y que asociada al proguanil se usa para prevenir la infección palúdica. Otros mecanismos de acción descritos para los compuestos quinónicos se relacionan con la generación de radicales libres, que producen daño en el ADN y peroxidación lipídica, alquilaciones del ADN, efectos directos sobre la membrana e inhibición de la telomerasa y las ADN topoisomerasas de tipo I (Bailly, 2000; Matsumoto y col., 2001; Salmon-Chemin y col., 2001; Balaña-Fouce y col., 2006; Singh y Dey, 2007).

4.6.1 Descripción de la síntesis química y de los tipos de compuestos quinónicos utilizados en el estudio

La preparación de las quinonas evaluadas en este trabajo se efectuó mediante condensación inicial de Diels-Alder entre terpenoides diénicos conjugados y benzoquinonas con diferente grado y tipo de sustitución. Como terpenoides naturales de partida se utilizaron el monoterpenoide comercial α -mirceno, y el diterpenoide mirceocomunato de metilo, aislado previa metilación, de extractos poco polares de especies de enebro (Gen: *Juniperus,* Fam: Cupressaceae), autóctonas y abundantes en amplias comarcas de Castilla y León.

Dependiendo de las condiciones de reacción y de las subsiguientes transformaciones realizadas sobre los compuestos resultantes, se pudieron obtener de manera controlada los distintos tipos estructurales que se muestran a continuación. En el caso del mirceno, las condensaciones conducen a terpenil-1,4-naftoquinonas (TNQs) y a productos de su aromatización y/o reducción, y a terpenilhidroquinonas (THQs), que ordinariamente se estabilizan mediante acetilación. La presencia de la insaturación olefínica en la porción terpenica (T), permite preparar derivados funcionalizados en la misma y acceder a los correspondientes derivados tricíclicos 1,4-antracenoquinonas (AQs) y a los diacetatos de 1,4-antracenohidroquinonas (AHQs) (Miguel del Corral y col., 1998; Gordaliza y col., 2000b) (Figura 82).



Figura 82.- Esquema simplificado de la preparación de compuestos quinónicos, hidroquinónicos y derivados a partir de α -mirceno

En el caso del diterpenoide mirceocomunato de metilo, las reacciones transcurren de forma similar, originando compuestos de naturaleza diterpeno-quinónica (DNQs) o hidroquinónica (DNHQs), cuyo resto diterpénico (D), también puede ser sometido a diversas transformaciones de funcionalización y modificación estructural, con el fin de ampliar la diversidad molecular a ensayar (Figura 83) (Miguel del Corral y col., 2001).



mirceocomunato de metilo

Figura 83.- Esquema simplificado de la preparación de derivados quinónicos e hidroquinónicos a partir de mirceocomunato de metilo.

Cuando se utiliza 1,4-naftoquinona, en lugar de un derivado de benzoquinona, se obtienen compuestos análogos, que contienen un anillo bencénico adicional, dando lugar en la condensación inicial a sistemas de 9,10-antraquinona (reducibles a 9,10-diacetoxiantracenos), que por ciclación posterior conducen a 5,12-naftacenoquinonas (reducibles a 5,12-diacetoxinaftacenos) (Figura 84) (Miguel del Corral y col., 2006b).



Figura 84.- Esquema simplificado de la preparación de otras quinonas e hidroquinonas policíclicas

A partir de sistemas 1,4-quinónicos, convenientemente sustituidos en las posiciones 2 y 3, se han preparado otros compuestos, globalmente denominados (D) TQF con uno o varios anillos heterocíclicos fusionados al quinónico como se ve representado en la Figura 85. En algunos casos el sistema heterocíclico creado puede quedar asociado/fusionado a otro anillo homocíclico o heterocíclico adicional (Miguel del Corral y col., 2006a).



Figura 85.- Preparación de sistemas quinónicos con heterociclos fusionados T(D)QF.

En total se evaluaron *in vitro* 38 compuestos quinolinicos. Para facilitar la comparación y discusión de resultados en términos de relación estructura-actividad, los compuestos se han agrupado en varios tipos y subtipos. Las tres primeras tablas (Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16) contienen los compuestos naftoquinonas y noaftohidroquinonas, la siguiente contienen los compuestos antracenoquinonas (Tabla 17), y una última que muestran los dos compuestos no incluidos dentro de ninguna de las tablas anteriores (Tabla 18).

4.6.2 Naftoquinonas terpénicas (TNQs)

Como puede observarse en la Tabla 14, los componentes de estos grupos estructurales tuvieron un comportamiento homogéneo, con excepción de la bromonaftoquinona JAMC-860. Todos, salvo el compuesto mencionado, mostraron una alta citotoxicidad en esplenocitos generando índices de selectividad inferiores a 1. Sin embargo, el índice selectivo de JAMC-860 fue de 4,1, siendo el más alto de todas las quinonas utilizadas en este estudio. Todas fueron activas frente a promastigotes de ambas especies, con la excepción de JAMC-860, que resultó inactiva frente a promastigotes de *L. infantum;* aunque demostró una cierta citotoxicidad sobre amastigotes de la misma especie. Se observa también que, salvo el compuesto nombrado, el resto obtuvieron peores resultados en amastigotes que en promastigotes. **Tabla 14.-** Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de algunas naftoquinonas terpénicas (TNQs).



JAMC-6004	18,8 ± 2,36	18,78 ± 0,64	> 100	6,02 ± 0,28	-	104,33 ± 8,17
JAMC-885	0,7 ± 0,02	0,57 ± 0,04	7,74 ± 0,066	0,74 ± 0,03	-	10,82 ± 0,78
JAMC-868	6,25 ± 1,14	11,74 ± 0,11	90,00 ± 4,28	3,36 ± 0,59	-	14,74 ± 0,84
JAMC-874	3,97 ± 0,1	11,40 ± 0,51	28,79 ± 1,37	11,31 ± 1,29	-	130,68 ± 5,97
JAMC-8011	9,84 ± 0,46	22,81 ± 0,63	> 100	3,12 ± 0,30	-	50,10 ± 2,42
JAMC-860 2	2,36 ± 1,45	> 100	12,83 ± 1,48	52,69 ± 5,79	4,1	160,32 ± 11,9

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes, realizados por triplicado para cada concentración, y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.6.3 Naftohidroquinonas terpénicas (TNHQs)

Las naftohidroquinonas terpénicas utilizadas en este trabajo mostraron Cl₅₀ bajas frente a los promastigotes de ambas especies (Tabla 15). Sólo los compuestos JAP-501 y JAP-103 presentaron una menor eficacia frente a los amastigotes que frente a los promastigotes de *L. infantum*. Todos los compuestos mostraron una gran toxicidad frente a esplenocitos, obteniéndose índices selectivos menores de 1.

En la línea hepática todos los compuestos mostraron actividad citotoxica, excepto el compuesto JAP-101 que fue inactivo en la línea tumoral de mamífero.

Tabla 15.- Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de algunas nafthidroquinonas terpénicas utilizadas en el estudio



	Promastigotes		Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-109	2,44 ± 0,01	7,19 ± 0,17	7,18 ± 0,28	1,87 ± 0,09	-	4,33 ± 0,28
JAP-103	2,16 ± 0,17	6,19 ± 0,03	17,79 ± 1,21	$0,20 \pm 0,02$	-	7,66 ± 0,26
JAP-101	10,66 ± 0,60	10,87 ± 0,46	3,61 ± 0,69	$0,32 \pm 0,01$	-	> 200
JAP-102	6,33 ± 0,33	12,74 ± 0,27	5,71 ± 0,59	$1,32 \pm 0,09$	-	27,95 ± 1,21
JAP-501	11,94 ± 0,81	15,33 ± 0,25	50,27± 0,32	3,69 ± 0,37	-	28,59 ± 1,28

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes, realizados por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.6.4 Naftohidroquinonas diterpénicas (DNHQs)

Los compuestos de este grupo, reunidos en la Tabla 16 mostraron valores de Cl₅₀ inferiores a 20 µM en todas las líneas celulares, excepto el compuesto JAM-440. Como puede apreciarse, se realizaron diferentes modificaciones del sistema diterpénico que afectaron principalmente al grupo carboxilo en C-4 y a la insaturación olefínica exocíclica del sistema hidronaftalénico. La esterificación-sililación voluminosa del grupo carboxílico presente en el compuesto JAP-118 disminuyó la actividad con respeto a la del JAP-104, con la función ácida libre. En cambio, la formación de ésteres metílicos simples y la degradación-acetilación de la posición C-4, que aparecen en las diterpenilquinonas JAP-107, JAP-113, JAP-114 y JAP-107, aumentaron la citotoxicidad con respecto al compuesto de partida, pero sin inducir selectividades apreciables. La introducción de un doble enlace olefínico en el puente que une la naftohidroquinona con el sistema

bianular del diterpeno (JAM-440), en contra de lo ordinariamente esperado, aumentó la Cl₅₀ del compuesto frente a todas la líneas celulares, como la epoxidación del anillo naftohidroquinona que aparece en el compuesto JAP-116, que tampoco mejoró el potencial leishmanicida del precursor, ni redujo su efecto tóxico sobre las células de mamífero.

Tabla 16.- Estructuras y resultados de actividad frente a *L. major* IRFP y *L. infantum* IRFP y toxicidad de los diacetilderivados de naftohidroquinonas diterpénicas (DNHQs) utilizadas en el estudio.



Resultados

	Promastigotes		Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAP-104	2,51 ± 0,23	11,68 ± 0,31	4,01 ± 0,50	0,87 ± 0,04	-	10,51 ± 0,70
JAM-416	0,12 ± 0,01	0,29 ± 0,01	4,24 ± 0,53	0,55 ± 0,04	-	3,40 ± 0,36
JAP-118	6,50 ± 0,54	12,31 ± 1,19	14,6 ± 0,01	2,05 ± 0,19	-	15,72 ± 1,49
JAP-107	1,59 ± 0,05	2,28 ± 0,02	$2,46 \pm 0,10$	0,17 ± 0,01	-	0,95 ± 0,06
JAP-106	0,16 ± 0,01	0,33 ± 0,01	4,34 ± 0,49	0,13 ± 0,01	-	1,95 ± 0,26
JAP-113	0,22 ± 0,01	0,66 ± 0,04	1,23 ± 0,05	$0,12 \pm 0,01$	-	2,24 ± 0,38
JAP-114	1,49 ± 0,02	3,45 ± 0,03	1,43 ± 0,06	0,07 ± 0,01	-	1,59 ± 0,08
JAM-463	$0,2 \pm 0,01$	0,29 ± 0,01	2,56 ± 0,16	0,47 ± 0,03	-	3,38 ± 0,33
JAM-422	2,98 ± 0,19	2,95 ± 0,20	1,92 ± 0,01	0,65 ± 0,04	-	11,27 ± 2,02
JAP-116	2,23 ± 0,16	5,97 ± 0,13	11,75 ± 1,61	0,58 ± 0,03	-	10,35 ± 0,93
JAM-440	30,87 ± 1,34	76,0 ± 8,11	54,63 ± 5,64	60,69 ± 2,29	1,1	181,81 ± 6,08

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes realizados por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.6.5 Terpenil y Diterpenil Antracenoquinonas (TAQs, DAQs) y Antracenohidroquinonas (TAHQs)

Las estructuras y resultados de actividad y toxicidad de los compuestos de estos grupos se presentan en la Tabla 17. Como se puede observar, para las antraceno quinonas, no se detectaron diferencias sustanciales de actividad relacionadas con la posición del sistema quinónico en el anillo extremo o interno. Todas las antracenoquinonas derivadas del mirceno (JAMC-6000, JAP-500, JAP-508, JAMC-859, JAM-6009 y JAMC-6079) obtuvieron valores de Cl₅₀ inferiores a 20 µM frente a promastigotes de ambas líneas celulares, siendo el mejor resultado el obtenido por el compuesto no sustituido en el anillo quinónico y cabeza de la serie, JAMC-6000. Salvo los compuestos JAP-508 y JAM-6005, que apenas variaron su actividad, el resto de antracenoquinonas produjo peores resultados de citotoxicidad en amastigotes que en promastigotes de *L. infantum.* Por otra parte, las Cl₅₀ de estos compuestos en esplenocitos fueron muy bajas, salvo en los compuestos con sustituyente nitrogenado, AP-859, JAM-6009 y JAMC-6079. Finalmente, las antracenoquinonas derivadas del mirceno con un menor tamaño de radicales (JAMC-6000 y JAP-500) mostraron las Cl₅₀ más bajas en células HepG2.

Las variaciones del anillo en las antraquinonas obtenidas por condensación de mirceno o diterpenos con la 1,4 naftoquinona (JAP-505, JAP-507, JAP-504 y JAP-506) no modificaron significativamente la actividad frente a promastigotes de *L. major* y la toxicidad para esplenocitos, siendo ésta similar para los compuestos con sustituyentes iguales (JAP-505≈JAP-504, JAP-507≈JAP-506). La actividad leishmanicida de estos compuestos en ambas formas celulares de *L. infantum* fue menor que la mostrada por

Jose Miguel Escudero Martínez

los anteriormente descritos. Incluso, el compuesto JAP-505 fue prácticamente inactivo frente a amastigotes. Paralelamente, este grupo de compuestos mostró escasa actividad sobre la línea hepática HepG2, aunque si fueron altamente tóxicos frente a esplenocitos. Debido a ese comportamiento frente a esplenocitos, la mayor parte de los compuestos produjo índices de selectividad muy bajos. Sólo los compuestos JAM-6013 y JAP-120 obtuvieron índices selectivos mayores de 2.

Entre las antracenohidroquinonas ensayadas, la JAM-6013 fue la que presentó el mayor índice de selectividad, aunque todas mostraron alta citotoxicidad para esplenocitos.

 Tabla 17.- Fórmulas químicas de las antraquinonas y antrahidroquinonas terpénicas utilizados en el estudio.



Resultados

	Proma	stigotes	Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAMC-6000	1,34 ± 0,02	1,20 ± 0,08	22,96 ± 2,11	0,70 ± 0,07	-	13,41 ± 1,30
JAP-500	4,03 ± 0,33	7,56 ± 0,14	14,17 ± 2,45	4,25 ± 0,28	-	29,74 ± 1,31
JAP-508	8,03 ± 0,29	16,14 ± 0,82	14,80 ± 1,91	5,36 ± 0,64	-	198,61 ± 14,25
JAMC-859	15,8 ± 0,37	19,94 ± 1,73	33,77 ± 5,24	49,51 ± 2,32	1,4	148,82 ± 8,55
JAM-6009	14,7 ± 0,47	13,53 ± 0,41	16,28 ± 2,13	20,16 ± 0,91	1,2	> 200
JAMC-6079	9,39 ± 0,26	12,50 ± 0,03	66,58 ± 3,29	18,94 ± 3,58	-	> 200
JAP-505	15,3 ± 1,18	69,64 ± 8,44	> 100	4,48 ± 0,40	-	82,87 ± 5,28
JAP-507	33,94 ± 2,81	85,42 ± 2,45	21,56 ± 2,37	22,75 ± 1,19	1,0	> 200
JAP-504	11,53 ± 0,3	18,19 ± 1,11	21,51 ± 1,11	5,24 ± 0,56	-	57,80 ± 1,65
JAP-506	30,98 ± 1,94	57,54 ± 0,22	44,83 ± 1,63	13,40 ± 1,35	-	146,64 ± 10,53
JAM-6013	3,96 ± 0,31	15,87 ± 1,08	$1,22 \pm 0,01$	2,60 ± 0,15	2,1	36,97 ± 2,14
JAM-6017	12,1 ± 1,07	16,62 ± 0,43	19,26 ± 1,58	12,11 ± 1,35	-	54,62 ± 5,25
JAP-108	2,00 ± 0,02	3,26 ± 0,07	$2,64 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	-	5,94 ± 0,31
JAP-120	27,7 ± 1,68	> 100	30,92 ± 3,74	72,80 ± 5,78	2,3	96,56 ± 5,87

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes realizados por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.6.6 Otros derivados quinónicos

Tanto el compuesto JAMC-6025 como JAP-119 presentaron una mayor capacidad leismanicida frente a *L. major* que frente a los promastigotes y amastigotes de *L. infantum* (Tabla 18). En células de mamífero la toxicidad de ambos compuestos fue menor que en los amastigotes dando índices selectivos positivos en ambos casos. En la línea hepática el compuesto JAMC-6025 mostró una Cl₅₀ mayor que JAP-119.

 Tabla 18.- Fórmulas químicas de los compuestos JAMC-6025 y JAP-119 utilizados en el estudio.



\sim	
	0
Соосна	

	JAMIC-6025			JAP-119		
	Promastigotes		Amastigotes			
	L. major IRFP	L. infantum IRFP	L. infantum IRFP	Esplenocitos	IS	HepG2
JAMC-6025	11,4 ± 1,56	39,00 ± 4,29	24,9 ± 0,30	50,93 ± 5,91	2,0	123,74 ± 8,06
JAP-119	5,40 ± 0,54	13,95 ± 0,45	7,23 ± 0,23	20,26 ± 1,04	2,8	87,56 ± 4,32

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes realizados por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.7 Purificación de la tubulina de *Leishmania* y optimización del ensayo de polimerización

Como ya se mencionó anteriormente, la podofilotoxina y sus derivados han sido descritos como inhibidores de la polimerización de la tubulina. Por ello, tras aislar y purificar la tubulina de *Leishmania*, se evaluó el efecto de los compuestos sobre el proceso de polimerización de la proteína.

La purificación se realizó a partir de extractos obtenidos de promastigotes de *L. infantum,* siguiendo el protocolo descrito en el apartado material y métodos con una columna DEAE-Sepharosa. El extracto proteico y las distintas fracciones obtenidas en el proceso de purificación fueron analizados mediante SDS-PAGE, y *western blot* con un anticuerpo frente a tubulina (Anti– α –Tubulin, Thermo). Como se puede observar en la Figura 86 la tubulina aparece en las fracciones 7 y 8, las cuales se recogieron y dializaron para realizar los ensayos de polimerización.



Figura 86.- (A) Gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie, en el que se identifican los diferentes pasos de la purificación de la tubulina de *L. infantum.* (B) Análisis de *western blot* realizado con las muestras que aparecen en la Figura 86A utilizando un anticuerpo frente a tubulina.

Con el fin de optimizar el ensayo de polimerización, se procedió a caracterizar la concentración mínima de proteína necesaria, pues la polimerización *in vitro* requiere de altas concentraciones de tubulina. Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado material y métodos, se realizó un ensayo de polimerización utilizando diferentes concentraciones de proteína (Figura 87). En la Figura 87B se representa la concentración

de proteína frente al incremento de absorbancia, registrado en las cinéticas de polimerización tras 40 min de incubación, en la que se observa que la polimerización resulta apreciable y cuantificable a partir de una concentración de 0,6 mg/mL de la proteína.



Figura 87.- (A) Cinéticas de polimerización realizadas con diferentes concentraciones de tubulina purificada de *Leishmania* y (B) relación entre la concentración de enzima y △Abs 450 nm transcurridos 40 min de incubación.

Para la realización de los ensayos se optó por una concentración de 1,2 mg/mL, pues ésta generaba cinéticas de polimerización en las que las diferencias de absorbancia entre los controles positivos y los negativos (sin polimerización) resultaban significativas (Figura 88).



Figura 88.- (A) Cinética de polimerización de tubulina purificada de *Leishmania* frente a diferentes concentraciones de podofilotoxina (PTT), con un control con el vehículo del compuesto (DMSO) y un control negativo con vinblastina (Vinb). (B) Porcentaje de polimerización respecto al control con DMSO tras 40 min de incubación.

4.7.1 Inhibición de la polimerización de tubulina de Leishmania

Todos los lignanos ensayados frente a *Leishmania* fueron evaluados como inhibidores de la polimerización de tubulina. Primero se realizó un cribado a una única concentración de 20 µM, para descartar aquellos que no afectaban a la polimerización. Los compuestos que afectaron a la polimerización pasaron a una segunda fase, donde fueron ensayados a diferentes concentraciones para poder calcular el coeficiente de inhibición 50 (Cl₅₀), concentración de compuesto que reduce a la mitad la polimerización de la tubulina con respecto al control, mediante ajuste no lineal con el programa SigmaPlot[®].

4.7.1.1 Inhibición de la polimerización por los lignanos con sistema polianular tetracíclico

El lignano tetracíclico que presentó una mayor inhibición de la polimerización fue la podofilotoxina (JAP-01), lactona natural y punto de partida para la preparación de los lignanos evaluados en este trabajo, seguido de la lactama (JAP-14), ambas con valores submicromolares de Cl₅₀. Por otra parte, se observaron diferencias entre los epímeros en posición C-4, a favor de los que mantenían el sustituyente en disposición alfa. Así, la Cl₅₀ de JAP-01 fue menor que la de JAP-03, la de CSD-12 menor que la de CSD-15 y la de CSD-02 menor que la de CSD-01 (Tabla 19).

