



UNIVERSIDAD DE LEÓN
Dpto. de Ciencias Biomédicas
Área de Toxicología

POTENCIAL TERAPÉUTICO Y TOXICIDAD DE INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS COMO ANTIPARASITARIOS

Tesis Doctoral

Celia Fernández Rubio
León 2010

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

La Dra. Dña. YOLANDA PÉREZ PERTEJO y la Dra Dña ROSA MARÍA REGUERA TORRES como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “POTENCIAL TERAPÉUTICO Y TOXICIDAD DE INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS COMO ANTIPARASITARIOS” realizada por D. CELIA FERNÁNDEZ RUBIO en el Departamento de CIENCIAS BIOMÉDICAS, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D.56/2005,
en León a 1 de DICIEMBRE de 2010

Fdo.: Yolanda Pérez Pertejo

Fdo.: Rosa María Reguera Torres

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su reunión celebrada el día de DICIEMBRE DE 2010, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “POTENCIAL TERAPÉUTICO Y TOXICIDAD DE INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS COMO ANTIPARASITARIOS”, dirigida por la Dra. Dña. YOLANDA PÉREZ PERTEJO y la Dra Dña. ROSA MARÍA REGUERA TORRES, elaborada por Dña. CELIA FERNÁNDEZ RUBIO, y cuyo título en inglés es el siguiente “STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE DNA TOPOISOMERASE I FROM *Leishmania donovani*”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a de DICIEMBRE de 2010.

El Secretario,

Fdo.: M^o Nélida Fernández Martínez

V^o B^o

El Director del Departamento,

Fdo.: M^o Jesús Tuñón González

A Laura y Alejandro.

*Háblame de otro sitio,
necesitaré cariño
cuando vuelva de luchar con los demás.
(Experimentos con gaseosa, J.)*

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de una u otra manera me han ayudado y acompañado en el desarrollo de este trabajo. Empezando por mis directoras de tesis, Dña. Rosa Reguera Torres, que en estos años me ha enseñado a valorar esta profesión y Dña. Yolanda Pérez Pertejo, que ha sido mi compañera y mi amiga, apoyándome en los momentos más duros, tanto profesionales como personales (no dejes nunca de sonreír así). Gracias.

A D. Rafael Balaña Fouce, que siempre ha confiado en mí y me aconsejado y guiado durante todo este trayecto. Sin su apoyo todo esto no hubiera sido posible.

A mis compañeros de laboratorio, Christopher, Estefanía, Clara, Raquel, David y José Miguel. Nunca olvidaré las horas que hemos pasado juntos y lo fácil que es disfrutar del trabajo en un ambiente como el que hemos compartido. Habéis sido un incondicional apoyo para mí, siempre dispuestos a tenderme una mano y a hacerme reír.

A D. José M^a Requena y su equipo, que me acogieron en su laboratorio del CBMSO como una más y a la RICET que me dio la oportunidad de cumplir con este proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de facultad (cuántas horas pasamos estudiando y sin estudiar), Aida, Ana, Guzmán, Marianna (ven pronto), Samu, Raúl, Andrea, Bianca, Raquel, Lucía, Inma....los que habéis estado a mi lado en todo momento. Habéis sido mi familia todos estos años. A Mel y Zoe, por esperarme siempre en casa ronroneando, a la hora que fuese.

A Ani, "i ens ha costat Déu i ajuda arribar fins aquí".

Y por supuesto, a toda mi familia. Mis abuelos por su apoyo y cariño durante toda mi vida. Mis padres y mis hermanos, Diego y Elena (Coco, se debe incluir), que me enseñaron a luchar por lo que quería, que me han ayudado en todo momento y que siempre han tenido paciencia conmigo.

Y a mis sobrinos, Laura y Alejandro, ojalá no cambiéis nunca.

Este trabajo es vuestro.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Leishmaniosis y ETD	1
1.1.1. Breve historia de la Leishmaniosis	2
1.1.2. El género <i>Leishmania</i>	2
1.1.2.1. Ciclo biológico en el vector	3
1.1.2.2. Ciclo biológico en el hospedador definitivo	8
1.1.3. Leishmaniosis	9
1.1.3.1. Leishmaniosis cutánea	10
1.1.3.2. Leishmaniosis mucocutánea (espundia)	11
1.1.3.3. Leishmaniosis visceral kala-azar	12
1.1.3.4. Leishmaniosis y SIDA	14
1.1.4. Leishmaniosis en España	15
1.1.4.1. El perro como reservorio	16
1.1.5. Tratamiento de la leishmaniosis	16
1.1.5.1. Inmunoterapia	18
1.1.5.2. Vacunas	18
1.1.5.3. Prevención de la enfermedad	21
1.1.5.4. Quimioterapia	23
1.2. Las ADN Topoisomerasas como dianas terapéuticas	27
1.2.1. La topología del ADN	27
1.2.2. Las ADN Topoisomerasas	27
1.2.2.1. Topoisomerasas tipo II	28
1.2.2.2. Topoisomerasas tipo I	30
1.2.3. Top II de tripanosomátidos	33
1.2.4. TopIB de tripanosomátidos	35
1.2.5. Inhibición de la TopIB en tripanosomátidos	37
1.2.5.1. Inhibidores de Clase I	38
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1. Material biológico	53
3.1.1. Cepas bacterianas	53
3.1.2. Cepas de levaduras	53
3.1.3. Cepas de <i>Leishmania</i>	54
3.1.4. Línea macrofágica murina RAW 264,7	54
3.2. Vectores	54
3.2.1. pBluescript SK (+/-)	54
3.2.2. pESC URA ⁻ GAL	55
3.3. Medios de cultivo	56
3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB)	56
3.3.2. Medio YPD	56
3.3.3. Medio SC URA ⁻	56
3.3.4. Medio M199	56
3.3.5. Medio RPMI	57
3.4. Mantenimiento de microorganismos	57
3.4.1. Mantenimiento de bacterias y levaduras	57
3.4.2. Mantenimiento de promastigotes de <i>Leishmania</i>	58
3.4.3. Mantenimiento de amastigotes axénicos de <i>L. pifanoi</i>	58
3.4.4. Mantenimiento de macrófagos RAW 264,7	58
3.5. Manipulación del ADN	60
3.5.1. Aislamiento del ADN	60