Lactonas		Cl₅₀ (μM)	Lactama y otras Lactonas	Cl₅₀ (μM)	
_	JAP-04	7,86 ± 0,283	JAP-14	0,761 ± 0,042	
	JAP-09	4,24 ± 0,118	JAP-44	6,62 ± 1,51	
	JAP-05	>20	JAP-08	>20	
	JAP-01	0,320 ± 0,0261	JAP-45	>20	
	JAP-02	6,52 ± 0,454	CSD-08	2,38 ± 0,763	
	JAP-03	2,67 ± 0,115	CSD-13	4,58 ± 0,189	
	JAP-10	4,05 ± 0,197			
	M3R	3,46 ± 0,824			
	CSD-12	$1,14 \pm 0,144$			
	CSD-15	4,99 ± 0,291			
	CSD-02	3,44 ± 0,345			
	CSD-01	4,07 ± 0,118			
	CSD-10	6,93 ± 0,550			
	CSD-09	7,66 ± 0,610			
	CSD-04	4,42 ± 0,875			
	CSD-03	7,97 ± 1,45	Los valores se calcularon	a partir de las	
	CSD-11	8,81 ± 2,13	ensayos de inhibición,	ajustadas no	
	CSD-05	3,43 ± 0,496	linealmente mediante SigmaPlot®	el programa	
	M10E	5,55 ± 0,026			

Tabla 19.- Inhibición de la polimerización de tubulina de L. infantum por lignanos con sistema polianular tetracíclico
En el extremo contrario, los compuestos con valor de CI_{50} mayor de 20 μ M fueron el JAP-05 y JAP-45, que corresponden respectivamente con una estructura hidroxilada o extendida en el anillo E y el JAP-08 que posee el anillo C aromatizado, lo que determina la coplanaridad prácticamente completa del sistema tetracíclico, y elimina la ortogonalidad del grupo trimetoxifenilo, impidiendo la acomodación de las moléculas en el sitio activo, como en el caso de la extensión del anillo E bencénico a quinoxalínico.

4.7.1.2 Inhibición de la polimerización de tubulina por lignanos con sistema polianular tricíclico

Los compuestos con funciones aldehído en posición C-3 (Tabla 20) y sustituyentes de cadena alifática en el éster de la posición C-2 (JAP-16, JAP-51, JAP-52, JAP-55 y JAP-56) inhibieron la polimerización de la tubulina, obteniéndose los mejores resultados de Cl₅₀ con el éster alilico JAP-52 y el derivado lignoglicólico JAP55. Los compuestos con sustituyentes bencénicos en la posición C-2 (JAP-53, JAP-54 y JAP-57), también se comportaron como inhibidores de la polimerización, siendo el mejor el éster cinamílico JAP-53. La actividad de los compuestos con sustituyentes derivados de 6-cloropurina (JAP-59 y JAP-60) dependió de la longitud del puente de unión al aldehído podofílico, resultando inactivo el compuesto con un puente propilénico más corto (JAP-59) y activo el compuesto con puente hexilénico (JAP-60).

En el grupo de lignanos tricíclicos con función nitrogenada imínica unida a la posición C-3, los mejores resultados se obtuvieron con el derivado pirimidínico JAP-25 (Tabla 20). En concordancia con los resultados sobre promastigotes, resultó poco activa la etilenodiimina dimérica JAP-22 y prácticamente inactivas la azina dimérica JAP-49 y la oxima JAP-41.

En el grupo de lignanos con heterociclos unidos directamente a la posición C-3, el compuesto que obtuvo una mejor tasa de inhibición fue el imidazopiridil derivado JAP-36 seguido del bencimidazol JAP-34. También resultaron activos los benzoxazoles JAP-27 y JAP-30 y, por el contrario, fueron inactivos los benzotiazoles JAP-28 y JAP-35, otros derivados imidazólicos JAP-29 y JAP-37, y la purina JAP-32.

Función aldehído en posición C-3		Función nitrog	Función nitrogenada en posición C-3		Grupos heterocíclicos en posición C-3		
	Cl₅₀ (μM)		Cl₅₀(µM)		Cl₅₀ (μM)		
JAP-51	2,05 ± 0,322	JAP-50	12,1 ± 0,768	JAP-27	16,1± 2,05		
JAP-52	0,749 ± 0,038	JAP-38	7,093 ± 0,431	JAP-28	>20		
JAP-16	1,66 ± 0,077	JAP-18	2,86 ± 0,266	JAP-29	>20		
JAP-56	7,05 ± 0,698	JAP-49	>20	JAP-30	12,1 ± 1,18		
JAP-55	0,907 ± 0,082	JAP-19	5,65 ± 0,479	JAP-31	1,51 ± 0,05		
JAP-59	>20	JAP-20	1,16 ± 0,056	JAP-32	>20		
JAP-60	4,33 ± 0,396	JAP-21	4,89 ± 0,351	JAP-33	1,32 ± 0,014		
JAP-15	>20	JAP-22	>20	JAP-34	0,659 ± 0,012		
JAP-57	2,02 ± 0,022	JAP-39	4,31 ± 0,653	JAP-35	>20		
JAP-54	3,06 ± 0,252	JAP-25	0,782 ± 0,044	JAP-36	0,310 ± 0,001		
JAP-53	0,850 ± 0,043	JAP-24	1,64 ± 0,179	JAP-37	>20		
JAP-58	>20	JAP-23	9,03 ± 0,777				
JAP-61	>20	JAP-40	7,52 ± 1,10				
		JAP-41	>20				
		JAP-42	3,07±0,164				

Tabla 20.- Inhibición de la polimerización de tubulina de *L. infantum* por lignanos con sistema polianular triciclico y función aldehído, función nitrogenada (imina e hidrazona) o grupos heterocíclicos en la posición C-3.

Los valores se calcularon a partir de las curvas (anexo: VIII) obtenidas de los ensayos de inhibición, ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

Dentro del grupo sexto de lignanos de estructura variada, en el que se han incluido otros compuestos tricíclicos y tetracíclcos, las distintas modificaciones con apertura del anillo dioxólico A (JAP-06 y JAP-07), generaron compuestos que no inhibieron la polimerización. Sin embargo, aún en ausencia del citado anillo, los compuestos con anillo heterocíclico fusionado en la posición C-3—C-4 (JAP-43, JAP-26), sí mostraron actividad inhibitoria, siendo el isoxazol JAP-26, activo y con cierta selectividad frente al parásito, el que mostró mejor CI₅₀ del grupo frente a la polimerización de tubulina.

De los compuestos con apertura del anillo lactónico D (JAP-11, JAP-12, JAP-13 y CSD-06) solamente el hidroxiácido CSD-06 que puede considerarse precursor inmediato de su anologo tetracíclico lactónico, presentó cierta actividad inhibitoria.

Entre las moléculas con otros sustituyentes en posición C-3 (JAP-46, JAP-47, JAP-48 y JAP-17), la que presentó una mejor CI_{50} inhibitoria fue el éster vinílogo JAP-17, seguida de JAP-46 con un grupo ácido libre en dicha posición, siendo inactivos el diéster JAP-47 y el cianoéster JAP-48 (Tabla 21). Para finalizar este apartado, cabe resaltar que el ácido JAP-46, con capacidad inhibitoria notable para inhibir la polimerización de la tubulina, resultó prácticamente inactivo frente a las dos formas del parasito; lo que podría

implicar para el compuesto una dificultad de absorción y distribución, derivada probablemente de su naturaleza ionizada en las condiciones de pH del experimento frente al parásito.

	CI ₅₀
JAP-11	>20
JAP-12	>20
JAP-13	>20
CSD-06	11,9 ± 0,150
JAP-07	>20
JAP-06	>20
JAP-46	4,91 ± 0,324
JAP-47	>20
JAP-48	>20
JAP-17	1,18 ± 0,097
JAP-43	3,57 ± 0,533
JAP-26	0,371 ± 0,033

Tabla 21.- CI_{50} (μ M) de compuestos tricíclicos y tetracíclicos angulares con respecto a la inhibición de la polimerización de la tubulina de *L. infantum*.

Los valores se calcularon a partir de las curvas (anexo: VIII) obtenidas de los ensayos de inhibición, ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

4.8 Estudio del efecto inhibitorio sobre la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania*

Debido a los antecedentes establecidos sobre los mecanismos de acción de las epipodofilotoxinas antineoplásicas como inhibidoras de ADN topoisomerasas y de las quinonas como agentes intercalantes en el ADN, también se planteó en este trabajo llevar a cabo el estudio del posible efecto inhibitorio de los compuestos sobre la enzima ADN toposimoerasa IB de *Leishmania*. Dicha enzima resuelve problemas topológicos originados en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. Para ello se obtuvo y purificó esta proteína utilizando un sistema de expresión heteróloga en levaduras.

La topoisomerasa IB de *Leihsmania* está formada por dos subunidades de diferente tamaño, una de 636 aminoácidos (masa molecular teórica de 73 kDa), codificada por el gen LdTopIL, situado en el cromosoma 34, y otra de 262 aminoácidos (masa molecular teórica de 28 kDa), codificada por el gen LdTopIS, que se encuentra en el cromosoma 4. Ambas subunidades se asocian en proporción 1:1 para constituir una enzima catalíticamente funcional.

Con el fin de determinar si los compuestos estudiados inhibían la topoisomerasa IB de *Leihsmania* se purificaron las dos subunidades expresadas de manera simultánea en sistema de expresión heterólogo. Para ello se utilizó un vector biscistrónico de expresión en levaduras pESC-URA, que contiene los genes LdTopIL y LdTopIS (Figura 89). El vector pESC-URA con los genes LdTopIL y LdTopIS se transformó en levaduras EKY3 (carentes de ADN topoisomerasa IB), y con las colonias obtenidas se procedió a sobreexpresar y purificar la enzima, siguiendo el protocolo descrito en el apartado *material y métodos*.



Figura 89.- Esquema del vector biscistrónico pESC-URA con los genes LdTopIL y LdTopIS.

Los inhibidores de la topoisomerasa impiden la relajación del ADN superenrollado. Este proceso puede observarse y cuantificarse mediante un ensayo de inhibición de la relajación, en el que el ADN superenrollado (utilizado como sustrato de la enzima) y el ADN relajado (resultado de la actividad enzimática), pueden visualizarse en un gel de agarosa.

Todos los compuestos fueron probados frente a la topoisomerasa IB de *Leishmania*. Primero se realizó un cribado a una única concentración de 100 μ M, para descartar aquellos compuestos que no afectaban a la relajación. Los compuestos que afectaron a la topoisomerasa IB pasaron a una segunda fase, en la que fueron ensayados a diferentes concentraciones para poder calcular el coeficiente de inhibición 50 (Cl₅₀), concentración de compuesto necesaria para inhibir la relajación del 50% del ADN superenrollado.

4.8.1 Inhibición de la ADN topoisomerasa IB de Leishmania por lignanos

Dentro de la familia de los lignanos ensayados frente al parásito, se localizaron cuatro compuestos de estructuras variadas, tres tricíclicos sin anillo D y uno tetracíclico lactónico, con capacidad para inhibir la actividad de la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania*: El compuesto tricíclico JAP-35, con un sistema heterocíclico benzotiazólico unido a la posición C-3; otro compuesto tricíclico JAP-39, con función 2-hidroxifenilimina en posición C-3; un tercer compuesto tricíclico JAP-53, con función aldehído en la misma posición; y una lactona con función ortoquinónica en el anillo E, JAP-45 y con el sistema polianular tetracíclico, que no fue activa frente a *Leishmania* (Figura 90).

El lignano más potente fue la lactona-ortoquinónica JAP-45, con un valor de CI_{50} = 18,7 µM, seguido del benzotiazol JAP-35 y del aldehído JAP-53. El compuesto con función imina en posición C-3 inhibió débilmente la actividad de relajación del ADN.



Figura 90.- Resultados de ensayos de relajación de ADN con lignanos como inhibidores, en los que se puede observar el ADN relajado (R) por acción de la topoisomerasa IB y el ADN superenrollado del control (SC), como consecuencia de la inhibición provocada por el lignano. Gráficas obtenidas tras la cuantificación del ADN superenrollado en los diferentes carriles del gel, y valores calculados de la concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀).

4.8.2 Inhibición de la ADN topoisomerasa IB de Leishmania por quinonas

Dentro de los distintos grupos de quinonas e hidroquinonas evaluadas fueron más los compuestos que se comportaron como inhibidores de la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania*.

En el grupo de las naftoquinonas terpénicas cuatro de los seis compuestos demostraron su capacidad inhibitoria: JAMC-885, JAMC-868, JAMC-874 y JAMC-8011 (Figura 91).

Como se puede observar en la Figura 91 en este grupo los compuestos que se comportaron como mejores inhibidores de la topoisomerasa IB fueron la naftoquinona dibromada JAMC-868 y la anisidilaminoquinona JAMC-8011, con valores IC₅₀ de 13,5 y 23,5 μ M respectivamente. Los compuestos estructuralmente próximos JAMC-885 y JAMC-874, presentaron menor potencia inhibitoria.



Figura 91.- Resultados de ensayos de relajación de ADN con naftoquinonas terpénicas como inhibidoras, en los que se puede observar el ADN relajado (R) por acción de la topoisomerasa IB y el ADN superenrollado del control (SC), como consecuencia de la inhibición provocada por los compuestos. Gráfica obtenida tras la cuantificación del ADN superenrollado en los diferentes carriles del gel, y valores calculados de la concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀).

Ninguno de los diacetatos de antrahidroquinonas terpénicas incluidos en el estudio se comportó como inhibidor de la actividad topoisomerasa IB de *Leishmania;* pero si lo hicieron dos de las diacetilnaftohidroquinonas diterpénicas: JAP-118 y JAP-113 (Figura 92). La que mostro más actividad fue la JAP-118, que soporta un tert-butildimetilsilil éster (TBDMS) y que había resultado inactiva frente al parásito.



Figura 92.- Resultados de ensayos de relajación de ADN con naftohidroquinonas terpénicas diaciladas como inhibidoras, en los que se puede observar el ADN relajado (R) por acción de la topoisomerasa IB y el ADN superenrollado del control (SC), como consecuencia de la inhibición provocada por los compuestos. Gráficas obtenidas tras la cuantificación del ADN superenrollado en los diferentes carriles del gel, y valores calculados de la concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀).

En el grupo de las antraquinonas y diacetilantracenohidroquinonas terpénicas se observaron tres compuestos de naturaleza quinónica con capacidad inhibitoria: JAMC-6000, JAP-500 y JAP-504 (Figura 93). El compuesto con una concentración inhibitoria más baja (10,7 μ M), de todos los ensayados, fue el JAMC-6000, sin sustituyentes en el anillo quinónico.

Resultados



Figura 93.- Resultados de ensayos de relajación de ADN con antraquinonas terpénicas como inhibidoras, en los que se puede observar el ADN relajado (R) por acción de la topoisomerasa IB y el ADN superenrollado del control (SC), como consecuencia de la inhibición provocada por los compuestos. Gráficas obtenidas tras la cuantificación del ADN superenrollado en los diferentes carriles del gel, y valores calculados de la concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀).

Finalmente, el compuesto JAMC-6025, clasificado en el último grupo de los compuestos quinónicos, que realmente corresponde a una benzoacridinaquinona inhibió la topoisomerasa IB de *Leishmania* con una Cl₅₀ de 41,4 μM (Figura 94).



Figura 94.- Resultados del ensayo de relajación de ADN con la benzoacridinaquinona JAMC-6025 como inhibidora, en el que se puede observar el ADN relajado (R) por acción de la topoisomerasa IB y el ADN superenrollado del control (SC), como consecuencia de la inhibición provocada por el compuesto. Gráficas obtenidas tras la cuantificación del ADN superenrollado en los diferentes carriles del gel, y valor calculado de la concentración inhibitoria 50 (Cl₅₀).

4.9 Modelización de la tubulina de Leishmania

Actualmente no se ha resuelto la estructura cristalográfica de la tubulina de Leishmania, por ello se creó un modelo por homología utilizando las estructuras resueltas de dicha proteína en otras especies (Sus scrofa, Bos Taurus y Ovis aries), en base a la gran homología de la secuencia entre la tubulina de Leishmania y las secuencias de dichas especies, con porcentajes de identidad superiores al 80% en la subunidad α , y de más de 90% en la subunidad β . Esta homología es más que suficiente para la construcción del modelo, siendo considerado el 30-40% de similitud el límite inferior para que dicho proceso sea fiable (Rost, 1999).

4.9.1 Selección de la secuencia y plantillas

Analizando la secuencia de L. infantum JPC (Peacock y col., 2007) existente en la base de datos geneDB, se encontraron tres genes que codifican para la subunidad α de la tubulina, todos en el cromosoma 13, y seis genes que codifican para la β, cuatro de ellos situados en el cromosoma 8, uno en el 21 y otro en el 33 (Tabla 22).

Para el modelado de la subunidad α se seleccionó el gen LinJ.13.0330 que presentó mayor homología y una longitud similar a la tubulina de mamífero. Por el mismo motivo, se seleccionó LinJ.08.1280 para el modelado de la subunidad β (Tabla 22).

Tabla 22.- Genes que codifican para las tubulinas α y β en *L. infantum* JPC, y porcentaje de identidad entre ellos y la tubulina de Bos Taurus calculados con el programa Clustar Omega.

Gen	Cromosoma			1	2	3	4	
LinJ.13.1460	3	1	Bos Taurus	100.00				-
LinJ.13.0330	13	2	LinJ.13.0330	82,02	100.00			
LinJ.13.1450	13	3	LinJ.13.1450	55.56	65.38	100.		
		4	LinJ.13.1460	82,02	100.00	70,33	100.00	
				•				
Tub	ulina β							
Gn	Cromosoma			1	2	3	4	5
LinJ.21.2240	21	1	Bos taurus	100.00				
LinJ.33.0860	33	2	LinJ.08.1280	84.88	100.00			
LinJ.08.1280	08	3	LinJ.08.1290	84.20	99.10	100.00		
LinJ.08.1290	08	4	J.21.220	84.42	99.32	98.87	100.00	
		5	LinJ.33.0860	8420	99.32	99.77	98.65	100.00

Una vez seleccionadas las secuencias a usar, se buscaron las diferentes plantillas para realizar el modelo, utilizando el programa BLAST, la base de datos PDB y el servidor

Tubulina α

informático Swiss-Model. Se seleccionaron aquellos modelos con un porcentaje de identidad con la secuencia del gen superior al 83% para la subunidad α y de 80% para la subunidad β (Tabla 23).

Tabla 23.- BLAST de los genes LinJ.13.0330 y LinJ.08.1280, donde se muestra el porcentaje de identidad (Ident.), el código del cristal en la base de datos PDB (PDB), el año de publicación del mismo y la especie a la que corresponde el cristal.

Tubulina α				Tubulina β			
ldent.	PDB	Año	Especie	ldent.	PDB	Año	Especie
83 %	ЗНКВ-А	2009	Ovis aries	81%	4I4T-B	2013	Bos taurus
83 %	4DRX-A	2012	Ovis aries	81%	1FFX-B	2000	Bos taurus
83 %	1SA0-A	2004	Bos taurus	81%	2XRP-B	2010	Bos taurus
83 %	3DU7-A	2008	Bos taurus	81%	1TUB-B	1998	Sus escofra
83 %	414T-A	2013	Bos taurus	80%	4F61-B	2012	Ovis aries
83 %	3RYC-A	2012	Ovis aries	80%	3DU7-B	2008	Bos taurus
83 %	1FFX-A	2000	Bos taurus	80%	1Z2B-B	2005	Bos taurus
83 %	1TUB-A	1998	Sus escofra				
83 %	1JFF-A	2001	Bos taurus				
83 %	2XRP-A	2010	Bos taurus				

Para crear los diferentes modelos se usó el programa MODELLER, donde se combinaron las secuencias de *Leishmania infantum* con los diferentes cristales utilizados como plantilla. MODELLER usa un sistema de satisfacción de restricciones espaciales y es el programa de creación de modelos 3D por homología más usado (Bowie y col., 1991).

El programa MODELLER crea un primer modelo por transferencia de las coordenadas de los átomos equivalentes en el alineamiento, interpolando el resto de átomos en coordenadas indefinidas. Sobre este primer modelo, MODELLER aplica una función que busca la conformación de menos energía en el modelo, la conformación más plausible de la enzima en la naturaleza, desplazando los átomos de coordenadas indefinidas. Esta función de *pseudo-energía* se basa en una serie de restricciones, de forma que el modelo que viole el menor número de estas restricciones será el de menor energía y el más válido. Las restricciones son frecuentemente de dos tipos, estereoquímicas que se calcularán mediante campos de fuerza CHARMM-22 (MacKerell y col., 1998), basadas solo en el átomo y/o aminoácido, y las obtenidas por homología a partir de las proteínas relacionadas estructuralmente, e incluyen la distancia entre los carbonos alfa, la distancia N-O, los ángulos de las cadenas principal y los ángulos de la cadena lateral (Webb y Sali, 2014).