3.5.2.	Cuantificación, pureza y conservación del ADN	60
3.5.3.	Secuenciación del ADN	61
3.6.	Transformación de bacterias	61
3.6.1.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	61
3.6.2.	Procedimiento de transformación	62
3.7.	Transformación de levaduras	62
3.8.	Purificación de la TopIB de <i>Leishmania</i> a partir de cultivos de levaduras	63
3.8.1.	Sobreexpresión de Topoisomerasa de <i>Leishmania</i>	63
3.8.2.	Preparación de columna de fosfocelulosa (P11)	64
3.8.3.	Preparación de columna de fenilsefarosa (PSP)	65
3.8.4.	Obtención de lisado y clarificado	65
3.8.4.1.	Columna P11	66
3.8.4.2.	Columna PSP	66
3.8.4.3.	Diálisis	66
3.8.4.4.	Concentración de proteína	67
3.8.5.	Cuantificación de la actividad Topoisomerasa	67
3.9.	Ensayo de inhibición de la relajación	70
3.10.	Detección de complejos Topoisomerasa-ADN en cultivos de promastigotes de <i>Leishmania</i>	71
3.10.1.	Cálculo del ADN total marcado	71
3.10.2.	Detección de complejos de cleavage	72
3.11.	Extracción de macrófagos peritoneales	74
3.12.	Cálculo de la IC ₅₀	74
3.12.1.	Citotoxicidad en cultivos de promastigotes de cepas salvajes de <i>Leishmania</i>	74
3.12.2.	Citotoxicidad en cultivos de promastigotes de cepas transformadas de <i>Leishmania</i>	75
3.12.3.	Citotoxicidad en cultivos de macrófagos RAW 264,7 y peritoneales murinos	75
3.13.	Infección <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales de ratón con amastigotes axénicos de <i>L. pifanoi</i>	77
3.14.	Infecciones experimentales	78
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
4.1.	Efecto de los inhibidores de TopIB frente a promastigotes de <i>Leishmania</i>	84
4.1.1.	Efecto de los inhibidores de TopIB frente a promastigotes de <i>L. major</i>	84
4.1.2.	Efecto de los inhibidores de TopIB frente a promastigotes de <i>L. infantum</i>	87
4.1.3.	Efecto de los inhibidores de Top IB frente a promastigotes de <i>L. donovani</i>	89
4.2.	Efecto de los inhibidores de TopIB sobre células de mamífero	93
4.2.1.	Efecto de los inhibidores de TopIB sobre cultivos de monocitos RAW 264,7	93
4.2.2.	Efecto de los inhibidores de TopIB sobre cultivos de macrófagos peritoneales de ratón	98
4.3.	Efecto de los inhibidores TopIB sobre la actividad de la LdTopIB <i>in vitro</i>	104
4.4.	Determinación de complejos enzima-ADN formados <i>in vivo</i>	114
4.5.	Evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores de	119

	TopIB en promastigotes de <i>Leishmania</i> transfectados	
4.6.	Efecto de los inhibidores de TopIB en infecciones de macrófagos peritoneales con amastigotes axénicos	127
4.7.	Efecto de los inhibidores de TopIB en infecciones experimentales <i>in vivo</i>	133
5.	CONCLUSIONES	137
6.	BIBLIOGRAFÍA	139

RESUMEN

RESUMEN

Los protozoos parásitos del género *Leishmania*, son responsables de las enfermedades conocidas con el nombre genérico de leishmaniosis. La quimioterapia disponible frente a estas enfermedades tiene eficacia limitada, es cara, presenta múltiples efectos secundarios, requiere tratamientos prolongados y con frecuencia favorece la aparición de cepas resistentes.

Las ADN topoisomerasas (Top) son enzimas encargadas de resolver problemas topológicos originados en los procesos de replicación, transcripción y recombinación del ADN. Se han descrito tres tipos de Top en función de sus propiedades catalíticas, gasto energético y estructura proteica: Top tipo I (TopI), Top tipo II (Top II) y Top tipo III (Top III). Las TopI se subdividen además en TopIA y TopIB.

La TopIB de *Leishmania* es una proteína heterodimérica, particularidad que sólo comparte con las enzimas de tripanosomas y que la convierte en una potencial diana terapéutica. En la presente memoria evaluamos el potencial terapéutico de una serie de inhibidores de la TopIB en tres especies de *Leishmania*: *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

Los compuestos seleccionados para el estudio fueron: camptotecina (CPT), topotecán (TPT), SN38, irinotecán (profármaco del SN38) y dos indenoisoquinolinas denominadas: AM1355 y MNR 2-50.

Para ello se realizaron ensayos dosis-respuesta, utilizando estos compuestos en promastigotes de las tres especies de *Leishmania*, así como en dos tipos de células de mamífero: RAW 264,7 y macrófagos peritoneales murinos. En todos los casos utilizamos como control dos fármacos leishmanicidas empleados regularmente en clínica: miltefosina y paromomicina.

Calculando las IC_{50} de cada compuesto en todas las células mencionadas y los índices terapéuticos (IT) correspondientes, pudimos observar que CPT, TPT y SN38 se comportaron como buenos leishmanicidas aunque con unos ITs muy bajos, no así en el caso de AM1355 y MNR 2-50 que mostraron buenos IT. La actuación como potenciales fármacos quedaría pues restringida a las dos indenoisoquinolinas.

Por otro lado, caracterizamos la enzima TopIB de *L. donovani* (LdTopIB) y estudiamos su comportamiento frente a los inhibidores seleccionados. Para ello, tras su clonaje en un vector bistrónico, el gen que codifica para LdTopIB se expresó en una cepa de *S. cerevisiae* auxótorofa en su propia TopIB y se purificó mediante cromatografía en columna.