Se aplicó la función *ab initio* de MODELLER en algunos de los lazos del modelo para refinar estos motivos. Al aplicar la función *ab initio*, las coordenadas de los aminoácidos

de estas posiciones son calculadas de nuevo sin tener en cuenta la transferencia desde el modelo plantilla.

Los modelos obtenidos se refinaron mediante el servidor PELE (Protein Energy Landscape Exploration) que reduce la energía total del modelo, mediante la utilización de un algoritmo heurístico y la función Monte Carlo.



Figura 95.- (A) Datos de calidad del modelo obtenidos del servidor *Qmean*, donde se muestran desglosados los diversos parámetros usados para el cálculo de puntuación Qmean, (B) la representación esquemática de las dos subunidades con una escala de colores que muestra la fiabilidad de las zonas (roja: poco fiable, azul: muy fiable) y (C) gráfica que muestra la puntuación de fiabilidad por cada aminoácido de cada subunidad.

Una vez obtenidos los diferentes modelos, estos se analiza utilizando el programa Qmean, el cual comprueba la calidad de la estructura proteica dada, comparándola con los parámetros derivados de estructuras proteicas resueltas por difracción de rayo -X. Qmean calcula varios parámetros:

- La *puntuación Qmean (QMEAN score),* es una función compuesta, que estima los errores tanto globales (para toda la estructura) como locales (para cada aminoácido), sobre un modelo (Benkert y col., 2008; Benkert y col., 2009b). Es un valor entre 0 y 1, siendo 1 el modelo perfecto.
- Puntuación-Z (Z-score), proporciona una estimación de la calidad global del modelo en referencia a los modelos obtenidos por rayos-X, usándose los modelos con un 30% de homología y una resolución inferior a 2 Å. Es una estimación del grado de "naturalidad" del modelo ((Benkert y col., 2011)
- *Gráfico de error por residuo,* muestra la predicción de error por residuo.

Para el modelo de la tubulina formado por las dos subunidades, obtuvimos un valor para *Qmean* de 0,604 y para Z de -1,64. Al retirar el extremo C-terminal, la calidad del modelo aumentó ligeramente (Qmean = 0,621; Z = -1,53), por lo que este último modelo fue el utilizado para el *docking* (Figura 95).

4.10 Docking

Para realizar el *docking* de los compuestos y los modelos en mamífero y *Leishmania* se usó el programa AUTODOCK 4.2 que fue el más usado y con mayor número de publicaciones entre los años 1990-2013 (25,87 %) (Chen, 2015). Autodock basa su funcionamiento en una ecuación semi-empírica, en el que el ciclo termodinámico de Wesson y Eisenberg (Morris y col., 1998), donde la función *scoring* se define por una *"master equation"* que asume el carácter aditivo de los componentes de la energía libre entre el ligando y el receptor (Ajay y Murcko, 1995).

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{puenteH} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Los cuatro primeros términos corresponden a la mecánica molecular, que considera las interacciones de Van der Waals, formación de puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas y desviaciones de la energía covalente. ΔG_{Tot} contempla las traslaciones y las rotaciones globales, mientras que ΔG_{sol} incluye la desolvatación del ligando tras la unión y el efecto hidrofóbico. Los diferentes coeficientes (ΔG) se determinan empíricamente mediante regresión lineal sobre un conjunto de complejos proteínaligando depositados en la base PDB cuya constante de inhibición es conocida.

Para un mejor *docking* se eliminaron las moléculas de H₂O y se añadieron los átomos de H que servirán como receptores. Para ello se usaron las herramientas presentes en AutoDockTools. El ligando se obtuvo de la base de datos PDB, o se construyó mediante el programa ChemDraw refinándose mediante las funciones de programa.

En primer lugar se situaron el receptor y el ligando en una malla tridimensional que facilita los cálculos. Esta malla se generó con la función AutoGrif, que consiste en una red de puntos regularmente espaciados entre ellos, que cubren las regiones a estudiar de las moléculas. La distancia entre los puntos puede varia entre 0,2 y 1.0 Å, aunque el valor determinado es 0,375 Å (aproximadamente un cuarto de la distancia de un enlace C-C). Cada átomo se sitúa entre ocho puntos de la malla y se le asigna un potencial electrostático, relacionado con las fuerzas e interacciones que sufre ese átomo al interaccionar con el resto de átomos de la molécula. El potencial electrostático se calcula mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann (Seeliger y de Groot, 2010).

AutoDock determina las fuerzas de internación en dos pasos. Un primer paso calcula las fuerzas transitorias del receptor y el ligando por separado, y en un segundo paso evalúa las interacciones combinadas de ligado y receptor. Finalmente, la energía final de cada conformación se obtiene por interpolación trilienal de los valores de afinidad de los puntos de la malla.

Como ya se ha mencionad, la sensibilidad a la colchicina en mamíferos y tripanosomatidos difiere considerablemente, esto puede deberse a los polimorfismos presentes en este lugar de unión en la proteína de los parásitos. Evaluando los polimorfismos en el lugar de unión de la colchicina en la tubulina de *Leishmania* y en otras especies (Figura 96), se realizó un estudio de *Docking* con la enzima de *Bos taurus* (para la cual existe una estructura resulta), mutada con los polimorfismos encontrados en *Leishmania* para de evaluar como afectaban estas mutaciones a la energía de unión de la colchicina.

Los polimorfismos más destacables se pueden agrupar en tres sitios y un aminoácido aislado en posición 204 (Figura 96). Los polimorfismos son:

- En la **posición 240,** que corresponde a la hélice H7. En *Bos taurus* esta presente una treonina mientras que en *Leishmania* hay una cisteína.
- En el Sitio 1, que abarca el lazo T7 y la hélice H8, hay dos polimorfismos. Uno en la posición 250, en *Bos taurus* hay una alanina y en *Leishmania* una serina; y en la posición 259 donde una metionina es sustituida por una leucina en *Leishmania*.
- En el Sitio 2 que abarca la lámina S8 hay tres polimosfismos. Los dos primeros polimorfismos se sitúan en las posiciones 315 y 314, donde una valina y una alanina son sustituidos por una alanina y una seria en *Leishmania*. El otro polimorfismo se sitúa en la posición 318, donde la isoleucina presente en *Bos taurus* es sustituida por una leucina.
- En el Sitio 3 que abarca la lámina S9 hay cuatro polimorfismos. Una sustitución de una valina por una isoleucina en posición 351. Los otros tres polimorfismos se sitúan en las posiciones 353-355, donde el trio treoninaalanina-valina es sustituido en *Leishmania* por serina-serina-isoleucina.



Figura 96.- Alineamiento de parte de la secuencia peptídica de la subunidad β de la tubulina de *Bos taurus, Saccharomyces cerevisiae, Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei* donde se señalan en amarillo los polimorfismos implicados en el sitio de unión a la colchicina.

En la Tabla 24 se recogen las energías de *Docking* para el modelo 4O2B de *Bos Taurus* y para las diferentes modelos con las mutaciones interaccionando con la podofilotoxina y la colchicina.

	Podofilotoxina	Colchicina
WT	-8,9 Kcal/mol	-10,3 Kcal/mol
Thr240Cys	-9,0 Kcal/mol	-10,2 Kcal/mol
Sitio I		
Ala 250Ser	-8,8 Kcal/mol	-8,0 Kcal/mol
Met259Leu	-8,9 Kcal/mol	-9,2 Kcal/mol
Ala250Ser, Met259Leu	-8,1 Kcal/mol	-8,1 Kcal/mol
Sitio II		
Val315Ala	-9,0 Kcal/mol	-10,3 Kcal/mol
Ala316Ser	-8,5 Kcal/mol	-8,7 Kcal/mol
lle318Leu	-8,7 Kcal/mol	-9,1 Kcal/mol
Val315Ala, Ala316Ser, Ile318Leu	-8,3 Kcal/mol	-8,9 Kcal/mol
Sitio III		
Val351lle	-8,7 Kcal/mol	- 9,9 Kcal/mol
Thr353Ser	-9,0 Kcal/mol	-10,2 Kcal/mol
Ala354Ser	-9,1 Kcal/mol	-9,1 Kcal/mol
Val355Ile	-8,7 Kcal/mol	-8,8 Kcal/mol
Val351lle, Thr353Ser, Ala54Ser, Val355lle	-8,4 Kcal/mol	-8,7 Kcal/mol
Todos los polimorfismos	-8,1 Kcal/mol	-

 Tabla 24.- Diferentes energías de docking para el modelo 4O2B de Bos taurus (WT) y para los diferentes polimorfismos de Leishmania, para la podofilotoxina y la colchicina.

4.11 Superficie del sitio de unión

La superficie del sitio de unión se calculó mediante el programa CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins) (Dundas y col., 2006) que se basa en la triangulación de Delaunay y la forma α (*Alpha shape*). De este modo se calculó la superficie y el volumen del sitio de unión de la colchicina en la tubulina de mamíferos, utilizando el modelo 402B existente en la base de datos PDB, que corresponde al cristal de la tubulina de *Bos Taurus* con la colchicina. En este modelo la superficie del sitio de unión a colchicina es de 726,6 Å³. La superficie en el modelo *Leishmania* es de 696,0 Å³ (Figura 97).



Figura 97.- Representación de un dímero de tubulina con la superficie del bolsillo de unión a colchicina, en mamifero (A, verde) y en *Leishmania* (B, azul).



5 Discusión

5.1 Mecanismo de acción de los derivados de la podofilotoxina en *Leishmania*

La actividad farmacológica de los derivados de la podofilotoxina está ligada al efecto despolimerizador sobre los microtúbulos de tubulina, con este mecanismo primario de acción, se han explicado sus efectos antiinflamatorios, antivirales, cardiovasculares y sobre el sistema nervioso central. Pese a todo esto, el mayor interés que han despertado se debe a la actividad citotóxica, antiparasitaria y antitumoral (Gordaliza y col., 2000a).

La α y β tubulina de *Leishmania* – como en el resto de las especies – son proteínas muy conservadas filogenéticamente compartiendo una homología del 97-99% con las α y β tubulina humanas (Yakovich y col., 2006). Sin embargo, el dominio de unión a la colchicina difiere significativamente con el de mamíferos, lo que da lugar a diferencias de citotoxicidad entre el patógeno y su hospedador. Por ejemplo, la Cl₅₀ para la colchicina en el hombre se encuentra en torno a 4,5 µM, mientras que en *Leishmania* es mayor de 100 µM (Werbovetz y col., 1999), en *Trypanosoma* se necesita una concentración de 500 µM para disminuir un 30% su crecimiento (Filho y col., 1978) y en *Saccharomyces* no es activa (Haber y col., 1972). Estas diferencias afectan a otros compuestos con afinidad por este sitio de unión como la podofilotoxina y sus derivados y constituyen una base interesante para la búsqueda de nuevos fármacos (Traub-Cseko y col., 2001).



Figura 98.- (A) Representación de un dímero de tubulina con los motivos implicados en la unión a fármacos en el sitio de la colchicina, (B) su disposición en ausencia de fármaco y (C) en presencia de podofilotoxina (naranja).

Jose Miguel Escudero Martínez

El sitio de unión a la colchicina se sitúa en la unión de las dos subunidades α y β . Formado por las láminas S8 y S9; las hélices H7 y H8; el lazo de la subunidad β que se forma entre ellas (T7); y el lazo T5 de la subunidad α (Ravelli y col., 2004). Cuando la colchicina u otra molécula se une a este sitio, el anillo trimetoxifenilo desplaza el Asn249 del lazo T7 (Dorleans y col., 2009), afectando a las hélices H7 y H8 y las láminas S8 y S9, ocasionando el desplazamiento de 9 Å del lazo M. Esto hace que el dímero de tubulina adquiera de forma permanente la estructura curva que impide la formación de microtúbulos (Figura 98) (Ravelli y col., 2004).

Se define como farmacóforo el conjunto de rasgos estructurales de una molécula que son reconocidos en su sitio de unión y son responsables de su actividad biológica. En las moléculas que se unen al sitio de unión a la colchicina se han descrito siete farmacóforos, tres aceptores de enlaces de hidrógeno (A1, A2, A3), un dador de enlaces de hidrógeno (D1), dos centros hidrofóbicos (H1, H2) y un grupo plano (R1). Los dos farmacóforos hidrofóbicos interaccionan con Metβ259 (H1), Leuβ255 (H2), Alaβ316 (H2) y Valβ318 (H2); los susceptibles de formar puentes de hidrógeno interaccionan con Valα181 (A1), el azufre de la Cysβ241 (A2) y con el nitrógeno de Alaβ248 o Leuβ250 (A3); finalmente, el dador de enlaces de hidrógeno interacciona con Thrα177 (D1) (Figura 99) (Nguyen y col., 2005; Massarotti y col., 2012). De los siete farmacóforos descritos A2, H1, H2 y R1 son esenciales para una buena interacción ligando-proteína (Nguyen y col., 2005).

En el sitio de unión a la colchicina sólo intervienen tres aminoácidos de la subunidad α : Gly17, Asp101 y Thr181 (Ravelli y col., 2004). Dichos aminoácidos (Figura 100), al igual que Asn149 (Figura 101) se encuentran conservados en la mayoría de las especies, incluida *Leishmania*, sin polimorfismos destacables.



Figura 99.- Representación esquemática de los diferentes farmacóforos sobre la podofilotoxina. En la primera imagen (A), se observan los tres farmacóforos aceptores de electrones A1 (rojo), A2 (rosa), A3 (amarillo); el dador de electrones D1 (morado) y uno hidrofóbico H1 (azul). En la segunda imagen (B) se observa la otra interacción hidrofóbica H2 (azul) y el grupo planar R1 (verde).

Bos taurus	MRECISIHVGQAGVQINNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKT-IGGGDDSFNTFFSETGAG	59
Drosophila melanogaster	MRECISIHVGQAGVQINNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKT-VGGGDDSFNTFFSETGAG	59
Saccharomyces cerevisiae	MREVISINVGQAGCQINNACWELYSLEHGIKEDGHLEDGLSKPKGGEEGFSTFFHETGYG	60
Leishmania infantum	MREAICIHIGQAGCQVNNACWELFCLEHGIQPDGSMPSDKC-IGVEDDAFNTFFSETGAG	59
Trypanosoma brucei	MREAICIHIGQAGCQVNNACWELFCLEHGIQPDGAMPSDKT-IGVEDDAFNTFFSETGAG	59
Bos taurus	KHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKE <mark>D</mark> AANNYARGHYTIGKEIIDLVL	119
Drosophila melanogaster	KHVPRAVFVDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLVL	119
Saccharomyces cerevisiae	KFVPRAIYVDLEPNVIDEVRTGRFKELFHPEQLINGKEDAANNYARGHYTVGREIVDEVE	120
Leishmania infantum	KHVPRCIFLDLEPTVVDEVRTGTYRQLFNPEQLVSGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLAL	119
Trypanosoma brucei	KHVPRAVFLDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLCL	119
Bos taurus	DRIRKLADQCTGLQGFLVFHSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVS	179
Drosophila melanogaster	DRIRKLADQCTGLQGFLIFHSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKKSKLEFAIYPAPQVS	179
Saccharomyces cerevisiae	ERIRKMADQCDGLQGFLFTHSLGGGTGSGLGSLLENLSYEYGKKSKLEFAVYPAPQLS	180
Leishmania infantum	DRIRKLADNCTGLQGFMVFHAVGGGTGSGLGALLLERLSVDYGKKSKLGYTVYPSPQVS	179
Trypanosoma brucei	DRIRKLADNCTGLQGFLVYHAVGGGTGSGLGALLLERLSVDYGKKSKLGYTVYPSPQVS	179
Bos taurus	AVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSIT	239
Drosophila melanogaster	AVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLIGQIVSSIT	239
Saccharomyces cerevisiae	SVVEPYNTVLTTHTTLEHADCTFMVDNEAIYDICKRNLGISRPSFSNLNGLIAQVISSVT	240
Leishmania infantum	AVVEPYNCVLSTHSLLEHTDVATMLDNEAIYDLTRRSLDIERPSYTNVNRLIGQVVSSLT	239
Trypanosoma brucei	AVVEPYNSVLSTHSLLEHTDVAAMLDNEAIYDLTRRNLDIERPTYTNLNRLIGQVVSSLT	239
Bos taurus	ASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPA	299
Drosophila melanogaster	ASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPLVTYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPA	299
Saccharomyces cerevisiae	ASLRFDGSLNVDLNEFQTNLVPYPRIHFPLVSYAPILSKKRATHESNSVSEITNACFEPG	300
Leishmania infantum	ASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFVLTSYAPVVSAEKAYHEQLSVADITNSVFEPA	299
Trypanosoma brucei	ASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFVLTSYAPVISAEKAYHEQLSVSEISNAVFEPA	299
Bos taurus	NQMVKCDPRHGKYMACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTGFKVGINYQP	359
Drosophila melanogaster	NQMVKCDPRHGKYMACCMLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKVGINYQP	359
Saccharomyces cerevisiae	NQMVKCDPTKGKYMANCLLYRGDVVTRDVQRAVEQVKNKKTVQMVDWCPTGFKIGICYEP	360
Leishmania infantum	GMLTKCDPRHGKYMACCLMYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYQP	359
Trypanosoma brucei	SMMTKCDPRHGKYMACCLMYRGDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDWSPTGFKCGINYQP	359
Bos taurus Drosophila melanogaster Saccharomyces cerevisiae Leishmania infantum Trypanosoma brucei	PTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEGMEEGEFS PTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEGMEEGEFS PSVIPSSELANVDRAVCMLSNTTAIADAWKRIDQKFDLMYAKRAFVHWYVGEGMEEGEFS PTVVPGGDLAKVQRAVCMIANSTAIAEVFARIDHKFDLMYSKRAFVHWYVGEGMEEGEFS	419 419 420 419 419
Bos taurus Drosophila melanogaster Saccharomyces cerevisiae Leishmania infantum Trypanosoma brucei	EAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEGEEY 451 EAREDLAALEKDYEEVGMDSGDGEGEGAEEY- 450 EAREDLAALERDYIEVGADSYAEEF 445 EAREDLAALEKDYEEVGAESADDMGEEDVEEY 451 EAREDLAALEKDYEEVGAESADMDGEEDVEEY 451	

Figura 100.- Alineamiento de la secuencia peptídica de la subunidad α de la tubulina de *Bos taurus, Drosophila melanogaster, Saccharomyces cerevisiae, Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei.* Se señalan en verde los aminoácidos implicados en el sitio de unión a la colchicina.