Los ensayos de inhibición realizados demuestran que CPT, TPT, SN38, AM1355 y MNR 2-50 inhiben la LdTopIB a concentraciones inferiores a las que se produce la inhibición de la enzima humana sin embargo, el tiempo de estabilización de los complejos enzima-ADN formados en el proceso es muy pequeño.

La formación de complejos enzima-ADN estabilizados por los inhibidores también se estudió complementariamente *in vivo* y de todos ellos la CPT fue el compuesto con el que se observó el mayor porcentaje de formación de estos complejos.

Nuestro laboratorio ha generado dos cepas transgénicas, una de *L. infantum* portadora de forma estable del gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry y otra de *L. major* portadora del gen que codifica para la proteína también fluorescente citrina. Como alternativa a los métodos clásicos de evaluación de la citotoxicidad (azul alamar, rojo neutro o MTT), estas cepas se han utilizado para evaluar la citotoxicidad de los distintos inhibidores empleados en el presente trabajo.

Debido a los buenos IT obtenidos con las indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50, su potencial terapéutico se probó en infecciones experimentales *in vivo*. Los resultados mostraron una reducción de la carga parasitaria en hígado y bazo de los animales tratados con MNR 2-50 y una reducción de la carga parasitaria en el bazo de los tratados con AM1355.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEISHMANIOSIS Y ENFERMEDADES OLVIDADAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 1000 millones de personas están afectadas por una o más enfermedades tropicales desatendidas (ETD). El concepto *desatendidas* se refiere a que afectan casi exclusivamente a las poblaciones más pobres y marginadas del planeta y que han sido prácticamente erradicadas, y por lo tanto olvidadas, en las regiones más ricas para las que no constituyen una amenaza importante. Estas enfermedades conocidas también como *enfermedades olvidadas*, discapacitan y matan a millones de personas, por lo que representan una urgencia sanitaria importante que sigue sin ser atendida, como demuestra la escasez de fondos destinados al desarrollo de nuevos fármacos. Aunque las enfermedades tropicales y la tuberculosis sean responsables del 11,4% del cómputo global de enfermedades padecidas por la población mundial, sólo 21 (1,3%) de los 1556 nuevos medicamentos registrados entre 1975 y 2004, fueron desarrollados específicamente para su tratamiento (Chirac y Torreale, 2006). Un estudio reciente sobre la financiación mundial en innovación para las ETDs, reveló que menos del 5% se invirtió en el grupo de enfermedades *extremadamente olvidadas* como la enfermedad del sueño, la leishmaniosis visceral y la enfermedad de Chagas, a pesar de que más de 500 millones de personas las padecen.

Se conoce como leishmaniosis al conjunto de manifestaciones clínicas producidas por diversas especies de protozoos parásitos incluidos dentro del género *Leishmania*. Se considera que al menos 20 especies de leishmanias son responsables de las diferentes formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: cutánea (localizada o difusa), mucocutánea o visceral, cada una con sus distintas peculiaridades. La OMS estima una prevalencia mundial de 12 millones de enfermos y cree que la incidencia anual oscila entre 1,5-2 millones de nuevos casos de leishmaniosis cutánea y 500.000 de leishmaniosis visceral. Sin embargo, estos datos aunque oficiales, subestiman la realidad de esta ETD, ya que numerosos casos no son diagnosticados, el número de personas infectadas pero asintomáticas es mayor que el de casos manifiestos

para la leishmaniosis visceral y por último, es de declaración obligatoria en apenas 40 de los 88 países en los que es endémica.

1.1.1 Breve historia de la Leishmaniosis

A pesar de que las primeras referencias sobre la leishmaniosis cutánea se remontan a la antigüedad, la primera y más importante descripción de la enfermedad, fue la realizada por Alexander Rusell en 1756, donde en su libro "Historia natural de Aleppo" se refiere a los síntomas que presentaba un paciente de origen turco, que sufría de "**botón de Aleppo**": *"Una vez que ha cicatrizado, el absceso deja una escara de aspecto desagradable, que se mantiene de por vida y que presenta durante muchos meses un color lívido. Cuando esta escara no se irrita apenas provoca dolores. [...] Afecta a los nativos cuando son niños y generalmente aparece en la cara, aunque también puede aparecer en las extremidades. [...] En extranjeros puede aparecer varios meses después de su llegada; muy poca gente escapa de sufrirla, pero raramente se padece más de una vez."* La leishmaniosis visceral o kala-azar (fiebre negra), se conoce desde principios del siglo XX. En 1901, Sir William Leishman, identifica un nuevo parásito en el bazo de un soldado muerto en África por la llamada fiebre Dum-dum. Dos años más tarde, el capitán Donovan observó el mismo parásito en un aspirado esplénico mediante tinción con Giemsa, denominándolo *Leishmania donovani*. Poco tiempo después, en 1905, Presat propone por primera vez que las moscas del género *Phlebotomus* son las responsables de la propagación. Al igual que con el agente causal, se asumió la misma identidad para el vector de transmisión, hasta que en 1922, se descubrió el papel del género *Lutzomyia* como agente transmisor de la infección en los países del Nuevo Mundo. No es hasta 1941 cuando se describe en su totalidad el modelo actual de infección por Adler y Ber.

1.1.2 El género *Leishmania*

El género *Leishmania*, se clasifica dentro de la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplástida, debido a una acumulación compacta de ADN (ADN de kinetoplasto; kADN) en el interior de la mitocondria del parásito.

Las leishmanias son protozoos parásitos heteroxenos y por ello necesitan la presencia de dos hospedadores para completar su ciclo biológico: un vector invertebrado representado por dípteros del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el continente americano y un hospedador definitivo vertebrado, ya sea el perro, algún mamífero salvaje o el hombre. Además son organismos pleomórficos, por lo que presentan dos formas morfológicas durante su ciclo vital: el **promastigote**, fusiforme, extracelular y móvil gracias a un flagelo externo, que sobrevive en el intestino del insecto vector y el **amastigote**, esférico, intracelular e inmóvil, que se desarrolla en el interior de las células del sistema fagocítico del hospedador vertebrado.