Bos taurus Drosophila melanogaster Saccharomyces cerevisiae Leishmania infantum Trypanosoma brucei	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGDSDLQLERINVYY MLIGARPIHRVYDGVHGWPKPRSRAQTCFWEIISDEHGIDATGAYHGDSDLQLERINVYY MREIIHISAGQYGNQIGAAFWETICGEHGLDFNGTYHGHDDIQKERLMVYF MREIVSCQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPTGTYQGDSDLQLERINVYF	51 60 51 51 51
Bos taurus	NEATGNKYVPRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAE	111
Drosophila melanogaster	NEASGGKYVPRAVLVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAE	120
Saccharomyces cerevisiae	NEASSGKWVPRSINVDLEPWTIDAVRNSAIGNLFRPDNYIFGQSSAGNVWAKGHYTEGAE	111
Leishmania infantum	DESTGGRYVPRAVLMDLEPGTMDSVRAGPYGQLFRPDNFIFGQSGAGNNWAKGHYTEGAE	111
Trypanosoma brucei	DEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYGQIFRPDNFIFGQSGAGNNWAKGHYTEGAE	111
Bos taurus	LVDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVMP	171
Drosophila melanogaster	LVDSVLDVVRKEAESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTYSVVP	180
Saccharomyces cerevisiae	LVDSVMDVIRREAEGCDSLQGFQITHSLGGGTGSGMGTLLFSKIKEELPDRMMATFSVLP	171
Leishmania infantum	LIDSVLDVCRKEAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLLISKLREEYPDRIMMTFSVIP	171
Trypanosoma brucei	LIDSVLDVCCKEAESCDCLQGFQICHSLGGGTGSGMGTLLISKLREQYPDRIMMTFSIIP	171
Bos taurus	H7	231
Drosophila melanogaster	SPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYSIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSA	240
Saccharomyces cerevisiae	SPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSL	231
Leishmania infantum	SPKTSDTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEALYDICFRTLKLTTPTFGDLNHLVSA	231
Trypanosoma brucei	SPRVSDTVVEPYNTTLSVHQLVENSDESMCIDNEALYDICFRTLKLTTPTFGDLNHLVSA	231
Bos taurus Drosophila melanogaster Saccharomyces cerevisiae Leishmania infantum Trypanosoma brucei	Lazo T7 H8 Lazo M TMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVPFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQ TMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVPFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQ VMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNLVPFPRLHFFMVGYAPLTALGSQSFRSLTVPELTQ VMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLVPFPRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVAELTQ VVSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLVPFPRLHFFMMGFAPLTSRGSQQYRGLSVPELTQ	291 300 291 291 291
Bos taurus	S8 S9	351
Drosophila melanogaster	QMFDSKNMMAACDPRHGRYLTVAAIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVENIPNNVKT	360
Saccharomyces cerevisiae	QMFDAKNMMAACDPRHGRYLTVAAIFRGRMSMKEVDEQMLNIQNKNSSYFVENIPNNVKT	351
Leishmania infantum	QMFDAKNMMAAADPRNGRYLTVAAFFRGRVSVKEVEDEMHKVQSKNSDYFVENIPNNVQT	351
Trypanosoma brucei	QMFDAKNMMQAADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSSYFIENIPNNIKS	351
Bos taurus	AVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEA	411
Drosophila melanogaster	AVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEA	420
Saccharomyces cerevisiae	AVCSVAPQGLDMAATFIANSTSIQELFKRVGDQFSAMFKRKAFLHWYTSEGMDELEFSEA	411
Leishmania infantum	SICDIPPKGLKMSVTFIGNNTCIQEMFRRVGEQFTGMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEA	411
Trypanosoma brucei	SVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMFRRVGEQFTLMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEA	411
Bos taurus Drosophila melanogaster Saccharomyces cerevisiae Leishmania infantum Trypanosoma brucei	ESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEGGEDEA	

Figura 101.- Alineamiento de la secuencia peptídica de la subunidad β de la tubulina de *Bos taurus, Drosophila melanogaster, Saccharomyces cerevisiae, Leishmania infantum y Trypanosoma brucei.* Se señalan en verde los motivos implicados en el sitio de unión a la colchicina con la Cys241 resaltada en amarillo; también se señala el lazo M en azul.



Figura 102.- (A) Modelo de tubulina de *Leishmania infantum*, donde se muestran las dos cisteínas al final de la hélice H7 (verde), la Cys241 (amarillo) y la Cys240. (B) *Docking* de la colchicina en el modelo de tubulina de mamífero 4O2B y (C) el modelo con la mutación Thr240Cys, marcada en morado. (D) *Docking* de la podofilotoxina en los modelos 4O2B y (E) 4O2B Thr241Cys.

Dentro de los motivos implicados en el sitio de unión a colchicina podemos encontrar diferentes polimorfismos entre especies. Una de las diferencias más destacadas se encuentra en la Cys241 de la región H7 (β 224-243) (Figura 101) (Bai y col., 2000), la cual está implicada en la interacción con el farmacóforo A2, que corresponde con el anillo A (trimetoxifenilo) de la colchicina y el anillo E de la podofilotoxina. En *S. cerevisiae* y el isotipo Clase-III de tubulina humana no está presente dicha cisteína y la colchicina no es efectiva (Haber y col., 1972; Stengel y col., 2010).

Tanto en *Leishmania* como en *Trypanosoma*, la Cys241 está presente, sin embargo, la Thr240 conservada en el resto de especies, se encuentra sustituida por una cisteína (Figura 101). Aunque por proximidad pudiera parecer que el polimorfismo en la posición 240 podría tener importancia en el sitio de unión, según los resultados bioinformáticos obtenidos en este trabajo se demuestra que esto no es así. El *docking* de la podofilotoxina y la colchicina en el modelo con este único aminoácido mutado (402B Thr241Cys) no mostró diferencias conformacionales ni un aumento en la energía de unión (Figura 102 B, C, D y E). Esto podría deberse a que la Cys240 y la Cys241 se sitúan al final de la hélice H7, donde las cadenas laterales de los aminoácidos no interaccionan entre ellas al tener diferente orientación (Figura 102A).

Tras analizar la secuencia de la subunidad β de *Leishmania* con la de mamífero (*Bos taurus*) y comparar las regiones implicadas en la unión de la podofilotoxina al sitio de unión de la colchicina, se identificaron varios polimorfismos que se pueden dividir en tres regiones, atendiendo a su disposición topológica en el bolsillo de unión (Figura 101). Esta clasificación ya ha sido utilizada con anterioridad en trabajos de resistencia a la colchicina en kinetoplastidos (Luis y col., 2013). La primera región estaría formada por el lazo T7 y la hélice H8, la segunda por la lámina S8 y la tercera por la lámina S9.



Figura 103.- *Docking* de la colchicina (A, B, C y D) y la podofilotoxina (E, F, G y H) en el modelo de tubulina de *Bos taurus* 402B (A y E) y *docking* de la colchicina y la podofilotoxina en el modelo 402B con las mutaciones Ala250Ser (B y F), Met259Leu (C y G) y ambas mutaciones (D y H). Las diferentes mutaciones están marcadas en violeta.

En la primera región situada en el lazo T7 y hélice H8, la Ala250 se encuentra sustituida por una Ser y la Met259 por una Leu. Los radicales de ambos residuos están orientados hacia el sitio de unión. La alanina es un aminoácido alifático no polar, mientras que la serina es polar y sin carga, donde el grupo hidroxi puede funcionar como un donador/aceptor formando puentes de hidrógeno, aumentado la polaridad e hidrofobicidad del sitio de unión. Sin embargo, tanto la metionina como la leucina, tienen radicales no polares alifáticos, de modo que esta sustitución no afecta esencialmente a la hidrofobicidad del sitio de unión (Figura 104). El estudio de *docking* realizado con el modelo de *Bos taurus* mutado en la Ala250 (402B Ala250Ser), en la Met259 (402B Met259Leu) y en ambos aminoácidos simultáneamente (402B Ala250Ser Met259Leu), se observa un desplazamiento del anillo trimetoxifenilo de la colchicina y la podofilotoxina, que interaccionarían con la Ser250 y no con la Cys241 del lazo T7. Este cambio de posición implicaría que la molécula no dificultaría el movimiento del lazo T7 y no tendría efecto apreciable en el cambio conformacional de la proteína (Figura 103).



Figura 104.- Superficie hidrofóbica del sitio de unión a colchicina de mamífero (*Bos taurus*) (A) y *Leishmania* (B) según la escala hhHydrophobicity, en la que se muestra el incremento de energía libre de Gibbs por aminoácido (ΔG^{aa}) (Hessa y col., 2005).



Figura 105.- Situación de los aminoácidos de la lámina S8 y S9 en el sitio de unión de la colchicina cuando se sitúa una molécula de podofilotoxina. En violeta aparecen los aminoácidos de la tubulina de *Leishmania* que difieren de los de la tubulina de mamífero (*Bos taurus*).

En la segunda región en la lámina S8 encontramos que la Val315 se encuentra sustituida por una Ala, la Ala316 por una Ser y la lle318 por una Leu. Los polimorfismos en los aminoácidos 315 y 318 no afectaron al sitio de unión, pues el radical del aminoácido 325 se dispone en el lado de la lámina que no interacciona con dicho lugar (Figura 105). La isoleucina y la leucina involucradas en la posición 318, son aminoácidos muy parecidos que generan pocos cambios en la unión de la podofilotoxina y la colchicina (Figura 106C y G). Por el contrario con el polimorfismo en la posición 316, cuando una alanina aminoácido no polar alifático, es sustituida por una serina, aminoácido polar sin carga, se produce un aumento del carácter hidrofílico de la zona (Figura 104) y un cambio conformacional que desplaza el anillo trimetoxifenilo (Figura 106B) de la colchicina, sin afectar apreciablemente a la unión en el caso de la podofilotoxina (Figura 106F). Este polimorfismo puede observarse igualmente en *Acanthamoeba*, organismo que también es resistente a la colchicina (Henriquez y col., 2008).



Figura 106.- *Docking* de la colchicina (A, B, C y D) y la podofilotoxina (E, F, G y H) en el modelo de tubulina de *Bos taurus* 4O2B (A y E) y *docking* de la colchicina y la podofilotoxina en el modelo 4O2B con las mutaciones Ala316Ser (B y F), lle318Leu (C y G) y los polimorfismos de la lámina S8 (D y H). Las diferentes mutaciones están marcadas en violeta.



Figura 107.- *Docking* de la colchicina (A, B y C) y la podofilotoxina (D, E y F) en el modelo de tubulina de *Bos taurus* 402B (A y D) y *docking* de la colchicina y la podofilotoxina en el modelo 402B con las mutaciones Ala354Ser (B y E) y todos los polimorfismos de la lámina S9 (C y F). Las diferentes mutaciones están marcadas en violeta.

Finalmente, en la tercera región dentro de la lámina S9, que se sitúa paralela a la lámina S8, se encuentran los siguientes cambios en la proteína de *Leishmania*: Val351Ile, Thr353Ser, Ala354Ser y Val355Ile. Solo el radical del aminoácido 354 está orientado hacia el sitio de unión, los aminoácidos 351, 353 y 355 tienen el radical situado en el otro lado de la lámina y no interaccionan con el sitio de unión de forma directa (Figura 105).

El polimorfismo en posición 354 supone la sustitución de un aminoácido alifático no polar, la alanina presente en mamíferos, por un aminoácido polar sin carga, la serina presente en *Leishmania*. Como ya se ha mencionado, el grupo hidroxilo de la serina puede funcionar como un donador/aceptor formando puentes de hidrógeno y aumentado la polaridad e hidrofilia del sitio de unión en esta posición (Figura 104). Sin embargo, este aminoácido no está relacionado de forma directa con ningún farmacóforo de la molécula. De hecho, en el estudio de *docking* realizado con esta mutación, no se observan cambios significativos en la unión con la podofilotoxina o la colchicina (Figura 107).

Los polimorfismos en posición 315 y 351 están presentes en el isotipo III de la tubulina de mamífero y tipo IV de aves. Se ha sugerido que la falta de afinidad de estas por la colchicina puede deberse, en parte, a la Cys241 y también a la modificación del volumen del bolsillo de unión (Skoufias y Wilson, 1992; Sharma y col., 2010). El tamaño del bolsillo en la proteína humana es de 726,6 Å³, mientras que en *Leishmania* es de 696,0 Å³. La disminución del tamaño en *Leishmania* se debería a que los tres polimorfismos (Ala250Ser, Ala316Ser y Ala354Ser), implican un aumento del tamaño de los radicales y por lo tanto una disminución del volumen del bolsillo.

Para relacionar de forma directa la eficacia de los compuestos se utilizó la escala de potencia de concentración inhibitoria 50 (pCI_{50}), que se calcula mediante la aplicación del menos logaritmo en base diez sobre los valores de CI_{50} en M.

$$pCI_{50} = -log_{10}(CI_{50})$$

Sistemáticamente *L. infantum* resultó ser más resistente que *L. major* a los compuestos estudiados (Figura 108). En un primer momento, se podría pensar que esto pudiera deberse a una diferencia en la secuencia de aminoácidos de la β tubulina, diana primaria de todos los derivados de la podofilotoxina. La única diferencia encontrada entre ambas moléculas radica en una sustitución en posición 321 – vecino al motivo S8 de reconocimiento de la colchicina – donde una isoleucina en *L. major* es sustituida por un residuo de metionina en *L. infantum;* sin embargo, este aminoácido se encuentra demasiado lejos del sitio de unión como para que el polimorfismo pudiera producir algún efecto.



Figura 108.- Gráfica que relaciona la pCI₅₀ de promastigotes de *L. major* frente a la pCI₅₀ promastigotes de *L. infantum* para los derivados de la podofilotoxina. Los puntos sobre la recta corresponden a los compuestos que son igual de efectivos para las dos especies.

5.2 Lignanos

Los lignanos utilizados en este trabajo pueden dividirse en dos grandes grupos estructurales, los derivados de la podofilotoxina y los derivados del aldehído podofílico. Sobre el esqueleto de estos compuestos se realizaron diferentes sustituciones.

5.2.1 Modificaciones sobre la podofilotoxina

Las modificaciones en la podofilotoxina consistieron en la introducción de radicales en posición C-4 o C-5 y la modificación de la estructura de los diferentes anillos.

La apertura del anillo A en la podofilotoxina (JAP-01) y en la desoxipodofilotoxina (JAP-04) generaron los compuestos JAP-06 y JAP-07 respectivamente (Figura 109), los cuales fueron incapaces de inhibir la polimerización de la tubulina y no mostraron citotoxicidad en las líneas celulares ensayadas. Este efecto se ha descrito también en otras líneas celulares (Castro y col., 2003c) y está relacionado con la aparición de dos grupos fenólicos polares y con la perdida de la estructura plana formada por el anillo A y B que forman el farmacóforo R1, esencial para la interacción con la tubulina (Nguyen y col., 2005).



Figura 109.- Estructuras y valores de CI_{50} (μ M) de derivados de la podofilotoxina agrupados en función del tipo de modificación que presentan frente al compuesto referencia.

La única modificación sobre el anillo B probada en este trabajo consistió en la presencia de un grupo acetato en posición C-5 de la desoxipodofilotoxina, generando el compuesto JAP-09 (Figura 109). En general las modificaciones sobre el anillo B no modifican la actividad de los compuestos frente a líneas celulares neoplásicas (San Feliciano y col., 1993; Gordaliza y col., 1994). Sin embargo, JAP-09 fue más citotóxico frente a *L. major* que JAP-04, y se comportó también como mejor inhibidor de la polimerización que su análogo no modificado en el anillo B (Figura 109). Al comparar la acción del JAP-09 con la del compuesto JAP-02, que también posee un grupo acetato,

pero en posición C-4, observamos un mejor comportamiento como inhibidor de la polimerización en el caso de JAP-09 (Figura 109). Esto puede deberse a que la presencia del grupo acetato en C-5 dificultan especialmente la interacción con el farmacóforo D1 (Figura 110).



Figura 110.- *Docking* más estable de la JAP-02 (A y D) y JAP-09 (B y E) en el modelo de tubulina de *Bos taurus* 4O2B (A, B y C); *docking* de JAP-02 y JAP-09 en el modelo de *Leishmania* (D, E y F) y superposición del *docking* de JAP-02 y JAP-09 en el modelo de *Bos taurus* (C) y *Leishmania* (F).

Tradicionalmente el mayor número de modificaciones se ha realizado en el anillo C y en este trabajo los compuestos con dicha modificación constituyen el grupo mayoritario (Castro y col., 2003b). Entre las modificaciones podemos distinguir la adición de radicales en posición C-4 y modificaciones del número y posición de enlaces del anillo C.

El aumento de la oxidación en el carbono 4, pasando de podofilotoxina a podofilotoxona (JAP-10) disminuyó la actividad de los compuestos (Figura 109). Este efecto también se observó en líneas celulares neoplásicas (Gordaliza y col., 1996a; Gordaliza y col., 1997; Gordaliza y col., 2000b). JAP-04, compuesto que pierde el grupo alcohol existente en el anillo C con respecto a la podofilotoxina, mostro escasa actividad leishmanicida y poca afinidad por la tubulina (Figura 109). Esto puede deberse a la pérdida de capacidad del mismo para establecer el puente de hidrógeno en posición C-4 que actúa como farmacóforo D-1. El farmacóforo D-1 no es esencial para la unión a tubulina (Nguyen y col., 2005), pero su perdida conduce a una disminución de la afinidad por la misma y a una escasa actividad en las líneas neoplásicas de mamífero (Ma y col.,

2013). El farmacóforo D-1 está relacionado con una zona muy conservada del bolsillo de unión.

Otro aspecto importante de los sustituyentes en posición C-4 es la disposición espacial. En general, los compuestos con sustituciones en posición α , como la podofilotoxina (JAP-01), han sido más efectivos que sus epímeros con sustituciones en posición β (JAP-03) (Figura 109). Esto se ha observado en otras líneas celulares de mamífero (Miguel del Corral y col., 1995; Abad y col., 2012).

La incorporación de aductos voluminosos en posición C-4, como en las moléculas CSD-05 y M10E disminuyó la efectividad de los compuestos frente a *Leishmania*. Esta pérdida de citotoxicidad se ha observado también en otras líneas celulares (López-Pérez y col., 2004) y podría deberse a que el aducto dificultaría la unión a la tubulina (Abad y col., 2012). Estos mismos impedimentos estéricos podrían observarse en los compuestos CSD-15 y CSD-10. El primero tiene en posición C-4 un radical más pequeño y presenta una mayor unión a la tubulina, lo que se puede observar al comparar sus áreas de superficie polar (tPSA). El tPSA se define como el área resultado de la suma de la superficie de todos los átomos polares. De este mode el valor de tPSA para CSD-15 es de 72,45 Å² (IC₅₀ = 4,99 μ M), que mientras que el de CSD-10 es de 92,68 Å² (IC₅₀=7,66 μ M).

Existen estudios en los que se ha observado que el anillo de γ-lactona (anillo D) no es una característica esencial para que los ciclolignanos mantengan su citotoxicidad en las células neoplásicas. Sin embargo, la presencia de una función electrofílica o una función carbonilo unida a la posición C-2 si parece condicionar el potencial antineoplásico. Se ha observado también que las modificaciones del anillo dan lugar a una pérdida de la actividad citotóxica. (ter Haar y col., 1996; Miguel del Corral y col., 1997; Gordaliza y col., 2000b; Gordaliza y col., 2001; Castro y col., 2010a).

Uno de los aspectos más importantes del anillo D se encuentra en la configuración isomérica *cis* (CSD-13) o *trans* (CSD-01), la cual no afectó de forma significativa al potencial leishmanicida de los compuestos; aunque en células de esplenocitos la configuración *trans* fue más tóxica ($IC_{50}=1,75 \mu M$) que la *cis* ($IC_{50}=20,86 \mu M$). Este efecto se ha observado también en líneas neoplásicas, donde las diferencias entre la conformación *cis* y *trans* son de un orden de magnitud (San Feliciano y col., 1993; Gordaliza y col., 1994). Esta diferencia podría deberse a que las *trans*-lactonas son rígidas y adoptan una conformación cuasi-plana (Figura 111 B), mientras que las *cis*-lactonas son más flexibles y su conformación va a depender de los sustituyentes (Figura 111 A). Los compuestos *trans* son más tensos que los *cis*, y por tanto, serían más reactivos, mostrando una mayor capacidad para formar enlaces covalentes con las biomoléculas diana (San Feliciano y col., 1993; Gordaliza y col., 2001).

Al igual que sucede con las *trans* lactonas, la presencia de un doble enlace en posición C 3-2 dentro del anillo D, hace que la molécula sea más rígida, manteniéndose casi plana

y por tanto más interactiva (Figura 111C) (Gordaliza y col., 1995a). Así, el compuesto JAP-44, con este doble enlace, fue más citotóxico y más afín por la tubulina, que la desoxipodofilotoxina.



Figura 111.- Fórmula química y representación tridimensional de las diferentes esqueletos tetraciclicos estudiados; y resultados de actividad (CI_{50} , μM) frente a promastigotes de *L. major* y *L. infantum*; amastigotes de *L. infantum*; amastigotes de *L. infantum* y tubulina de *Leishmania*. n.e.- no ensayado.

La introducción de un nuevo enlace en el anillo D dio compuestos naftalénicos aromáticos e hizo que el compuesto CSD-08 perdiera actividad, a pesar de presentar la conformación más plana (Figura 111E). Esto se debería a que la geometría molecular cambia muy profundamente, ya que el grupo trimetoxifenilo pasa a ser ecuatorial.

El compuesto JAP-08 posee un doble enlace en la posición C 3-4, el cual conferirá también mayor rigidez a la molécula y, por lo tanto, debería presentar una mayor actividad (Figura 111D). Sin embargo, dicho compuesto no presentó acción citotóxica ni afinidad por la tubulina. Esto es debido a que el carboxilo lactónico presenta configuración β contraria a la de la podofilotoxina, perdiendo la interacción A3 del farmacóforo. Este mismo efecto se ha observado en las líneas neoplásicas (Gordaliza y col., 1997).

La apertura del anillo D, como se pudo comprobar en el compuesto CSD-06, dio lugar a una pérdida de afinidad por la tubulina de *Leishmania* con respecto al resto de moléculas que tienen dicho anillo cerrado (CSD-01). Esto puede deberse a que la apertura del anillo D resta tensión al anillo C y este no alcanza una conformación similar a la que se da en las *trans*-lactonas. Sin embargo, cuando se añade un enlace doble en posición C 3-4 al anillo C (JAP-55, JAP-53, JAP-34, JAP-51) la rigidez se recupera y aumenta la afinidad por la tubulina obteniéndose para estos compuestos buenos coeficientes de inhibición de la polimerización. Una vez abierto este anillo la configuración *cis* (JAP-11, JAP-13 y CSD-06) o *trans* (JAP-12) no parece afectar a la efectividad de los compuestos.