Cabe destacar que *Leishmania* se agrupa en dos subgéneros dependiendo del lugar en el que se desarrolla el agente dentro del flebotomo. En el subgénero *Leishmania* se incluyen las especies del parásito que se desarrollan en el intestino medio del vector, como las especies del Viejo Mundo y el complejo *mexicana* del Nuevo Mundo, mientras que en el subgénero *Viannia* se agrupan las especies que se desarrollan en el intestino posterior, a la altura del triángulo pilórico, e incluye al resto de las especies del Nuevo Mundo (Lainson y col., 1987).

1.1.2.1. El ciclo biológico de *Leishmania* en el vector

Los flebotominos son una subfamilia de dípteros nematóceros de la familia Psychodidae, conocidos vulgarmente como beatillas, jejenes o moscas de las arenas. Sólo las hembras son hematófagas, ya que la digestión de la sangre ingerida facilita la maduración de los oocitos y la oviposición (Klowden & Lea 1978). Miden aproximadamente 2,5 mm, de color gris amarillento, cuerpo peludo, con antenas largas y delgadas y una probóscide o trompa más larga que la cabeza. Su ciclo de vida consta de cuatro estadios, huevo, larva, pupa y adulto, que puede completarse en unos dos meses si las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas (Fig. 1.1.A). El periodo de vida en la naturaleza varía entre 40 y 50 días. Son insectos nocturnos, por lo que su momento de mayor actividad se registra al atardecer. No son activos a temperaturas inferiores a 16 °C y en climas templados su actividad se

desarrolla desde principios de verano a finales de otoño. Realizan vuelos cortos si no son favorecidos por corrientes de aire.

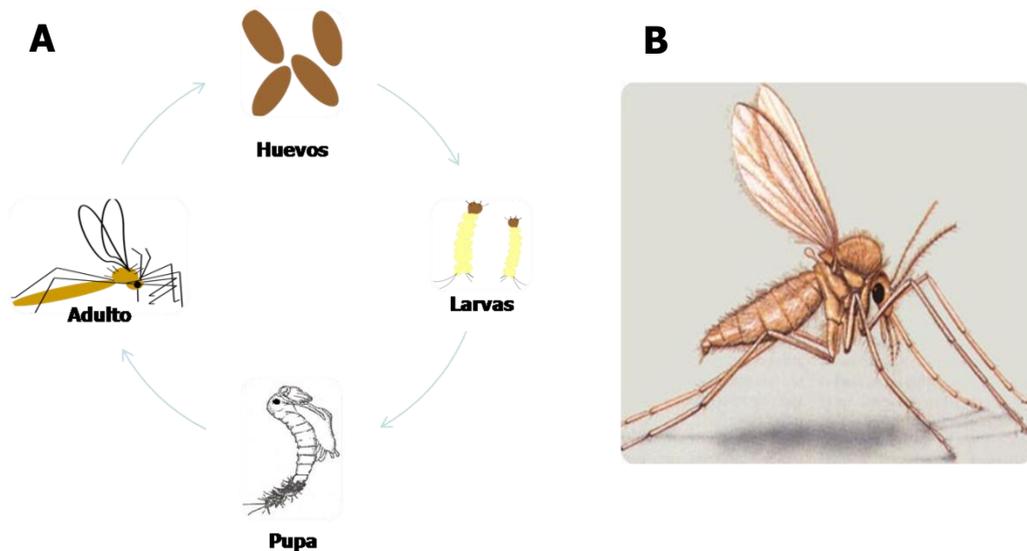


Fig. 1.1 A) Ciclo biológico del vector flebotomino de *Leishmania* spp.; B) Hembra de *Phlebotomus papatasi*, vector responsable de la transmisión de leishmaniosis en España.

De las más de 700 especies de flebotomos descritas, únicamente 70 son vectores probados o sospechosos de transmitir la leishmaniosis. En España, las tres especies predominantes son *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus papatasi* (Fig. 1.1.B), pero se han identificado hasta doce, distribuidas principalmente por la cuenca mediterránea, aunque presentes también en el resto de la península.

Cuando crecen en medios de cultivo o en el insecto vector, los parásitos de *Leishmania* presentan dos fases de crecimiento, la fase logarítmica o replicativa en la que el número de parásitos aumenta y la fase estacionaria en la que ese número parece que permanece constante (Sacks, 1989). Sacks y Perkins, empleando macrófagos peritoneales de ratón demostraron la mayor infectividad de los promastigotes en fase estacionaria, frente a los promastigotes en fase replicativa (Sacks y Perkins, 1984). Posteriormente, para determinar si la infectividad era adquirida durante el crecimiento del

parásito en el vector, se obtuvieron promastigotes del intestino de *Lutzomyia anthophora* durante los primeros días de contagio y se compararon en una infección experimental con promastigotes extraídos del mismo vector, 7 ó 10 días más tarde, confirmando estos últimos una superior infectividad (Sacks y Perkins, 1985).

Durante el desarrollo del parásito en el vector, se han descrito varias formas morfológicas (Bandyopadhyay y col., 1991) asociadas a cambios genéticos y bioquímicos (Chares y Matlashewski, 1994; Langford y col., 1994) que conllevan la transformación de promastigotes no infectivos o procíclicos en promastigotes infectivos o metacíclicos, lo que se conoce con el término de *metaciclogénesis*.