Otra modificación relacionada con el anillo D es su apertura para formar isoazoles (JAP-43 y JAP-26). Se ha observado que esta modificación, al igual que en los pirazololignanos resta actividad en las líneas neoplásicas (Gordaliza y col., 1995b; Miguel del Corral y col., 1997). JAP-43 se comportó siguiendo este patrón, pero JAP-26 fue igual de activo frente a la polimerización de la tubulina de *Leishmania* que la podofilotoxina con una IC₅₀ de 0,371, además de presentar cierta actividad frente a amastigotes.



Figura 112.- Estructura química del etopósido y tenipósido.

Las modificaciones en el anillo trimetoxifenilo (anillo E) implican normalmente una pérdida de la actividad antitubulina. Efectivamente moléculas como el etopósido y el tenipósido que presentan un grupo fenol en posición C-4' (Figura 112), dejan de actuar como inhibidores de la polimerización de tubulina para comportarse como inhibidores de la ADN topoisomerasa tipo II (Gordaliza y col., 1996a; Castro y col., 2003b). Los compuestos con modificaciones en el anillo E fueron JAP-05, que presenta una desmetilación en posición C-4'; JAP-45, con oxidaciones en las posiciones C-3'y C-4'; y JAP-61, que muestra la adición de un anillo de pirimidina. Los tres compuestos no mostraron citotoxicidad destacable, ni acción sobre la polimerización de tubulina; pero curiosamente el JAP-45 se comportó como un buen inhibidor de TopIB (IC₅₀ = 6,7 μ M).

El grupo fenol en la posición C-4´ de la molécula JAP-05 podría, según la bibliografía, atacar a la cadena nucleótida e inhibir TopII (Eich y col., 1991), sin embargo este compuesto fue inactivo.



Figura 113.- (A) Estructura química de JAP-61, (B) poligamain y (C) sitio de unión de la colchicina de mamífero, en el que se puede ver la disposición de la podofilotoxina (verde) y poligamain (gris y rojo) (Hartley y col., 2012).

El compuesto JAP-61, estructuralmente, se podría comparar con el poligamain (Figura 113B), aunque este último es un tetraciclo y no un triciclo como el JAP-61. Al igual que la podofilotoxina, el poligamain tiene un rango de efecto nanomolar en líneas neoplásicas y se une de igual forma que la colchicina, sin que la modificación del anillo E afecte a esta unión (Figura 113C) (Hartley y col., 2012). El bajo índice citotóxico del compuesto JAP-61 y su nula afinidad por la tubulina (>20 µM) puede deberse tanto a que el anillo quinoxalina es más voluminoso que el anillo benzodioxólico, como a la naturaleza básica del primero por la pérdida de los átomos de nitrógeno.

5.2.2 Modificaciones sobre el aldehído podofílico

El aldehído podofílico ha demostrado ser un compuesto interesante, pues a pesar de que su citotoxicidad general es menor que la de la podofilotoxina su índice selectivo es mucho mejor que el de ésta (Castro y col., 2003c). Como se observa en la Figura 114 la mayoría de los compuestos derivados del aldehído podofílico mostraron índices selectivos positivos; de hecho, los mejores índices selectivos obtenidos en este trabajo corresponden a compuestos derivados del aldehído podofílico. En general, los compuestos con función heterocíclica unida a la posición C-3 fueron los que mostraron mejores resultados (JAP-29 IS = 66,37, JAP-32 IS = 29,0), seguidos de los compuestos con función aldehído (JAP-55 IS = 46,7).



Figura 114.- Gráfica que relaciona la pCI₅₀ de amastigotes frente a esplenocitos, en el que se incluyen los diferentes grupos derivados del aldehído podofílico y varios compuestos derivados de la podofilotoxina. La recta continua determina el valor de IS igual a uno y la recta discontinua determina el valor de IS igual a 20. Los compuestos que se sitúan por debajo la recta continua poseen índices selectivos positivos; por el contrario, los que se sitúan por encima la recta continua presentan selectividad negativa.

Dentro de los derivados con función nitrogenada en posición C-3 la actividad leishmanicida frente a amastigotes de la hidrazona (JAP-18) fue mayor que la de la oxima (JAP-49) y de la imina (JAP-38). Esto se corresponde con los resultados obtenidos

en células neoplásicas, para las cuales, la hidrazona (JAP-18) fue la más eficaz (Tabla 25) (Gordaliza y col., 1997; Castro y col., 2010a).

Tabla 25.- Resultados de actividad (CI₅₀, μM) de los compuestos nitrogenados JAP-18, JAP-49 y JAP-38 frente promastigotes *de L. major, L. infantum*, amastigotes de *L. infantum*, diferentes líneas celulares neoplásicas y sobre la tubulina de *L. infantum* (Gordaliza y col., 1997; Castro y col., 2010a).

_	Promastigotes		Amastigotes			
_	L.major	L.infantum	L.infantum	A-549	HT-29	Tubulina
JAP-18	10,2 ± 0,45	24,5 ± 1,55	24,5 ± 1,55	0,19	0,048	2,86 ± 0,26
JAP-49	49,9 ± 1,49	61,3 ± 0,71	59,4 ± 0,77	2,27	2,27	>20
JAP-38	51,3 ± 3,11	59,3 ± 4,25	65,6 ± 6,96	0,23	0,39	7,09 ± 0,43
JAP-50	34,9 ± 2,01	38,3 ± 3,7	31,7 ± 2,09	1,50	1,00	12,1 ± 0,77

La amina (JAP-50) fue también más activa frente a *Leishmania* que la imina (JAP-38), contradiciendo lo observado en líneas neoplásicas (Castro y col., 2010a). Esta diferencia puede estar relacionada con otro mecanismo diferente a la interacción con la tubulina de *Leishmania*; ya que la amina fue menos activa que la imina inhibiendo la polimerización.

En el grupo de derivados con función aldehído en posición C-3 el compuesto con mejores resultados fue el compuesto JAP-55 cuyo mecanismo de acción según los resultado obtenidos estaría relacionado con la inhibición de la polimerización de la tubulina.



Figura 115.- (A) *Docking* más estable de la podofilotoxina, (B) JAP-19, y (C) JAP-20 en el modelo de tubulina de *Leishmania* y (D) superposición del *docking* de los tres compuestos en modelo de *Leishmania*. Tabla con los resultados de actividad (CI₅₀, μ M) para los compuestos JAP-01, JAP-19 y JAP-20 frente promastigotes *de L. major, L. infantum*, amastigotes de *L. infantum*, esplenocitos y sobre la tubulina de *L. infantum*; y su índice selectivo (IS).

Al realizar el *docking* de los compuestos con un sustituyente unido a la posición C-3 de tipo imino asociado a un grupo fenilo (JAP-19) o hidroxifenilo (JAP-20), se observa que la disposición del anillo A es bastante diferente en estos compuestos, con respecto a la podofilotoxina. Esta modificación afectaría a los farmacóforos D1 y H1, que como se observa en la Figura 115 podrían ser sustituidos por el nitrógeno del grupo imino. Esta

variación de la conformación hace que se pierda afinidad por la tubulina (con respecto a la podofilotoxina) aunque en el caso de JAP-20 aumente el índice selectivo.

Los compuestos JAP-16 y JAP-56 contienen un átomo de Bromo unido a una cadena de carbonos que puede actuar como un sistema de alquilación (Castro y col., 2012). El aumento de la longitud de la cadena incrementó la toxicidad del compuesto y disminuyó su afinidad por la tubulina del parasito.

Los derivados con función heterociclo en posición C-3, con mejores índices selectivos (JAP-29 IS > 66,37 y JAP-32 IS = 29,0), no mostraron afinidad por la tubulina de *Leishmania* indicando un mecanismo de acción diferente. Ninguno de estos compuestos muestra las características necesarias para unirse a las TopII y en los ensayos sobre TopIB de *Leishmania* tampoco han mostrado actividad; por lo que se sugiere un tercer mecanismo de acción desconocido para estos compuestos, que también se ha sido sugerido para otros derivados de la podofilotoxina y el aldehído podofílico (Cho y col., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que algunos derivados de bencimidazol se unen a la tubulina de mamífero (Kamal y col., 2014).

Tabla 26.- Resultados de actividad (CI_{50} , μ M) para los compuestos JAP-41, JAP-42 y JAP-58 frente promastigotes *de L. major, L. infantum*, amastigotes de *L. infantum*, esplenocitos, hepatocitos HepG2 y sobre la polimerización de la tubulina de *L. infantum*.

	Promastigotes		Amastigotes			
_	L. major	L. infantum	L. infantum	Esplenocitos	HepG2	Tubulina
JAP-41	> 100	> 100	> 100	161 ± 4,38	145 ± 5,67	>20
JAP-42	21,2 ±0,77	45,2 ± 2,80	24,3 ± 0,51	22,9 ± 0,89	87,3 ± 6,40	3,07 ± 0,16
JAP-58	> 100	94,8 ± 7,93	> 100	154 ± 4,62	14,3 ± 1,25	>20

Se probaron varios compuestos diméricos, formados por la unión de dos moléculas de aldehído podofílico mediante un puente espaciador (JAP-41, JAP-42 y JAP-58). Esta estrategia es utilizada para mejorar la eficacia de fármacos naturales en la lucha contra el cáncer y otras enfermedades (Tietze y col., 2003; Cappelletti y col., 2011; Decker, 2011). El diéster dimérico con función aldehído en C-3 y con un puente de unión formado por una sistema bencénico (JAP-58) fue inactivo frente a *Leishmania* (Tabla 26), en contraposición a lo observado en líneas neoplásicas, frente a las cuales los puentes con anillo bencénico aumentaban la actividad del compuesto (Castro y col., 2012) y como se observa en la línea hepática HepG2 al compararla con el aldehído podofílico (JAP-51).

Los otros dos compuestos diméricos contienen función imina en C-3 (JAP-41 y JAP-42). La actividad de estos compuestos dependió de la longitud del puente (Tabla 26), en contraposición de lo observado en células neoplásicas, frente a las cuales la longitud del puente no afectó a la actividad (Castro y col., 2012). De hecho, solo el compuesto con el puente de mayor longitud (JAP-42) fue activo frente a *Leishmania*. Esto puede deberse a que el sitio de unión a la tubulina es más estrecho en *Leishmania* que en mamíferos, debido a los polimorfismos Ala350Ser, Ala316Ser y Ala354Ser; de modo que las únicas moléculas que pueden acomodarse son aquellas que tienen un puente unión largo que les permite situar uno de los monómeros dentro del sitio de unión a colchicina y otro fuera de este (Figura 116).



Figura 116.- *Docking* más estable del compuesto JAP-42 en el sitio de unión de la colchicina en la tubulina de *Leishmania*. (A) Se observa uno de los monómeros dentro del sitio de unión de la colchicina y (B) otro fuera; (C) estructura química del compuesto JAP-42.

Seleccionando los compuestos con mejores índices selectivos, se observó que todos son derivados del aldehído podofílico (incluido éste). Entre los derivados de la podofilotoxina, ninguno mejoró la selectividad del compuesto cabeza de serie (Tabla 27). El mecanismo de acción del compuesto con mejor índice selectivo, JAP-29 no parece estar relacionado con la inhibición de la polimerización de la tubulina, al igual que sucede con JAP-32, compuesto con el tercer mejor índice selectivo encontrado. Tanto JAP-29 como JAP-32 son compuestos tricíclicos con heterociclos unidos a la posición C-3. Por otra parte JAP-55, JAP-51 y JAP-53, compuestos tricíclicos con función aldehído en C-3, se encuentran entre los compuestos con mejor índice selectivo y el mecanismo de acción sí parece estar relacionado con la inhibición de la polimerización de la polimerización de la tubulina (Figura 117), dada la estabilidad de los complejos de interacción.



Figura 117.- *Docking* más estable de los compuesto JAP-53, JAP-55 y JAP-51 en el sitio de unión de la colchicina en la tubulina de *Leishmania*.

	Promastigotes		Amastigotes				
	L.major	L.infantum	L.infantum	IS	Esplenocitos	HepG2	Tubulina
JAP-29	28,3 ± 1,35	> 100	2,24 ± 0,35	66	148 ± 66,9	9,91 ± 0,56	>20
JAP-55	91,7 ± 7,66	64,8 ± 4,87	4,28 ± 0,13	> 46	> 200	10,4 ± 0,78	0,91 ± 0,08
JAP-32	25,9 ± 5,09	16,1 ± 2,24	2,48 ± 0,21	29	71,8 ± 6,03	n.e.	>20
JAP-51	65,3 ± 4,40	89,5 ± 4,29	9,26 ± 0,47	> 21	> 200	136 ± 4,67	2,05 ± 0,32
JAP-53	12,2 ±0,66	9,28 ± 0,73	9,92 ± 0,55	> 20	> 200	> 200	0,85 ± 0,04
JAP-34	34,9 ± 1,28	34,3 ± 1,73	7,27 ± 0,21	18	135 ± 30,3	51,1 ± 3,65	0,66 ± 0,01
JAP-30	28,3 ± 4,66	13,9 ± 2,82	12,1 ± 0,41	> 16	> 200	46,8 ± 1,27	12,1 ± 1,18
JAP-20	8,59 ± 0,05	9,37 ± 0,75	9,37 ± 0,75	13	122,8 ± 14,1	1,11 ± 0,04	1,16 ± 0,06
JAP-27	12,7 ± 1,82	16,3 ± 1,93	9,68 ± 1,79	8,9	86,2 ± 0,1	n.e.	16,1 ± 2,05
JAP-33	$10,4 \pm 0,54$	11,0 ± 0,69	8,89 ± 0,64	8,0	71,0 ± 1,5	65,9 ± 3,3	1,32 ± 0,01
JAP-23	54,8 ± 1,86	51,6 ± 1,82	7,53 ± 0,48	7,7	58,0 ± 2,6	n.e.	9,03 ± 0,78
JAP-01	63,7 ± 11,8	> 100	13,4 ± 0,82	> 7,5	> 200	0,73 ± 0,03	0,32 ± 0,03

Tabla 27.- Compuestos con mejores resultados de IS (CI_{50} amastigotes *L.infantum*/ CI_{50} esplenocitos) ordenados demayor a menor. Valores de CI_{50} en μ M.

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].

n.e. - no ensayado

Entre los cinco compuestos con más capacidad para inhibir la polimerización de tubulina de *Leishmania*, se encuentra la podofilotoxina y cuatro compuestos derivados del aldehído podofílico (JAP-36, JAP-26, JAP-34 y JAP-52) (Tabla 28). Se podría destacar también que de esos cuatro, dos tienen un grupo heterocíclico en posición C-3 (JAP-36 y JAP-34).

Tabla 28.- Compuestos con los mejores resultados de inhibición de tubulina de *Leishmania*, ordenados de mayor a menor.

	Promastigotes		Amastigotes				
	L.major	L.infantum	L.infantum	IS	Esplenocitos	HepG2	Tubulina
JAP-36	30,9 ± 3,58	46,9 ± 5,25	21,2 ± 1,07	1,9	40,7 ± 6,52	95,3 ± 14,1	0,31 ± 0,01
JAP-01	63,7 ± 11,8	> 100	13,4 ± 0,82	> 7,5	> 200	0,73 ± 0,03	0,32 ± 0,03
JAP-26	90,6 ± 8,11	> 100	30,4 ± 2,46	3,4	106 ± 12	23,6 ± 0,11	0,37 ± 0,03
JAP-34	34,9 ± 1,28	34,3 ± 1,73	7,27 ± 0,21	18	135 ± 30	51,2 ± 3,65	0,66 ± 0,02
JAP-52	51,1 ± 2,72	57,0 ± 4,21	29,8 ± 1,6	6,7	176 ± 52	116 ± 6	0,75 ± 0,03

Valores de CI_{50} (μ M) a las 48 h, calculados a partir de las curvas dosis/respuesta (Anexos II, III, IV, VI y VII) de tres experimentos independientes por triplicado para cada concentración y ajustadas no linealmente mediante el programa SigmaPlot[®].



Figura 118.- (A) *Docking* más estable del compuesto JAP-34 en el sitio de unión de la colchicina en la tubulina de *Leishmania* y (C) de *Bos Taurus*. (B) Detalle del sitio de unión a colchicina con JAP-34 para *Leishmania* y (D) de *Bos Taurus* en la que se observa como el anillo trimetoxifenilo y los anillos A, B y C; se sitúan dentro del sitio de unión mientras que el heterociclo se sitúa fuera de este.

El compuesto JAP-34 aparece simultaneamente en la Tabla 27 y en la Tabla 28, de lo que se puede deducir que su buena actividad como leishmanicida viene dada por su actuación sobre la tubulina de *Leishmania*. Realizando el docking con la proteína de *Bos taurus* (402B) y el modelo de *Leishmania* generado en este trabajo, se observa que el compuesto tiene una mejor interacion con la proteína de mamifero que con la de *Leishmania* (Figura 118), esto nos hace pensar que el mecanismo de selectividad del compuesto esta a otro nivel.
5.3 Quinonas

Se han descrito dos mecanismos de acción principales para las quinonas. El primero implica la formación de un intermedio de alquilación con adición directa de nucleófilos al anillo quinónico, esto resulta en la alquilación de los heteroátomos de importantes biomoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas. El segundo implica repetidas bioreducciones y oxidaciones espontáneas de la quinona, que conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido (O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH), que son responsables de estrés oxidativo en el célula (O'Brien, 1991; Klotz y col., 2014). También se han descrito otros mecanismos específicos relacionados con la inhibición de las ADN topoisomerasas I y II (Li y col., 1993; Staker y col., 2005).

Las hidroquinonas mostraron una mayor actividad leishmanicida que las quinonas pero sin ninguna selectividad, de hecho solo uno de los derivados hidroquinónicos (JAP-6013) obtuvo un índice selectivo positivo (Figura 119). Este mismo comportamiento se ha observado en diferentes líneas celulares neoplásicas y puede deberse a que la acetilación de los grupo fenólicos protege la molécula frente a la oxidación, permitiendo mantener su actividad durante mayor tiempo (Gordaliza y col., 1996b; Miguel del Corral y col., 1997).



Figura 119.- Gráfica que relaciona la pCI_{50} de amastigotes frente a la pCI_{50} de esplenocitos, referidas a los diferentes grupos de quinonas e hidroquinonas. La recta indica los puntos en que el IS es igual a uno. Los compuestos que se sitúan por debajo de dicha recta poseen índices selectivos positivos por el contrario los que se sitúan por encima de dicha recta obtienen índices selectivos negativos.

La citotoxicidad de las naftoquinonas y antraquinonas frente a amastigotes fue muy similar, sin embargo en las líneas neoplasicas mostraron una mayor actividad las

Jose Miguel Escudero Martínez

naftoquinonas (Miguel del Corral y col., 1998). En general estos compuestos también fueron poco selectivos.

En este grupo de compuestos se ha comprobado que existe una correlación entre la superficie polar de la molécula (tPSA) y la potencia frente a amastigotes (Figura 120A). El valor de tPSA está relacionado con la facilidad de un compuesto para atravesar una barrera biológica (Shityakov y col., 2013), por lo que la actividad de estos compuestos puede estar relacionada directamente con su capacidad para atravesar las membranas y poder llegar a la forma parasitaria intracelular. Curiosamente esta correlación entre tPSA y pCI₅₀ no se ha observado en los derivados de la podofilotoxina y del aldehído podofílico (Figura 120B).



Figura 120.- (A) Gráfica que relaciona la PCI_{50} ($-log_{10}$ (CI_{50})) frente a amastigotes con el área de la superficie polar (tPSA), compuestos quinonicos y (B) derivados de la podofilotoxina y del aldehído podofílico.

Las antraquinonas y naftoquinonas con la posición C-3 libre (JAMC-859 y JAP-109), resultaron ser más activas frente amastigotes que sus homólogas con la posición C-3 ocupada (JAP-6079 y JAP-501). Esto concuerda con los experimentos realizados en células neoplásicas, donde las sustituciones en C-3 y C-4 disminuyeron la eficacia de los compuestos (Gordaliza y col., 1996b; Molinari y col., 2004). Todo ello parece tener relación con un mecanismo de acción a través de a procesos de alquilación, que precisan de la ausencia de sustituyentes en posición C-3 (Klotz y col., 2014). Esta tendencia se mantuvo cuando el sustituyente fue un donador de electrones como un grupo metilo (compuestos JAP-500 y JAM-6017); mientras que en trabajos realizados con líneas celulares neoplásicas estas sustituciones habían mejorado la citotoxicidad (Miguel del Corral y col., 2006b).