El ciclo comienza con la picadura del flebotomo a un vertebrado infectado con amastigotes de *Leishmania*. El primer paso en el desarrollo del parásito en el vector comprende la transformación de amastigote a promastigote 18 o 24 h después de la ingesta de sangre. Dentro del insecto los promastigotes pasan por diferentes estadios morfológicamente distinguibles. Se han descrito al menos cinco formas flageladas dentro del vector: procíclicos, nectomónadas, haptomónadas, paramastigotes y promastigotes metacíclicos (Fig. 1.2), estas últimas más pequeñas, delgadas, con un flagelo más largo, dotadas de gran movilidad que migran hacia la parte anterior del tracto digestivo del insecto, ubicándose en la probóscide y por tanto listas para ser inoculadas al hospedador en una nueva ingestión de sangre (Sacks y Perkins, 1984).

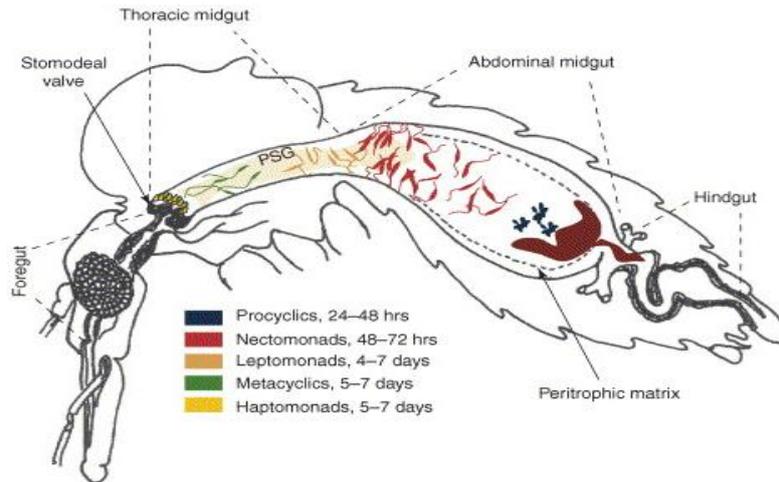


Fig. 1.2 Metaciclógenésis de *Leishmania* spp dentro del vector flebotomino.

La metaciclógenésis es un proceso de pre-adaptación del parásito para su transmisión al hospedador y le confiere resistencia a la lisis por complemento (Handman, 1999) ya que, además de los cambios morfológicos, se sintetizan moléculas que se expresan exclusivamente en el promastigote infeccioso (Moody, 1993; Coulson y Smith, 1990), de las cuales el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína gp63 se localizan abundantemente en la superficie de los promastigotes infecciosos.

LPG es un glicoconjugado mayoritario de la superficie de *Leishmania* constituido por cuatro dominios: un lípido de anclaje, un núcleo hexacárido, una unidad repetida fosforilada y un dominio terminal, constituido en la mayoría de las especies por un disacárido o un trisacárido (Descoteaux y Turco, 1999). Durante la metaciclógenésis, los principales cambios que tienen lugar en la molécula de LPG son un incremento de tamaño y la modificación en la composición de sus azúcares (Guha-Niyogi y col., 2001) (Fig. 1.3). Se conoce muy poco sobre la estructura y composición de este glicoconjugado en las especies del subgénero *Viannia*, aunque parece que su abundancia es menor, como mostraron ensayos con una cepa de *L. braziliensis*, que expresaba 10 veces menos LPG que otra de *L. major* (Muskus y col., 1997).

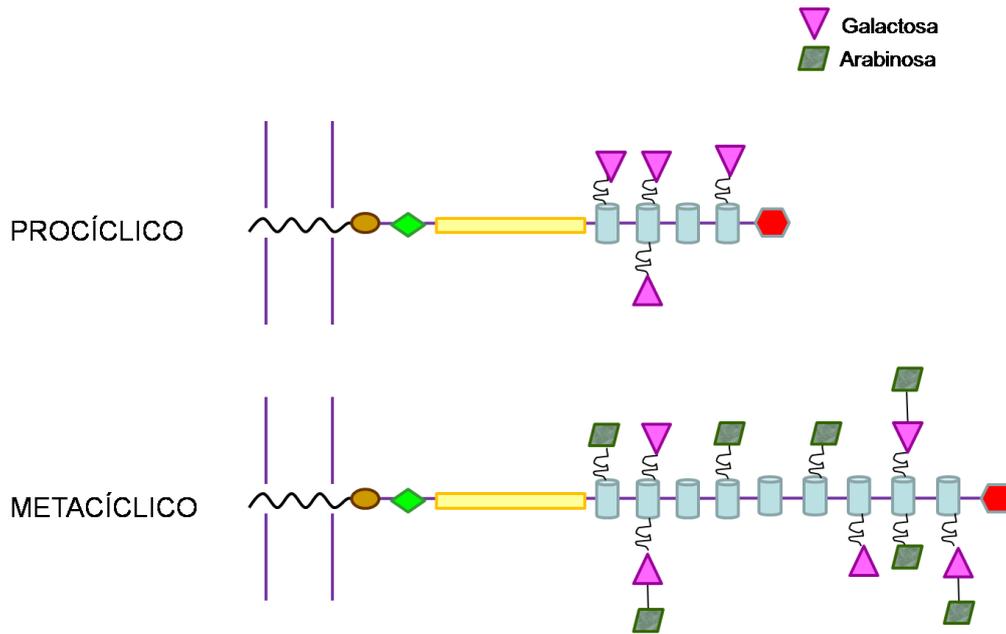


Fig. 1.3 Estructura del LPG en las distintas formas del ciclo de *Leishmania* dentro del vector.

Entre los papeles atribuidos al LPG se encuentra el de protección del parásito contra las enzimas proteolíticas del vector y la adhesión de los promastigotes al epitelio del intestino medio del insecto. Esta última propiedad parece exclusiva de los promastigotes procíclicos, que posteriormente maduran hacia promastigotes metacíclicos infectivos y gracias a modificaciones en los azúcares terminales del LPG, se desprenden del epitelio y migran hacia la faringe y la cavidad bucal del díptero. La participación del LPG en los mecanismos de evasión de la ruta del complemento se discutirá más adelante.

Por otra parte gp63 es una Zn metaloproteasa (leishmanolisina) de 63 kDa que forma parte de la cubierta del parásito, proporcionando resistencia a la lisis mediada por complemento, facilitando el reconocimiento de la zona de entrada al macrófago y la supervivencia del promastigote en el interior del fagolisosoma (Yao, 2010).

Se han descrito otras moléculas que se sobreexpresan en los promastigotes metacíclicos de *L. major*, como una ARN polimerasa y una ATPasa putativas y una proteína relacionada con la proteína de choque térmico 70 (hsp70), pero

poco se conoce de la expresión de estas moléculas en otras especies y de su relación con la metaciclologénesis.

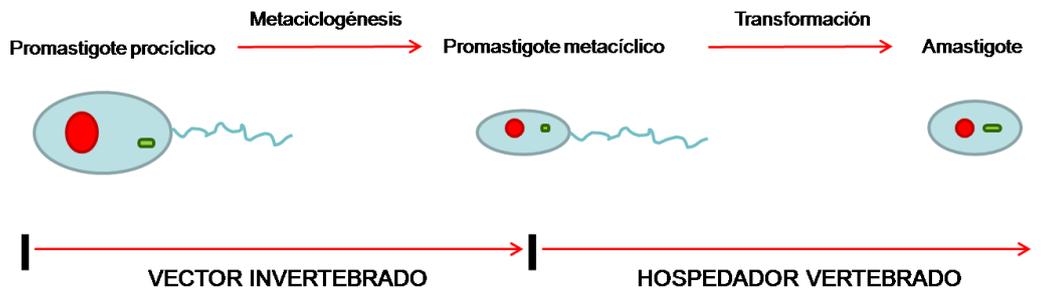


Fig. 1.4 Formas morfológicas de *Leishmania* en el vector y en el hospedador definitivo.

1.1.2.2. El ciclo biológico de *Leishmania* en el hospedador definitivo

El ciclo biológico continúa cuando un flebotomo infectado inocula los promastigotes metacíclicos de su probóscide a un hospedador vertebrado. La entrada de los promastigotes infestantes activa la cascada del complemento y permite que la proteína C3 se deposite en la superficie del parásito y se una a los receptores del complemento presentes en el macrófago. La unión del promastigote al macrófago puede realizarse también directamente a través del LPG, que además forma una cubierta alrededor del parásito capaz de captar los radicales libres de oxígeno (ROS), previniendo la unión del fagosoma con los lisosomas. También destaca la actividad proteolítica de la gp63, que degrada las enzimas lisosomales destinadas a destruir los amastigotes (Lodge y Descoteaux, 2008).

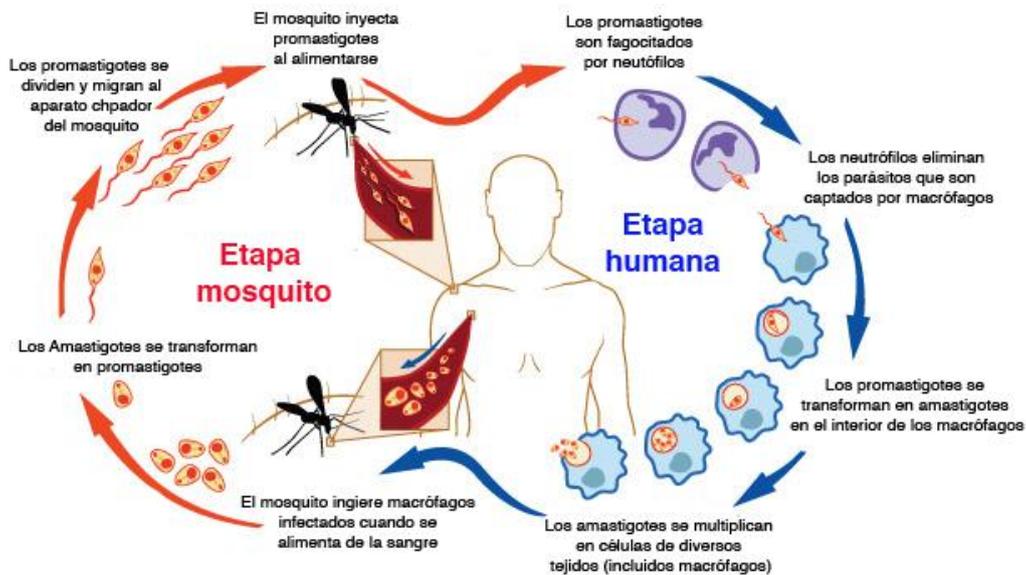


Fig. 1.5 Ciclo biológico de *Leishmania* en el hospedador definitivo.

Una vez englobado en la vacuola parasitófora, el parásito se transforma en amastigote, reabsorbe su flagelo y empieza a dividirse activamente por fisión binaria, hasta que la célula del hospedador mamífero estalla liberando decenas de parásitos libres que invaden otros macrófagos circundantes, se diseminan directamente a través de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas o bien son arrastrados por el torrente sanguíneo o linfático invadiendo territorios orgánicos ricos en macrófagos (médula ósea, bazo o hígado). El ciclo se cierra cuando el flebotomino vuelve a picar a un nuevo hospedador infectado, recogiendo los parásitos en forma de amastigotes (Antoine y col., 1998) (Fig. 1.5).

Existen muchos factores que van a determinar el desarrollo de la infección y las diferentes formas clínicas de la enfermedad, como el genotipo del parásito, la respuesta inmune, la zona de inoculación, el número de picaduras y algunos factores genéticos del hospedador.

1.1.3 Leishmaniosis

Como se ha citado anteriormente, existen tres manifestaciones clínicas de leishmaniosis dependiendo de la especie del parásito, el lugar en el que se multipliquen los macrófagos infectados y la respuesta inmunitaria del

hospedador. Las especies de *Leishmania* que producen manifestaciones cutáneas y mucocutáneas (dermotrópicas) son sensibles a temperaturas mayores a 35 °C y se multiplican únicamente en áreas expuestas de la piel. Las especies que ocasionan las manifestaciones viscerales de la enfermedad (viscerotrópicas) requieren 37 °C para su diferenciación a amastigotes, por eso migran a la médula ósea, al bazo y al hígado (Alvar, 2001).