Según la bibliografía, aquellas antraquinonas que no poseen enlaces dobles conjugados en el anillo A (JAP-6013) son menos activas frente a células neoplásicas que sus homologas con enlaces conjugados en el anillo A (JAP-108) (Molinari y col., 2000; Molinari y col., 2002; Vlachakis y col., 2014). Esta tendencia se observa también frente a amastigotes de *Leishmania* y puede deberse a que la pérdida de dobles enlaces hace

que la molécula sea más flexible y no pueda adquirir forma plana (Figura 121) lo que parece fundamental para su mayor citotoxicidad.





Figura 121.- Fórmula química de los compuestos JAP-108 y JAM-6013.

La naftohidroquinonas diterpénicas tienen una estructura parecida al avarol y su quinona, avarona, dos compuestos naturales procedentes de la esponja marina *Dysidea avara* (Figura 122). Estos compuestos se han ensayado en clínica contra la leucemia y como antivirales (Gordaliza, 2010). El grupo de compuestos ensayados en este trabajo se compone exclusivamente de diacetatos de naftohidroquinonas, pues han sido las estructuras que mejores resultados han mostrado en estudios previos con líneas neoplásicas (Miguel del Corral y col., 2001).



Figura 122.- Estructura química del avarona, avarol y una naftohidroquinona diterpenica.

La presencia de grupos acetoxilo en posición C-4 β (JAM-416) aumentó la actividad frente a la molécula original con un ácido carboxílico (JAP-104), mientras que la esterificación (JAP-113) aumentó la actividad frente a los compuestos con grupo acetoxilo α (JAP-107) o β (JAM-416) en esa posición. En células neoplásicas la reducción de esta posición y la presencia de grupos ácidos libres también ocasionó una pérdida de actividad pero las formas acetiladas volvieron a recuperar dicha actividad (Miguel del Corral y col., 2001; Castro y col., 2007).

La modificación de la posición C-8 de la molécula JAP-416 con un grupo ceto para generar JAP-107, aumentó la citotoxicidad de los compuestos frente a células de mamífero (esplenocitos y HepG2), al igual que en células neoplásicas (Miguel del Corral y col., 2001) y disminuyó su potencia leishmanicida. La presencia de un grupo epoxi (JAP-106) en la posición C 8-17 no varió significativamente la actividad, pero la disminuyó en

Jose Miguel Escudero Martínez

amastigotes. La adición de un grupo epoxi a la naftohidroquina originó también una pérdida de actividad en células neoplasicas (Miguel del Corral y col., 2001).

Finalmente, la introducción de un doble enlace *trans* en el puente etilénico en posición C 11-12 del terpeno disminuyó la actividad en todas la líneas celulares, como se puede observar en el compuesto JAM-440, debido a que el doble enlace *trans* alarga la conformación y dificulta la interacción de las moléculas con sus diferentes dianas.

Entre las antraquinonas ensayadas, JAP-120 fue la que obtuvo un mejor índice selectivo. Su estructura se podría comparar con la benzoindazoloquinona (JAP-119), que mostró un índice selectivo similar. Parece ser que el aumento de selectividad en este último compuesto podría estar relacionado con la presencia del anillo pirazol que aumenta la capacidad de formar radicales libres (Miguel del Corral y col., 2006b).



Figura 123.- (A) Estructura química de la CPT y (D) JAMC-6000. (B y C) *Docking* más estable de la CPT sobre la TopIB de mamífero y (E y F) de JAMC-6000 sobre la TopIB de *Leishmania*.

Las diferencias entre los dobles enlaces del esqueleto carbonado existentes entre JAP-504 y JAP-505, al igual que las existentes entre JAP-506 y JAP-507 no se reflejaron en la actividad de estos compuestos. Esto se puede deber a que la configuración espacial adquirida por ambas estructuras es similar.

En este trabajo hemos encontrado que varias de las moléculas estudiadas se comportan como inhibidores de la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania*. En general las moléculas que interaccionan con la topoisomerasa IB humana son casi planas, y se intercalan entre los pares de bases nucleotidas y la enzima (Staker y col., 2005). Las quinonas cumplen parte de estos requisitos de farmacóforos y se podrían insertar en el

centro catalítico de la enzima aunque sin llegar a interaccionar como compuestos intercalantes como la CPT (Figura 123).

De todos los compuestos probados solo uno actúa sobre las dos dianas estudiadas en este trabajo, JAP-53. Según la bibliografía, existen varios compuestos que inhiben la tubulina y las ADN topoisomerasas, como BPROY007, que inhibe la tubulina y la TopIB de mamífero (Chang y col., 2003), y la azatoxina, que inhibe la tubulina y la TopII de mamífero (Solary y col., 1993) (Figura 124). Ninguno de los compuestos mencionados se intercala en las hebras del ADN.





Figura 124.- Inhibidores de la topoisomerasas y la tubulina.

Jose Miguel Escudero Martínez



6 Conclusiones

De los estudios teóricos sobre las dianas específicas y de los de bioevaluación experimental llevados a cabo sobre un total de 77 compuestos lignánicos y 38 terpenilquinonas / hidroquinonas, se alcanzan las siguientes conclusiones:

- El sitio de unión de la colchicina, y la podofilotoxina, en la tubulina de Leishmania mostró varios polimorfismos con respecto al de la tubulina de mamífero, los cuales presentan distinta afinidad de interacción con los ligandos; siendo los polimorfismos situados en el lazo T7 y la hélice H8 los que más afectan a la unión tubulina-lignano.
- En términos de actividad anti-Leishmania y toxicidad, la podofilotoxina (JAP-01) se mostró como el más potente y más selectivo entre los compuestos lignánicos ensayados.
- 3. Para el conjunto de lignanos ensayados, los derivados del aldehído podofílico presentaron mejores índices selectivos frente a *Leishmania*. El subgrupo de los que presentaron índices selectivos mayores de diez presentan generalmente un anillo o sistema heterocíclico unido a la posición C-3 del sistema lignánico.
- 4. A escepcion de podofilotoxina, los mejores resultados de inhibición de la polimerización de la tubulina de *Leishmania* se obtuvieron derivados del aldehído podofílico; siendo el derivado imidazopiridinílico en posición C-3 y concretamente el JAP-36, el que mostró la mayor inhibición.
- 5. Todos los derivados quinónicos e hidroquinónicos ensayados mostraron una alta citotoxicidad frente a *Leishmania*, alcanzando niveles submicromolares en algunos casos, pero con muy poca selectividad.
- 6. Las naftoquinonas terpénicas ensayadas se comportaron mejor que los correspondientes derivados naftohidroquinónicos, mejorando la inhibición de la ADN topoisomerasa IB.

$\mathbf{B}_{\mathsf{ibliografia}}$

7 Biblioglafia

- Abad, A., Lopez-Perez, J. L., del Olmo, E., Garcia-Fernandez, L. F., Francesch, A., Trigili, C., Barasoain, I., Andreu, J. M., Diaz, J. F., San Feliciano, A. (2012). Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins. Journal of Medicinal Chemistry. 55(15): 6724-6737.
- Achterberg, V., Gercken, G. (1987). Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania* donovani promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. 23(2): 117-122.
- Ajay, Murcko, M. A. (1995). Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. Journal of Medicinal Chemistry. 38(26): 4953-4967.
- Akuffo, H. O., Fehniger, T. E., Britton, S. (1988). Differential recognition of Leishmania aethiopica antigens by lymphocytes from patients with local and diffuse cutaneous leishmaniasis. Evidence for antigen-induced immune suppression. The Journal of Immunology. 141(7): 2461-2466.
- Alexander, J., Coombs, G. H., Mottram, J. C. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. The Journal of Immunology. 161(12): 6794-6801.
- Alioto, T. (2012). Gene prediction. Methods in Molecular Biology. 855: 175-201.
- Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. Antiviral Research. 100(1): 54-74.
- Alsner, J., Svejstrup, J. Q., Kjeldsen, E., Sorensen, B. S., Westergaard, O. (1992). Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. The Journal of Biological Chemistry. 267(18): 12408-12411.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25(17): 3389-3402.
- Alushin, G. M., Lander, G. C., Kellogg, E. H., Zhang, R., Baker, D., Nogales, E. (2014). Highresolution microtubule structures reveal the structural transitions in alphabetatubulin upon GTP hydrolysis. Cell. 157(5): 1117-1129.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 7(5): e35671.
- Amela, C., Suarez, B., Isidoro, B., Sierra, M. J., Santos, S., Simón, F. (2012). Informe de situación. Riesgo de transmisión de *L. Infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M., White, F. H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 47(9): 1309-1314.
- Antinori, S., Schifanella, L., Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 31(2): 109-118.

- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Eurosurveillance. 18(30): 20540.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., Garcia, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martinez, A. M., Perez, A. M., Aranguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Eurosurveillance. 18(30): 20546.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology. 30(12–13): 1269-1281.
- Ayres, D. C., Loike, J. D. (1990). Lignans: Chemical, biological and clinical properties. Cambridge, U.K., Cambridge University Press.
- Bai, R., Covell, D. G., Pei, X.-F., Ewell, J. B., Nguyen, N. Y., Brossi, A., Hamel, E. (2000). Mapping the binding site of colchicinoids on beta-tubulin: 2-Chloroacetyl-2demethylthiocolchicine covalently reacts predominantly with cysteine 239 and secondarily with cysteine 354. The Journal of Biological Chemistry. 275(51): 40443-40452.
- Bailly, C. (2000). Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. Current Medicinal Chemistry. 7(1): 39-58.
- Balaña-Fouce, R., Ordonez, D., Alunda, J. M. (1989). Putrescine transport system in Leishmania infantum promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. 35(1): 43-50.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubría, J. C., Ordóñez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. General Pharmacology: The Vascular System. 30(4): 435-443.
- Balaña-Fouce, R., Redondo, C. M., Pérez-Pertejo, Y., Díaz-González, R., Reguera, R. M. (2006). Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I. Drug Discovery Today. 11(15–16): 733-740.
- Bates, A. D., Berger, J. M., Maxwell, A. (2011). The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Research. 39(15): 6327-6339.
- Benkert, P., Tosatto, S. C., Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. Proteins. 71(1): 261-277.
- Benkert, P., Künzli, M., Schwede, T. (2009a). QMEAN server for protein model quality estimation. Nucleic Acids Research. 37(suppl 2): W510-W514.
- Benkert, P., Schwede, T., Tosatto, S. (2009b). QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. BMC Structural Biology. 9(1): 35.
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics. 27(3): 343-350.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov,I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research. 28(1): 235-242.
- Bern, C., Chowdhury, R. (2006). The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. Indian Journal of Medical Research. 123(3): 275-288.

- Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. International Journal for Parasitology. 37(10): 1063-1075.
- Bodley, A. L., Chakraborty, A. K., Xie, S., Burri, C., Shapiro, T. A. (2003). An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100(13): 7539-7544.
- Bowie, J. U., Luthy, R., Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. Science. 253(5016): 164-170.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Bruce-Chwatt, L. J. (1972). Blood transfusion and tropical disease. Tropical Medicine Journals. 69(9): 825-862.
- Buhler, C., Lebbink, J. H., Bocs, C., Ladenstein, R., Forterre, P. (2001). DNA topoisomerase
 VI generates ATP-dependent double-strand breaks with two-nucleotide
 overhangs. The Journal of Biological Chemistry. 276(40): 37215-37222.
- Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry. 112(2): 195-203.
- Bustamante, J. M., Park, H. J., Tarleton, R. L. (2011). Report of the 2nd Chagas Drug Discovery Consortium meeting, held on 3 November 2010; Atlanta GA, USA. Expert Opinion on Drug Discovery. 6(9): 965-973.
- Caffrey, C., Lima, A. P., Steverding, D. (2011). Cysteine Peptidases of Kinetoplastid Parasites. Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms, Springer US. 712: 84-99.
- Calvo-Álvarez, E., Guerrero, N. A., Álvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Requena, J. M., Punzon, C., Llamas, M. A., Arevalo, F. J., Rivas, L., Fresno, M., Perez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2012). Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both in vitro and in vivo studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases. 6(11): e1927.
- Calvo-Álvarez, E., Stamatakis, K., Punzón, C., Álvarez-Velilla, R., Tejería, A., Escudero-Martínez, J. M., Pérez-Pertejo, Y., Fresno, M., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2015). Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro, ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases. 9(3): e0003666.
- Cappelletti, G., Cartelli, D., Peretto, B., Ventura, M., Riccioli, M., Colombo, F., Snaith, J. S., Borrelli, S., Passarella, D. (2011). Tubulin-guided dynamic combinatorial library of thiocolchicine–podophyllotoxin conjugates. Tetrahedron. 67(38): 7354-7357.
- Capul, A. A., Barron, T., Dobson, D. E., Turco, S. J., Beverley, S. M. (2007). Two Functionally Divergent UDP-Gal Nucleotide Sugar Transporters Participate in Phosphoglycan Synthesis in *Leishmania major*. The Journal of Biological Chemistry. 282(19): 14006-14017.
- Carballeira, N. M., Cartagena, M. M., Prada, C. F., Rubio, C. F., Balaña-Fouce, R. (2009a). Total synthesis and antileishmanial activity of the natural occurring acetylenic fatty acids 6-heptadecynoic acid and 6-icosynoic acid. Lipids. 44(10): 953-961.

- Carballeira, N. M., Montano, N., Balaña-Fouce, R., Prada, C. F. (2009b). First total synthesis and antiprotozoal activity of (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Polymastia penicillus*. Chemistry and Physics of Lipids. 161(1): 38-43.
- Carrillo, E., Jimenez, M. A., Sanchez, C., Cunha, J., Martins, C. M., da Paixão Sevá, A., Moreno, J. (2014). Protein malnutrition impairs the immune response and influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. PLoS ONE. 9(2): e89412.
- Carter, K. C., Hutchison, S., Boitelle, A., Murray, H. W., Sundar, S., Mullen, A. B. (2005). Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania donovani* correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. Parasitology. 131(Pt 6): 747-757.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Gómez-Zurita, M. A., de la Puente, M. L., Betancur-Galvis, L. A., Sierra, J., San Feliciano, A. (2003a). Synthesis, cytotoxicity and antiviral activity of podophyllotoxin analogues modified in the Ering. European Journal of Medicinal Chemistry. 38(10): 899-911.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Gómez-Zurita, M. A., García, P. A., San Feliciano, A. (2003b). Chemoinduction of cytotoxic selectivity in Podophyllotoxin-related lignans. Phytochemistry Reviews. 2(3): 219-233.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Grande, C., Gómez-Zurita, A., García-Grávalos, D., San Feliciano, A. (2003c). Synthesis and cytotoxicity of podophyllotoxin analogues modified in the A ring. European Journal of Medicinal Chemistry. 38(1): 65-74.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Garcia, P. A., Gomez-Zurita, M. A., Garcia-Gravalos, M. D., de la Iglesia-Vicente, J., Gajate, C., An, F., Mollinedo, F., San Feliciano, A. (2004). Synthesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin. Journal of Medicinal Chemistry. 47(5): 1214-1222.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., García, P. A., Gómez-Zurita, M. A., San Feliciano, A. (2007). Synthesis and cytotoxic evaluation of C-9 oxidized podophyllotoxin derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 15(4): 1670-1678.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Garcia, P. A., Rojo, M. V., de la Iglesia-Vicente, J., Mollinedo, F., Cuevas, C., San Feliciano, A. (2010a). Synthesis and biological evaluation of new podophyllic aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosisinducing activities. Journal of Medicinal Chemistry. 53(3): 983-993.
- Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Garcia, P. A., Rojo, M. V., Bento, A. C., Mollinedo, F., Francesch, A. M., San Feliciano, A. (2012). Lignopurines: a new family of hybrids between cyclolignans and purines. Synthesis and biological evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry. 58: 377-389.
- Castro, M. A. n., Miguel del Corral, J. M., García, P. A., Rojo, M. V., de la Iglesia-Vicente, J., Mollinedo, F., Cuevas, C., San Feliciano, A. (2010b). Synthesis and Biological Evaluation of New Podophyllic Aldehyde Derivatives with Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities. Journal of Medicinal Chemistry. 53(3): 983-993.
- Coler, R. N., Reed, S. G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends Parasitol. 21(5): 244-249.

- Cook, G. C. (1993). Some early British contributions to tropical disease. Journal of Infection. 27(3): 325-333.
- Cook, G. C. (2008). 12 The causative agent of visceral leishmaniasis (kal-azar): William Leishman (1865–1926) and Charles Donovan (1863–1951). Tropical Medicine. Cook, G. C. London, Academic Press: 177-182.
- Cormier, A., Knossow, M., Wang, C., Gigant, B. (2010). The binding of vinca domain agents to tubulin: structural and biochemical studies. Methods in Cell Biology. 95: 373-390.
- Cox, F. E. (2002). History of human parasitology. Clinical Microbiology Reviews. 15(4): 595-612.
- Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., Chan, J. H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. Biochemical Pharmacology. 36(16): 2633-2636.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P., Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. Indian Journal of Medical Research. 123(3): 357-388.
- Chakravarty, J., Kumar, S., Trivedi, S., Rai, V. K., Singh, A., Ashman, J. A., Laughlin, E. M., Coler, R. N., Kahn, S. J., Beckmann, A. M., Cowgill, K. D., Reed, S. G., Sundar, S., Piazza, F. M. (2011). A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. Vaccine. 29(19): 3531-3537.
- Champoux, J. J., Dulbecco, R. (1972). An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 69(1): 143-146.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annual Review of Biochemistry. 70: 369-413.
- Chang, J. Y., Hsieh, H. P., Pan, W. Y., Liou, J. P., Bey, S. J., Chen, L. T., Liu, J. F., Song, J. S. (2003). Dual inhibition of topoisomerase I and tubulin polymerization by BPR0Y007, a novel cytotoxic agent. Biochemical Pharmacology. 65(12): 2009-2019.
- Chen, A. Y., Yu, C., Gatto, B., Liu, L. F. (1993). DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90(17): 8131-8135.
- Chen, Y. C. (2015). Beware of docking! Trends in Pharmacological Sciences. 36(2): 78-95.
- Cho, S. J., Kashiwada, Y., Bastow, K. F., Cheng, Y. C., Lee, K. H. (1996). Antitumor agents. 164. Podophenazine, 2",3"-dichloropodophenazine, benzopodophenazine, and their 4 beta-p-nitroaniline derivatives as novel DNA topoisomerase II inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry. 39(7): 1396-1402.
- Chothia, C. (1992). Proteins. One thousand families for the molecular biologist. Nature. 357(6379): 543-544.
- Chowdhury, A. R., Mandal, S., Goswami, A., Ghosh, M., Mandal, L., Chakraborty, D., Ganguly, A., Tripathi, G., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Majumder, H. K. (2003). Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. Molecular Medicine. 9(1-2): 26-36.

- Chretien, D., Wade, R. H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. Biology of the Cell. 71(1-2): 161-174.
- Churchill, C. D. M., Klobukowski, M., Tuszynski, J. A. (2014). The Unique Binding Mode of Laulimalide to Two Tubulin Protofilaments. Chemical Biology & Drug Design. 86(2): 190-199.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V. M., de Paiva-Cavalcanti, M., Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends in Parasitology. 28(12): 531-538.
- Das, B. B., Sen, N., Ganguly, A., Majumder, H. K. (2004). Reconstitution and functional characterization of the unusual bi-subunit type I DNA topoisomerase from Leishmania donovani. FEBS Letters. 565(1-3): 81-88.
- Davies, D. R., Mushtaq, A., Interthal, H., Champoux, J. J., Hol, W. G. (2006). The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of Leishmania donovani as a vanadate complex with nicked DNA. Journal of Molecular Biology. 357(4): 1202-1210.
- de Freitas-Junior, P. R., Catta-Preta, C. M., Andrade Ida, S., Cavalcanti, D. P., de Souza, W., Einicker-Lamas, M., Motta, M. C. (2012). Effects of miltefosine on the proliferation, ultrastructure, and phospholipid composition of *Angomonas deanei*, a trypanosomatid protozoan that harbors a symbiotic bacterium. FEMS Microbiology Letters. 333(2): 129-137.
- Decker, M. (2011). Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond. Current Medicinal Chemistry. 18(10): 1464-1475.
- Descoteaux, A., Turco, S. J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. Biochimica et Biophysica Acta. 1455(2-3): 341-352.
- Desjeux, P. (2001). Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. Medical Microbiology and Immunology. 190(1-2): 77-79.
- Desjeux, P., Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 97 Suppl 1: 3-15.
- Desjeux, P. (2004). *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 27(5): 305-318.
- Di Francesco, A. M., Riccardi, A., Barone, G., Rutella, S., Meco, D., Frapolli, R., Zucchetti, M., D'Incalci, M., Pisano, C., Carminati, P., Riccardi, R. (2005). The novel lipophilic camptothecin analogue gimatecan is very active in vitro in human neuroblastoma: a comparative study with SN38 and topotecan. Biochemical Pharmacology. 70(8): 1125-1136.
- Diaz-Gonzalez, R., Perez-Pertejo, Y., Pommier, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2008). Mutational study of the "catalytic tetrad" of DNA topoisomerase IB from the hemoflagellate *Leishmania donovani*: Role of Asp-353 and Asn-221 in camptothecin resistance. Biochemical Pharmacology. 76(5): 608-619.
- Donovan, C. (1903). The etiology of the heterogeneous fevers in India. British Journal of Medicine. 1401.
- Dorleans, A., Gigant, B., Ravelli, R. B., Mailliet, P., Mikol, V., Knossow, M. (2009). Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106(33): 13775-13779.