1.1.3.1 Leishmaniosis cutánea

Conocida también como *Botón de Oriente*, aparece cuando los macrófagos infectados se localizan en la zona de la picadura y como consecuencia a una respuesta 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. En promedio se puede hablar de un periodo de incubación de 2 semanas a varios meses. Después, aparece una pequeña lesión inicial de aspecto típicamente enrojecido y pruriginoso, seguida de una pápula con diminutas vesículas. En los primeros meses de evolución, la úlcera tiende a extenderse hasta un tamaño máximo que dependerá de la respuesta inmune del hospedador y de la especie de *Leishmania* infectante. En muchos casos, esta lesión inicial puede curar espontáneamente dejando como secuela una cicatriz, aunque también puede no ser ulcerativa y persistir entre 1 y 3 años. No obstante, estas lesiones pueden infectarse secundariamente con bacterias patógenas provocando costras y material necrótico, haciendo que las úlceras sean muy dolorosas y que en el caso de no recibir tratamiento se conviertan en crónicas. Estas dolencias prevalecen en países del Viejo Mundo: Norte de África, Asia Menor y Sudeste de Europa (Fig. 1.6).

Especies causales: *L. major*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. aethiopica*.

Vectores implicados: *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi* en España

En ocasiones no tiene lugar el aislamiento de la lesión primaria por la barrera linfocítica y el parásito se extiende por diseminación hematológica directa originando **leishmaniosis cutánea difusa**, una forma anérgica de la enfermedad en la que en etapas tardías las lesiones pueden extenderse

comprometiendo grandes extensiones de superficie corporal. No tiende a la curación espontánea y los enfermos no responden a ninguna forma de quimioterapia (Ouellette y col, 2004). Esta variante de la forma clínica cutánea se extiende principalmente por países del Nuevo Mundo, como Brasil, Panamá, Las Guayanas, Venezuela y Perú.

Especies causales: *L. mexicana*, *L. amazonensis*.

Vectores implicados: *Lutzomyia olmeca*.

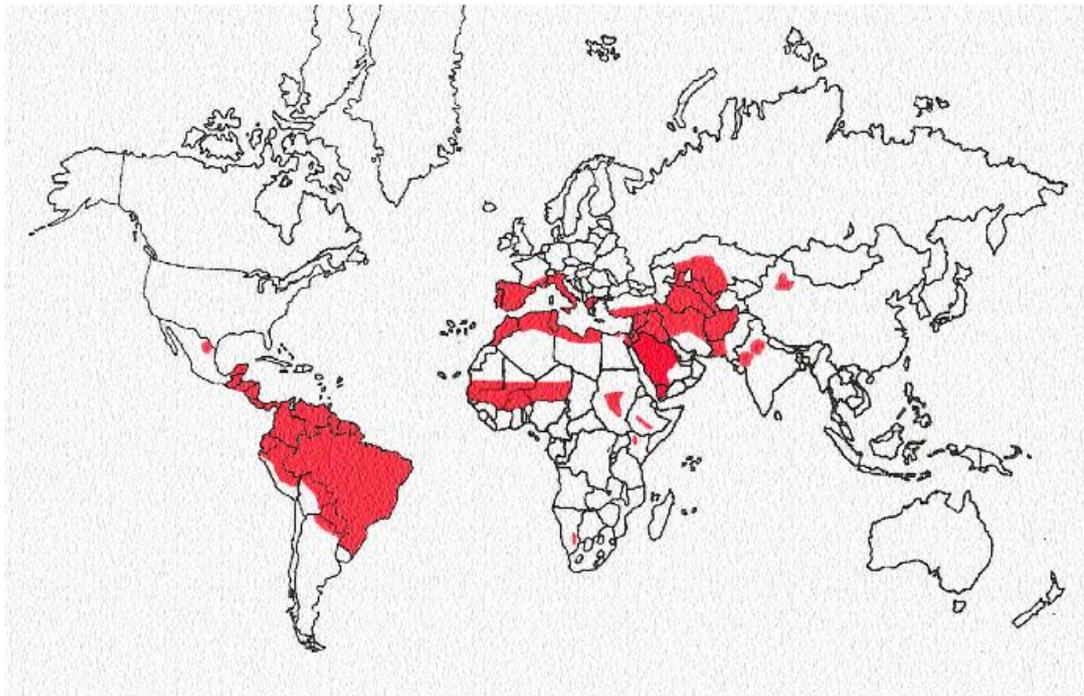


Fig. 1.6 Distribución geográfica mundial de la leishmaniosis cutánea según los datos de la OMS en 2005.

1.1.3.2 Leishmaniosis mucocutánea (espundia)

Se origina como consecuencia de la metástasis de los parásitos, a veces a partir de lesiones primitivas, hacia las mucosas. Las manifestaciones clínicas pueden aparecer años después de haber cicatrizado la forma cutánea, pero también puede presentarse cuando todavía existen manifestaciones en la piel. La diseminación de los parásitos puede originarse vía hematogena, linfática o cutánea. Suele ser altamente deformativa, ya que produce la ulceración y

erosión del tejido blando y el cartílago de las zonas afectadas, principalmente del tabique nasal originando lo que se conoce como "nariz de tapir". Además pueden verse comprometidos el paladar blando y duro, laringe, faringe, labio superior, incluso alcanzar la parte superior de bronquios y tráquea. Las complicaciones derivadas como la malnutrición y las neumonías pueden llevar al paciente a la muerte.

- Especies causales: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*.
- Vectores implicados: *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis*.