- Dostalova, A., Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasites & Vectors. 5(1): 276.
- Downing, K. H., Nogales, E. (1999). Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. Cell Structure and Function. 24(5): 269-275.
- Draber, P., Draberova, E. (2003). Gamma-tubulins and their functions. TSitol Genet. 37(2): 3-10.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., Liang, J. (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. Nucleic Acids Research. 34(Web Server issue): W116-W118.
- Eberle, C., Lauber, B. S., Fankhauser, D., Kaiser, M., Brun, R., Krauth-Siegel, R. L., Diederich, F. (2011). Improved inhibitors of trypanothione reductase by combination of motifs: synthesis, inhibitory potency, binding mode, and antiprotozoal activities. ChemMedChem. 6(2): 292-301.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research. 32(5): 1792-1797.
- Eich, E., Schulz, J., Kaloga, M., Merz, H., Schröder, H., Müller, W. (1991). Interference of Epipodophyllotoxins and Natural Lignanolides with Topoisomerase II: A Proposed Molecular Mechanism. Planta Medica.(S 2).
- Eltoum, I. A., Zijlstra, E. E., Ali, M. S., Ghalib, H. W., Satti, M. M. H., Eltoum, B., El-Hassan,
 A. M. (1992). Congenital Kala-Azar and Leishmaniasis in the Placenta. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 46(1): 57-62.
- Filho, S. A., Pereira de Almeida, E. R., Gander, E. S. (1978). The influence of hydroxyurea and colchicine on growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica. 35(3): 229-237.
- Fiser, A., Do, R. K. G., Šali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. Protein Science. 9(9): 1753-1773.
- Fong, D., Wallach, M., Keithly, J., Melera, P. W., Chang, K. P. (1984). Differential expression of mRNAs for alpha- and beta-tubulin during differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 81(18): 5782-5786.
- Forestier, C. L. (2013). Imaging host-*Leishmania* interactions: significance in visceral leishmaniasis. Parasite Immunology. 35(9-10): 256-266.
- Forterre, P. (2008). In a world of microbes, where should microbiology stand? Research in Microbiology. 159(1): 74-80.
- Gade, D. W. (1979). Inca and colonial settlement, coca cultivation and endemic disease in the tropical forest. Journal of Historical Geography. 5: 263-280.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R. B., Roussi, F., Steinmetz, M. O., Curmi, P. A., Sobel, A., Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. Nature. 435(7041): 519-522.
- Gordaliza, M., Castro, M. A., Garcia-Gravalos, M. D., Ruiz, P., Miguel del Corral, J. M., San Feliciano, A. (1994). Antineoplastic and antiviral activities of podophyllotoxin related lignans. Archiv der Pharmazie. 327(3): 175-179.
- Gordaliza, M., Miguel del Corral, J. M., Angeles Castro, M., López-Vázquez, M. L., García,
 P. A., San Feliciano, A., García-Grávalos, M. D. (1995a). Selective cytotoxic cyclolignans. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 5(21): 2465-2468.

- Gordaliza, M., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Lopez-Vazquez, M. L., San Feliciano, A., Garcia-Gravalos, M. D., Carpy, A. (1995b). Synthesis and evaluation of pyrazolignans. A new class of cytotoxic agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 3(9): 1203-1210.
- Gordaliza, M., Faircloth, G. T., Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Lopez-Vazquez, M.
 L., San Feliciano, A. (1996a). Immunosuppressive cyclolignans. Journal of Medicinal Chemistry. 39(14): 2865-2868.
- Gordaliza, M., Miguel del Corral, J. M., Angeles Castro, M., Mar Mahiques, M., García-Grávalos, M. D., San Feliciano, A. (1996b). Synthesis and bioactivity of new antineoplastic terpenylquinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 6(15): 1859-1864.
- Gordaliza, M., Castro, M., Miguel del Corral, J. M., López-Vázquez, M. L., García, P. A., San Feliciano, A., García-Grávalos, M. D., Broughton, H. (1997). Preparation and cytotoxicity of podophyllotoxin derivatives lacking the lactone ring. Tetrahedron. 53(46): 15743-15760.
- Gordaliza, M., Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., Feliciano, A. S. (2000a). Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. Current Pharmaceutical Design. 6(18): 1811-1839.
- Gordaliza, M., Castro, M. A., Miguel del Corral, J. M., López-Vázquez, M. L., A. García, P., García-Grávalos, M. D., San Feliciano, A. (2000b). Synthesis and antineoplastic activity of cyclolignan aldehydes. European Journal of Medicinal Chemistry. 35(7– 8): 691-698.
- Gordaliza, M., Miguel del Corral, J. M., Angeles Castro, M., Garcia-Garcia, P. A., San Feliciano, A. (2001). Cytotoxic cyclolignans related to podophyllotoxin. Farmaco. 56(4): 297-304.
- Gordaliza, M. (2010). Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. Marine Drugs. 8(12): 2849-2870.
- Griewank, K., Gazeau, C., Eichhorn, A., von Stebut, E. (2010). Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(2): 652-659.
- Gupta, S., Bhattacharyya, B. (2003). Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin. Molecular and Cellular Biochemistry. 253(1): 41-47.
- Haber, J. E., Peloquin, J. G., Halvorson, H. O., Borisy, G. G. (1972). Colcemid inhibition of cell growth and the characterization of a colcemid-binding activity in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Cell Biology. 55(2): 355-367.
- Haeusser, D. P., Margolin, W. (2011). Prokaryotic cytokinesis: little rings bring big cylindrical things. Current Biology. 21(6): R221-R223.
- Handman, E. (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clinical Microbiology Reviews. 14(2): 229-243.
- Hartley, R. M., Peng, J., Fest, G. A., Dakshanamurthy, S., Frantz, D. E., Brown, M. L., Mooberry, S. L. (2012). Polygamain, a new microtubule depolymerizing agent that occupies a unique pharmacophore in the colchicine site. Molecular Pharmacology. 81(3): 431-439.
- Havens, C. G., Bryant, N., Asher, L., Lamoreaux, L., Perfetto, S., Brendle, J. J., Werbovetz,
 K. A. (2000). Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*.
 Molecular and Biochemical Parasitology. 110(2): 223-236.

- Hawgood, B. J. (1994). The life and viper of Dr Patrick Russell MD FRS (1727-1805): physician and naturalist. Toxicon. 32(11): 1295-1304.
- Hawkins, T., Mirigian, M., Selcuk Yasar, M., Ross, J. L. (2010). Mechanics of microtubules. Journal of Biomechanics. 43(1): 23-30.
- Henriquez, F. L., Ingram, P. R., Muench, S. P., Rice, D. W., Roberts, C. W. (2008). Molecular basis for resistance of *Acanthamoeba* tubulins to all major classes of antitubulin compounds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52(3): 1133-1135.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. The Lancet. 354(9185): 1191-1199.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.
 H., von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. Nature. 433(7024): 377-381.
- Hitchings, G. H. (1975). Pharmacology of allopurinol. Arthritis & Rheumatology. 18(6 Suppl): 863-870.
- Holm, L., Sander, C. (1996). Mapping the protein universe. Science. 273(5275): 595-603.
- Holzer, T. R., McMaster, W. R., Forney, J. D. (2006). Expression profiling by wholegenome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. Molecular and Biochemical Parasitology. 146(2): 198-218.
- Horio, T., Murata, T. (2014). The role of dynamic instability in microtubule organization. Frontiers in Plant Science. 5.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. Journal of Molecular Graphics. 14(1): 33-38, 27-38.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 96(1): 23-28.
- Islam, M. N., Iskander, M. N. (2004). Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 4(10): 1077-1104.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. Journal of Bacteriology. 153(1): 163-168.
- Jayanarayan, K. G., Dey, C. S. (2002). Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in *Leishmania*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 27(5): 313-320.
- Jean-Moreno, V., Rojas, R., Goyeneche, D., Coombs, G. H., Walker, J. (2006). *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. Experimental Parasitology. 112(1): 21-30.
- Johnson, R., Cubria, J. C., Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., Ordonez, D. (1998). Interaction of cationic diamidines with *Leishmania infantum* DNA. The Journal of Biological Chemistry. 379(7): 925-930.
- Jorgensen, W. L. (1991). Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. Science. 254(5034): 954-955.
- Kamal, A., Srinivasa Reddy, T., Polepalli, S., Shalini, N., Reddy, V. G., Subba Rao, A. V., Jain, N., Shankaraiah, N. (2014). Synthesis and biological evaluation of podophyllotoxin congeners as tubulin polymerization inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 22(19): 5466-5475.

- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends in Parasitology. 22(9): 439-445.
- Kanehisa, M., Bork, P. (2003). Bioinformatics in the post-sequence era. Nature Genetics.
- Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K., Soni, R., Bariwal, J. (2014). Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. European Journal of Medicinal Chemistry. 87(0): 89-124.
- Kazemi, B. (2011). Genomic organization of leishmania species. Iranian Journal of Parasitology. 6(3): 1-18.
- Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., Modabber, F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. Indian Journal of Medical Research. 123(3): 423-438.
- Khan, W., Kumar, R., Singh, S., Arora, S. K., Kumar, N. (2013). Paromomycin-loaded albumin microspheres: efficacy and stability studies. Drug Testing and Analysis. 5(6): 468-473.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M. P., Cadiergues, M. C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology. 11(2): 105-111.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in Dermatology. 17(3): 279-289.
- Killick-Kendrick, R. (2013). The race to discover the insect vector of kala-azar: a great saga of tropical medicine 1903-1942. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique. 106(2): 131-137.
- Kingston, D. G. (2009). Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. Journal of Natural Products. 72(3): 507-515.
- Kirschner, M. W., Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics. Nature. 324(6098): 621.
- Klotz, L. O., Hou, X., Jacob, C. (2014). 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. Molecules. 19(9): 14902-14918.
- Knowles, B., Howe, C., Aden, D. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science. 209(4455): 497-499.
- Kollmannsberger, C., Mross, K., Jakob, A., Kanz, L., Bokemeyer, C. (1999). Topotecan A novel topoisomerase I inhibitor: pharmacology and clinical experience. Oncology. 56(1): 1-12.
- Koster, D. A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S., Dekker, N. H. (2005). Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. Nature. 434(7033): 671-674.
- Kozyavkin, S. A., Krah, R., Gellert, M., Stetter, K. O., Lake, J. A., Slesarev, A. I. (1994). A reverse gyrase with an unusual structure. A type I DNA topoisomerase from the hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* is a two-subunit protein. The Journal of Biological Chemistry. 269(15): 11081-11089.
- Krebs, A., Goldie, K. N., Hoenger, A. (2005). Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation. The EMBO Reports. 6(3): 227-232.
- Krenitsky, T. A., Papaioannou, R., Elion, G. B. (1969). Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties, and specificity. The Journal of Biological Chemistry. 244(5): 1263-1270.

- Krogh, B. O., Shuman, S. (2000). Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB. Molecular Cell. 5(6): 1035-1041.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. Journal of Molecular Biology. 47(1): 69-85.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., Solbach, W. (2008). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infectionpromoting factor. Immunobiology. 213(3–4): 183-191.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography. 26(2): 283-291.
- Leishman, W. B. (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. British Medical Journal. 1252–1254.
- Leppard, J., Champoux, J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. Chromosoma. 114(2): 75-85.
- Leprohon, P., Fernandez-Prada, C., Gazanion, E., Monte-Neto, R., Ouellette, M. (2015). Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 5(1): 26-35.
- Levitt, M. (2001). The birth of computational structural biology. Nature Structural & Molecular Biology. 8(5): 392-393.
- Li, C. J., Averboukh, L., Pardee, A. B. (1993). beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. The Journal of Biological Chemistry. 268(30): 22463-22468.
- Liu, L. F., Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84(20): 7024-7027.
- Liu, L. F., Desai, S. D., Li, T. K., Mao, Y., Sun, M., Sim, S. P. (2000). Mechanism of action of camptothecin. Annals of the New York Academy of Sciences. 922: 1-10.
- Logan-Klumpler, F. J., De Silva, N., Boehme, U., Rogers, M. B., Velarde, G., McQuillan, J.
 A., Carver, T., Aslett, M., Olsen, C., Subramanian, S., Phan, I., Farris, C., Mitra, S.,
 Ramasamy, G., Wang, H., Tivey, A., Jackson, A., Houston, R., Parkhill, J., Holden,
 M., Harb, O. S., Brunk, B. P., Myler, P. J., Roos, D., Carrington, M., Smith, D. F.,
 Hertz-Fowler, C., Berriman, M. (2012). GeneDB—an annotation database for
 pathogens. Nucleic Acids Research. 40(D1): D98-D108.
- López-Pérez, J. L., del Olmo, E., de Pascual-Teresa, B., Merino, M., Barajas, M., San Feliciano, A. (2000). A role for dipole moment in the activity of cyclolignans. Journal of Molecular Structure. 504(1–3): 51-57.
- López-Pérez, J. L., del Olmo, E., de Pascual-Teresa, B., Abad, A., San Feliciano, A. (2004).
 Synthesis and cytotoxicity of hydrophobic esters of podophyllotoxins. Bioorganic
 & Medicinal Chemistry Letters. 14(5): 1283-1286.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H., Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha betatubulin at 3.5 A resolution. Journal of Molecular Biology. 313(5): 1045-1057.
- Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W., Miller, D. (2012). An overview of tubulin Inhibitors that interact with the colchicine binding site. Pharmaceutical Research. 29(11): 2943-2971.

- Luchko, T., Torin Huzil, J., Stepanova, M., Tuszynski, J. (2008). Conformational analysis of the carboxy-terminal tails of human β-tubulin isotypes. Biophysical Journal. 94(6): 1971-1982.
- Luis, L., Serrano, M. L., Hidalgo, M., Mendoza-León, A. (2013). Comparative analyses of the β-tubulin gene and molecular modeling reveal molecular insight into the colchicine resistance in kinetoplastids organisms. BioMed Research International. 2013: 843748.
- Luque-Ortega, J. R., Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(4): 1327-1332.
- Ma, Y., Fang, S., Li, H., Han, C., Lu, Y., Zhao, Y., Liu, Y., Zhao, C. (2013). Biological evaluation and molecular modelling study of podophyllotoxin derivatives as potent inhibitors of tubulin polymerization. Chemical Biology & Drug Design. 82(1): 12-21.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. The Journal of Physical Chemistry B. 102(18): 3586-3616.
- Madadkar-Sobhani, A., Guallar, V. (2013). PELE web server: atomistic study of biomolecular systems at your fingertips. Nucleic Acids Research. 41(Web Server issue): W322-328.
- Mandelkow, E. M., Schultheiss, R., Rapp, R., Müller, M., Mandelkow, E. (1986). On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. The Journal of Cell Biology. 102(3): 1067-1073.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology. 27(2): 123-147.
- Marr, J. J., Berens, R. L., Nelson, D. J. (1978). Antitrypanosomal effect of allopurinol: conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by Trypanosoma curzi. Science. 201(4360): 1018-1020.
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Šali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 29(1): 291-325.
- Maslov, D. A., Votýpka, J., Yurchenko, V., Lukeš, J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. Trends in Parasitology. 29(1): 43-52.
- Massarotti, A., Coluccia, A., Silvestri, R., Sorba, G., Brancale, A. (2012). The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. ChemMedChem. 7(1): 33-42.
- Matsumoto, M., Misawa, S., Chiba, N., Takaku, H., Hayashi, H. (2001). Selective nonpeptidic inhibitors of herpes simplex virus type 1 and human cytomegalovirus proteases. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 24(3): 236-241.
- McCall, L. I., Zhang, W. W., Matlashewski, G. (2013). Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. PLoS Pathogens. 9(1): e1003053.

- McConville, M. J., Ferguson, M. A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochemical Journal. 294 (Pt 2): 305-324.
- McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C., Teasdale, R. D. (2002). Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66(1): 122-154.
- McKean, P. G., Vaughan, S., Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. Journal of Cell Science. 114(15): 2723-2733.
- Medarde, M., Ramos, A. C., Caballero, E., Luis López, J., Peláez-Lamamiéde Clairac, R., San Feliciano, A. (1996). A new approach to the synthesis of podophyllotoxin based on epimerization reactions. Tetrahedron Letters. 37(15): 2663-2666.
- Meng, L. H., Liao, Z. Y., Pommier, Y. (2003). Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. Current Topics in Medicinal Chemistry. 3(3): 305-320.
- Merschjohann, K., Sporer, F., Steverding, D., Wink, M. (2001). In vitro effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. Planta Medica. 67(7): 623-627.
- Meyer, T. S., Lamberts, B. L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. Biochimica et Biophysica Acta. 107(1): 144-145.
- Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Castro, M. A., Morales, L. J., Lopez, J. L., San Feliciano, A. (1995). Methyl ethers of podophyllotoxin-related cyclolignans. Journal of Natural Products. 58(6): 870-877.
- Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Castro, M. A., López-Vázquez, M. L., García-Grávalos, M. D., Broughton, H. B., San Feliciano, A. (1997). Bioactive isoxazoline and oxime derivatives from 7-ketolignans. Tetrahedron. 53(18): 6555-6564.
- Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Castro, M. A., Mahiques, M. M., San Feliciano, A., Garcia-Gravalos, M. D. (1998). Further antineoplastic terpenylquinones and terpenylhydroquinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 6(1): 31-41.
- Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Castro, M. A., Mahiques, M. M., Chamorro, P., Molinari, A., Garcia-Gravalos, M. D., Broughton, H. B., San Feliciano, A. (2001). New selective cytotoxic diterpenylquinones and diterpenylhydroquinones. Journal of Medicinal Chemistry. 44(8): 1257-1267.
- Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Gordaliza, M., Martin, M. L., Gamito, A. M., Cuevas, C., Feliciano, A. S. (2006a). Synthesis and cytotoxicity of new heterocyclic terpenylnaphthoquinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 14(8): 2816-2827.
- Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Oliveira, A. B., Gualberto, S. A., Cuevas, C., San Feliciano, A. (2006b). New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 14(21): 7231-7240.
- Mikstacka, R., Stefański, T., Różański, J. (2013). Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. Cellular & Molecular Biology Letters. 18(3): 368-397.
- Miro, G., Checa, R., Montoya, A., Hernandez, L., Dado, D., Galvez, R. (2012). Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. Parasites & Vectors. 5: 60.
- Mohapatra, S. (2014). Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. Tropical Parasitology. 4(1): 4-9.

- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Veterinary Parasitology. 190(1–2): 268-271.
- Molinari, A., Oliva, A., Aguilera, N., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Gordaliza, M., Garcia-Gravalos, M. D., San Feliciano, A. (2000). New antineoplastic prenylhydroquinones. Synthesis and evaluation. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 8(5): 1027-1032.
- Molinari, A., Oliva, A., Reinoso, P., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Gordaliza, M., Gupta, M. P., Solis, P., San Feliciano, A. (2002). Cytotoxic-antineoplastic activity of hydroquinone derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 37(2): 177-182.
- Molinari, A., Oliva, A., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Araya, C., Garcia-Gravalos,
 M. D., San Feliciano, A. (2004). Cytotoxic-antineoplastic activity of acetyl derivatives of prenylnaphthohydroquinone. Farmaco. 59(8): 651-656.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Van der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology. 137(8): 1159-1168.
- Montgomery, J., Curtis, J., Handman, E. (2002). Genetic and structural heterogeneity of proteophosphoglycans in *Leishmania*. Molecular and Biochemical Parasitology. 121(1): 75-85.
- Mooberry, S. L., Tien, G., Hernandez, A. H., Plubrukarn, A., Davidson, B. S. (1999). Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. Cancer Research. 59(3): 653-660.
- Moreno, J., Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology. 18(9): 399-405.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. Journal of Computational Chemistry. 19(14): 1639-1662.
- Mosser, D. M., Edelson, P. J. (1987). The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. Nature. 327(6120): 329-331.
- Mouri, O., Morizot, G., Van der Auwera, G., Ravel, C., Passet, M., Chartrel, N., Joly, I., Thellier, M., Jauréguiberry, S., Caumes, E., Mazier, D., Marinach-Patrice, C., Buffet, P. (2014). Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. PLoS Neglected Tropical Diseases. 8(6): e2841.
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J. E., Kaye, P. M., Chatterjee, M. (2014). Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. Trends in Parasitology. 30(2): 65-74.
- Myler, P., Fasel, N (2008). Leishmania: After The Genome, Caister Academic Press.
- Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar-Bidruni, G., Ghorbani, M. (1983). Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales. 76(4): 377-383.
- Navarro, G. (2001). A guided tour to approximate string matching. ACM Computing Surveys. 33(1): 31-88.

- Navin, T. R., Arana, B. A., Arana, F. E., Berman, J. D., Chajón, J. F. (1992). Placebocontrolled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. Journal of Infectious Diseases. 165(3): 528-534.
- Nawrotek, A., Knossow, M., Gigant, B. (2011). The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. Journal of Molecular Biology. 412(1): 35-42.
- Nguewa, P. A., Fuertes, M. A., Cepeda, V., Iborra, S., Carrión, J., Valladares, B., Alonso, C., Pérez, J. M. (2005). Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. Chemistry & Biodiversity. 2(10): 1387-1400.
- Nguyen, T. L., McGrath, C., Hermone, A. R., Burnett, J. C., Zaharevitz, D. W., Day, B. W., Wipf, P., Hamel, E., Gussio, R. (2005). A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. Journal of Medicinal Chemistry. 48(19): 6107-6116.
- Nieto, A., Dominguez-Bernal, G., Orden, J., De La Fuente, R., Madrid-Elena, N., Carrion, J. (2011). Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. Veterinary Research. 42(1): 39.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Luduena, R. F., Downing, K. H. (1995). Structure of tubulin at 6.5 A and location of the taxol-binding site. Nature. 375(6530): 424-427.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A., Lowe, J. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. Nature Structure Biology. 5(6): 451-458.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H. (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. Nature. 391(6663): 199-203.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. Cell. 96(1): 79-88.
- O'Brien, P. J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chemico-Biological Interactions. 80(1): 1-41.
- O'Dwyer, P. J., Leyland-Jones, B., Alonso, M. T., Marsoni, S., Wittes, R. E. (1985). Etoposide (VP-16-213). Current status of an active anticancer drug. The New England Journal of Medicine. 312(11): 692-700.
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M.
 C., Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Tropica. 118(2): 87-96.
- Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., Shio, M. T. (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. Microbes and Infection. 14(15): 1377-1389.
- OMS (2010). Control of the leishmaniases. Report of a WHO expert commitee, World Health Organization technical report series. 949: 1-186.
- Osorio, Y., Travi, B. L., Renslo, A. R., Peniche, A. G., Melby, P. C. (2011). Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel ex vivo splenic explant model system. PLoS Neglected Tropical Diseases. 5(2): e962.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends in Parasitology. 29(7): 339-345.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine. 26(14): 1709-1724.

- Paniz Mondolfi, A. E., Duffey, G. B., Horton, L. E., Tirado, M., Reyes Jaimes, O., Perez-Álvarez, A., Zerpa, O. (2013). Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. International Journal of Dermatology. 52(4): 446-455.
- Pedrique, B., Strub-Wourgaft, N., Some, C., Olliaro, P., Trouiller, P., Ford, N., Pécoul, B., Bradol, J.-H. (2013). The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. The Lancet Global Health. 1(6): e371-e379.
- Peniche, A. G., Osorio, Y., Renslo, A. R., Frantz, D. E., Melby, P. C., Travi, B. L. (2014). Development of an ex vivo lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 58(1): 78-87.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., Sacks, D. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science. 321(5891): 970-974.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry. 25(13): 1605-1612.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nature Reviews Cancer. 6(10): 789-802.
- Pommier, Y., Cushman, M. (2009). The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. Mol Cancer Ther. 8(5): 1008-1014.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chemistry & Biology. 17(5): 421-433.
- Potmesil, M. (1994). Camptothecins: from bench research to hospital wards. Cancer Research. 54(6): 1431-1439.
- Prada, C. F., Álvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R., Prieto, C., Calvo-Álvarez, E., Escudero-Martínez, J. M., Requena, J. M., Ordóñez, C., Desideri, A., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, R. M. (2013). Gimatecan and other camptothecin derivatives poison Leishmania DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. Biochemical Pharmacology. 85(10): 1433-1440.
- Pratt, D. M., David, J. R. (1981). Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of Leishmania. Nature. 291(5816): 581-583.
- Prota, A. E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J. J., Diaz, J. F., Altmann, K. H., Steinmetz, M. O. (2013). Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. Science. 339(6119): 587-590.
- Prota, A. E., Bargsten, K., Northcote, P. T., Marsh, M., Altmann, K.-H., Miller, J. H., Díaz, J.
 F., Steinmetz, M. O. (2014). Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. Angewandte Chemie International Edition. 53(6): 1621-1625.
- Prudhomme, M. (2003). Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents. European Journal of Medicinal Chemistry. 38(2): 123-140.
- Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P., Loiseau, P. M. (2007). Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(4): 1425-1430.

- Ranaivoson, F. M., Gigant, B., Berritt, S., Joullié, M., Knossow, M. (2012). Structural plasticity of tubulin assembly probed by vinca-domain ligands. Acta Crystallographica. 68(8): 927-934.
- Rao, S. T., Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. Journal of Molecular Biology. 76(2): 241-256.
- Ravelli, R. B., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. Nature. 428(6979): 198-202.
- Ray, S., Hazra, B., Mittra, B., Das, A., Majumder, H. K. (1998). Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. Molecular Pharmacology. 54(6): 994-999.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. Eurosurveillance. 15(10): 19505.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annual Review of Entomology. 58: 227-250.
- Ready, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Epidemiology. 6: 147-154.
- Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J., Hol, W. G. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. Science. 279(5356): 1504-1513.
- Redinbo, M. R., Champoux, J. J., Hol, W. G. (1999). Structural insights into the function of type IB topoisomerases. Current Opinion in Structural Biology. 9(1): 29-36.
- Redinbo, M. R., Champoux, J. J., Hol, W. G. (2000). Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. Biochemistry. 39(23): 6832-6840.
- Reguera, R. M., Redondo, C. M., Gutierrez de Prado, R., Perez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce,
 R. (2006). DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. Biochimica et Biophysica Acta. 1759(3-4): 117-131.
- Riera, C., Fisa, R., Lopez-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jimenez, M., Muncunill, J., Sedeno, M., Mascaro, M., Udina, M., Gallego, M., Carrio, J., Forteza, A., Portus, M. (2008). Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). Transfusion. 48(7): 1383-1389.
- Risinger, A. L., Giles, F. J., Mooberry, S. L. (2009). Microtubule dynamics as a target in oncology. Cancer Treatment Reviews. 35(3): 255-261.
- Ritter, U., Frischknecht, F., van Zandbergen, G. (2009). Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? Trends in Parasitology. 25(11): 505-510.
- Roditi, I., Liniger, M. (2002). Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. Trends in Microbiology. 10(3): 128-134.
- Roll-Mecak, A. (2014). Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions? Seminars in Cell & Developmental Biology.(0).
- Rollinger, J. M., Stuppner, H., Langer, T. (2008). Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. Progress in Drug Research. 65: 211, 213-249.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. Protein Engineering Design and Selection. 12(2): 85-94.
- Sackett, D. L. (1993). Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: Natural products that bind at the colchicine site of tubulin. Pharmacology & Therapeutics. 59(2): 163-228.

- Sacks, D., Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annual Review of Microbiology. 55: 453-483.
- Šali, A., Blundell, T. L. (1993). Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. Journal of Molecular Biology. 234(3): 779-815.
- Salmon-Chemin, L., Buisine, E., Yardley, V., Kohler, S., Debreu, M. A., Landry, V., Sergheraert, C., Croft, S. L., Krauth-Siegel, R. L., Davioud-Charvet, E. (2001). 2and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. The Journal of Biological Chemistry. 44(4): 548-565.
- San Feliciano, A., Medarde, M., Lopez, J. L., Puebla, P., Miguel del Corral, J. M., Barrer, A. F. (1989a). Lignans from *Juniperus thurifera*. Phytochemistry. 28(10): 2863-2866.
- San Feliciano, A., Miguel del Corral, J. M., Gordaliza, M., Castro, M. A. (1989b). Acetylated lignans from *Juniperus sabina*. Phytochemistry. 28(2): 659-660.
- San Feliciano, A., Miguel del Corral, J. M., Lopez, J. L., De Pascual-Teresa, B. (1992). Lignans from polar extracts of *Juniperus thurifera*. Phytochemistry. 31(1): 267-270.
- San Feliciano, A., Gordaliza, M., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., Garcia-Gravalos,
 M. D., Ruiz-Lazaro, P. (1993). Antineoplastic and antiviral activities of some cyclolignans. Planta Medica. 59(3): 246-249.
- Sanders, J. W., Putnam, S. D., Frankart, C., Frenck, R. W., Monteville, M. R., Riddle, M. S., Rockabrand, D. M., Sharp, T. W., Tribble, D. R. (2005). Impact of illness and noncombat injury during operations Iraqi freedom and enduring freedom (Afghanistan). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 73(4): 713-719.
- Schönian, G., Mauricio, I., Gramiccia, M., Cañavate, C., Boelaert, M., Dujardin, J.-C. (2008). Leishmaniases in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. Trends in Parasitology. 24(3): 135-142.
- Seeliger, D., de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 24(5): 417-422.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., V. Maizel Jr, J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochemical and Biophysical Research Communications. 28(5): 815-820.
- Sharma, S., Poliks, B., Chiauzzi, C., Ravindra, R., Blanden, A. R., Bane, S. (2010). Characterization of the colchicine binding site on avian tubulin isotype betaVI. Biochemistry. 49(13): 2932-2942.
- Shityakov, S., Neuhaus, W., Dandekar, T., Forster, C. (2013). Analysing molecular polar surface descriptors to predict blood-brain barrier permeation. International Journal of Computational Biology and Drug Design. 6(1-2): 146-156.
- Shoichet, B. K., Kuntz, I. D., Bodian, D. L. (1992). Molecular docking using shape descriptors. Journal of Computational Chemistry. 13(3): 380-397.
- Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. Science. 324(5928): 804-807.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable

generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular systems biology. 7: 539.

- Sindermann, H., Croft, S. L., Engel, K. R., Bommer, W., Eibl, H. J., Unger, C., Engel, J. (2004). Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. Medical Microbiology and Immunology. 193(4): 173-180.
- Singh, G., Dey, C. S. (2007). Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant L. donovani. Acta Tropica. 103(3): 172-185.
- Siqueira-Neto, J. L., Moon, S., Jang, J., Yang, G., Lee, C., Moon, H. K., Chatelain, E., Genovesio, A., Cechetto, J., Freitas-Junior, L. H. (2012). An image-based highcontent screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. PLoS Neglected Tropical Diseases. 6(6): 12.
- Skoufias, D. A., Wilson, L. (1992). Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulincolchicine complexes. Biochemistry. 31(3): 738-746.
- Slesarev, A. I., Stetter, K. O., Lake, J. A., Gellert, M., Krah, R., Kozyavkin, S. A. (1993). DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. Nature. 364(6439): 735-737.
- Solary, E., Leteurtre, F., Paull, K. D., Scudiero, D., Hamel, E., Pommier, Y. (1993). Dual inhibition of topoisomerase II and tubulin polymerization by azatoxin, a novel cytotoxic agent. Biochemical Pharmacology. 45(12): 2449-2456.
- Sosa, H., Hoenger, A., Milligan, R. A. (1997). Three different approaches for calculating the three-dimensional structure of microtubules decorated with kinesin motor domains. Journal of Structural Biology. 118(2): 149-158.
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J., Sindermann, H. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases. 38(9): 1266-1272.
- Spector, T., Jones, T. E., LaFon, S. W., Nelson, D. J., Berens, R. L., Marr, J. J. (1984). Monophosphates of formycin B and allopurinol riboside. Interactions with leishmanial and mammalian succino-AMP synthetase and GMP reductase. Biochemical Pharmacology. 33(10): 1611-1617.
- Staker, B. L., Feese, M. D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L., Burgin, A. B. (2005). Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. The Journal of Biological Chemistry. 48(7): 2336-2345.
- Stengel, C., Newman, S. P., Leese, M. P., Potter, B. V. L., Reed, M. J., Purohit, A. (2010). Class III β-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. British Journal of Cancer. 102(2): 316-324.
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P., Pagès, M. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. Molecular Microbiology. 86(1): 15-23.
- Stewart, L., Ireton, G. C., Champoux, J. J. (1996). The domain organization of human topoisomerase I. The Journal of Biological Chemistry. 271(13): 7602-7608.
- Stewart, L., Redinbo, M. R., Qiu, X., Hol, W. G., Champoux, J. J. (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. Science. 279(5356): 1534-1541.

- Suarez Rodriguez, B., Isidoro Fernandez, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., Amela Heras, C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Revista Española de de Salud Pública. 86(6): 555-564.
- Sui, H., Downing, K. H. (2010). Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. Structure. 18(8): 1022-1031.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Mishra, M., Singh, V. P., Buffels, R. (2003). Single-dose liposomal Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. Clinical Infectious Diseases. 37(6): 800-804.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Sinha, P. K., Bhattacharya, S. K. (2007). Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. The New England Journal of Medicine. 356(25): 2571-2581.
- Symmers, W. S. (1960). Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. The Lancet. 1(7116): 127-132.
- Tanizawa, A., Kohn, K. W., Pommier, Y. (1993). Induction of cleavage in topoisomerase I c-DNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin. Nucleic Acids Research. 21(22): 5157-5166.
- ter Haar, E., Rosenkranz, H. S., Hamel, E., Day, B. W. (1996). Computational and molecular modeling evaluation of the structural basis for tubulin polymerization inhibition by colchicine site agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 4(10): 1659-1671.
- Tietze, L. F., Bell, H. P., Chandrasekhar, S. (2003). Natural product hybrids as new leads for drug discovery. Angewandte Chemie International Edition. 42(34): 3996-4028.
- Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., de Freitas, L. A., Beverley, S. M. (1995). Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 92(22): 10267-10271.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76(9): 4350-4354.
- Traub-Cseko, Y. M., Ramalho-Ortigao, J. M., Dantas, A. P., de Castro, S. L., Barbosa, H. S., Downing, K. H. (2001). Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi*. Trends in Parasitology. 17(3): 136-141.
- Travers, A., Muskhelishvili, G. (2015). DNA structure and function. FEBS J. 282(12): 2279-2295.
- Trott, O., Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry. 31(2): 455-461.
- Turco, S. J., Sacks, D. L. (1991). Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. 45(1): 91-99.
- van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., Boelaert, M. (2010). Combination therapy for visceral leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases. 10(3): 184-194.

- van Griensven, J., Boelaert, M. (2011). Combination therapy for visceral leishmaniasis. The Lancet. 377(9764): 443-444.
- Vaughan, S., Attwood, T., Navarro, M., Scott, V., McKean, P., Gull, K. (2000). New tubulins in protozoal parasites. Current Biology. 10(7): R258-R259.
- Verma, N. K., Singh, G., Dey, C. S. (2007). Miltefosine induces apoptosis in arseniteresistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. Experimental Parasitology. 116(1): 1-13.
- Vieira, S., Castelli, S., Falconi, M., Takarada, J., Fiorillo, G., Buzzetti, F., Lombardi, P., Desideri, A. (2015). Role of 13-(di)phenylalkyl berberine derivatives in the modulation of the activity of human topoisomerase IB. Int J Biol Macromol. 77: 68-75.
- Villa, H., Otero Marcos, A. R., Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., Garcia-Estrada, C., Perez-Pertejo, Y., Tekwani, B. L., Myler, P. J., Stuart, K. D., Bjornsti, M. A., Ordonez, D. (2003). A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. The Journal of Biological Chemistry. 278(6): 3521-3526.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 53(5): 1104-1111.
- Vlachakis, D., Pavlopoulou, A., Roubelakis, M. G., Feidakis, C., Anagnou, N. P., Kossida, S. (2014). 3D molecular modeling and evolutionary study of the *Trypanosoma brucei* DNA Topoisomerase IB, as a new emerging pharmacological target. Genomics. 103(1): 107-113.
- Vologodskii, A. V., Cozzarelli, N. R. (1994). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 23: 609-643.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., McPhail, A. T., Sim, G. A. (1966). Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata1,2. Journal of the American Chemical Society. 88(16): 3888-3890.
- Wang, H. W., Nogales, E. (2005). Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. Nature. 435(7044): 911-915.
- Wang, J. C. (1998). Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. Quarterly Reviews of Biophysics. 31(2): 107-144.
- Webb, B., Sali, A. (2014). Comparative protein structure modeling using MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics. 47: 5 6 1-5 6 32.
- Werbovetz, K., Brendle, J., Sackett, D. (1999). Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. Molecular and Biochemical Parasitology. 98(1): 53-65.
- Werbovetz, K. A. (2002). Tubulin as an antiprotozoal drug target. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2(6): 519-529.
- Wilson, W. D., Tanious, F. A., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J. E., Boykin, D. W. (2008). Antiparasitic compounds that target DNA. Biochimie. 90(7): 999-1014.
- Wright, J. H. (1903). Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi Sore"). The Journal of Medical Research. 10(3): 472-482 477.
- Wright, K. (1989). Antibodies a laboratory manual. Biochemical Education. 17(4): 220-220.

- Yakovich, A. J., Ragone, F. L., Alfonzo, J. D., Sackett, D. L., Werbovetz, K. A. (2006). Leishmania tarentolae: purification and characterization of tubulin and its suitability for antileishmanial drug screening. Experimental Parasitology. 114(4): 289-296.
- Yamashita, Y., Fujii, N., Murakata, C., Ashizawa, T., Okabe, M., Nakano, H. (1992). Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. Biochemistry. 31(48): 12069-12075.
- Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Meng, E. C., Sali, A., Ferrin, T. E. (2012). UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. Journal of Structural Biology. 179(3): 269-278.
- Young, D. C. (2001). Computational chemistry : a practical guide for applying techniques to real world problems. New York, J. Wiley.
- Young, D. G., Perkins P. V. (1984). Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). Journal of the American Mosquito Control Association 44: 263–304.
- Zhang, J., Chen, J., Liang, Z., Zhao, C. (2014). New lignans and their biological activities. Chemistry & Biodiversity. 11(1): 1-54.
- Zhang, Y. (2008). Progress and challenges in protein structure prediction. Current Opinion in Structural Biology. 18(3): 342-348.
- Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B. P., Mukhopadhyay, R. (2004). Leishmania major LmACR2 Is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. The Journal of Biological Chemistry. 279(36): 37445-37451.




Anexo I: Formulas químicas de los compuestos



H₃CO

ОН

осн₃

OCH₃







JAP-04

JAP-05

JAP-06

































JAP-16









Anexo I: Formulas químicas de los compuestos

















JAP-24



JAP-25



















JAP-31

















JAP-37







JAP-40









осн₃



осн₃

JAP-49

oсн3









JAP-52













JAP-56

JAP-57







Anexo I: Formulas químicas de los compuestos





JAP-61



CSD-01











CSD-04

CSD-05

CSD-06







CSD-07



CSD-09



CSD-10



CSD-12







CSD-13

CSD-15

M3R



M10E





03 JAP-104











09 JAM-422



11 JAM-440



08 JAM-463





12 JAP-120





13 JAP-119









15 JAP-505

16 JAP-506

17 JAP-507







18 JAMC-6000



20 JAP-508



21 JAMC-859

19 JAP-500



22 JAMC-6079



23 JAM-6009



25 JAMC-874



24 JAMC-6004









27 JAMC-8011



29 JAMC-868

28 JAMC-860



30 JAMC-6025





32 JAM-6013







31 JAP-108





34 JAP-109

35 JAP-103

36 JAP-102





38 JAP-501



Anexo II: Promastigotes L.major









 $IC_{50} = 155,43 \pm 5,66$

10

μM

100

 $R^2 = 0,9979$

0,2 ·

0,0

235



Anexo II: Promastigotes L.major







Anexo III: Promastigotes L.infantum



240















Anexo IV: Amastigotes L.infantum



248














Anexo V: Macrófagos peritoneales



Anexo VI: Esplenocitos



Anexo VI: Esplenocitos









Anexo VI: Esplenocitos







Anexo VII: Línea celular HepG2



266







269









Anexo VIII: Porcentaje de inhibición tubulina



Anexo VIII: Porcentaje de inhibición tubulina