1.1.3.3 Leishmaniosis visceral o kala-azar (fiebre negra)

Producida por la visceralización del parásito como consecuencia del fallo de la respuesta inmune de tipo celular. Suele afectar a los niños, personas en estado de malnutrición o con algún tipo de inmunosupresión. Los principales órganos afectados son el bazo, el hígado, la médula ósea y el tejido linfático, aunque puede afectar a otras áreas como los pulmones o el epitelio intestinal. Se producen hiperplasia e hipertrofia de los órganos afectados, congestión de los vasos sanguíneos y necrosis de los tejidos. El periodo de incubación varía entre 4 y 10 meses. La progresión a leishmaniosis visceral (LV) típica ocurre entre los 3 y 8 meses después de la infección, aunque se han comunicado casos dentro de las dos primeras semanas, la mayoría de ellos permanecen asintomáticos o están asociados a síntomas leves, de ahí las dificultades relacionadas con su diagnóstico. Los síntomas típicos de la LV son: fiebre alta, anemia, esplenomegalia, pérdida de peso, hemorragias debidas a la disminución en el número de plaquetas. Inmunológicamente se produce una importante respuesta humoral con altas tasas de anticuerpos específicos, con producción de IgM e IgG, por activación de los linfocitos B. Se pueden ocasionar daños en el riñón por deposición de inmunocomplejos circulantes, debidos al aumento de anticuerpos. La disminución de la respuesta inmune celular, permite la multiplicación incontrolada de los parásitos. Si no es tratada alcanza una mortalidad del 90% (Fig. 1.7).

1.1.3.4 Leishmaniosis y SIDA

La LV es la forma clínica más frecuentemente asociada al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Treinta y tres países han notificado hasta la fecha casos de coinfección. En el sureste europeo se calcula que entre el 25 y el 70% de los casos de LV, pertenecen a enfermos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), además cabe destacar, que entre enero de 1996 y junio de 1998, los casos comunicados en Francia, Italia, Portugal y España representan casi el 50% del total. España está a la cabeza en la notificación de casos de coinfección por Leishmania/VIH, con el 58% de los casos declarados a la OMS. En un principio, la coinfección afectaba principalmente a los niños, sin embargo, en las últimas décadas se ha observado un aumento en la edad de los pacientes, fundamentalmente adictos a drogas de administración intravenosa. La cuenca mediterránea ha sido el área en el que se ha observado un mayor número de casos de coinfección hasta la fecha (Alvar y col., 2008) (Fig. 1.8).

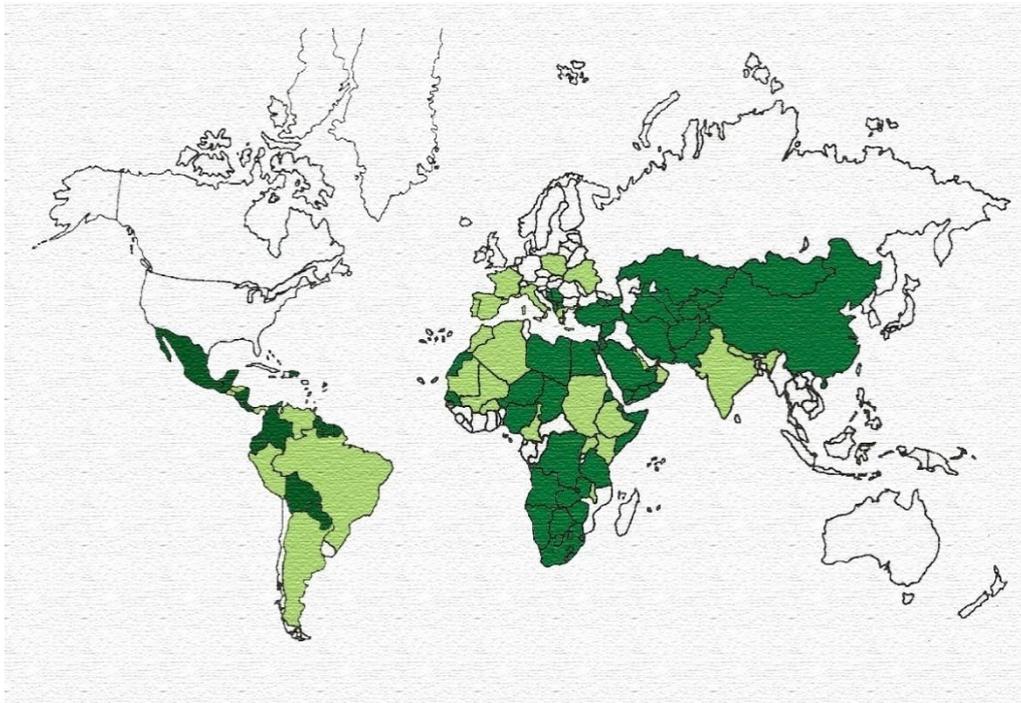


Fig. 1.8 Distribución geográfica mundial de la coinfección VIH-leishmaniosis visceral.

A pesar de que la mayoría de los casos eran producidos por *L. infantum*, se ha descrito visceralización en cepas típicamente dermatópicas en individuos con alto grado de inmunodeficiencia. El conjunto de trastornos inmunes que suceden al paciente con VIH, como la producción alterada de citoquinas (predominando la respuesta de tipo Th2) o un efecto inhibitorio sobre la producción de interferón gamma (IF γ), pueden facilitar la reactivación de infecciones latentes y la parasitación primaria (Kubar y col., 1998; Morales y col., 2002). No sólo la infección por VIH facilita la patogenicidad de *Leishmania*, sino que también sucede el efecto recíproco, como se ha demostrado *in vitro*, observándose un aumento de la virulencia de VIH inducida por la coinfección con *L. donovani* dependiente de LPG, al observarse que *L. donovani* induce la expresión del VIH en células infectadas latentemente (efecto mediado por el LPG de la pared del parásito) (Bernier y col., 1998). De este modo, virus y parásito se potencian mutuamente, formando un círculo vicioso patogénico. El cuadro clínico presentado por la mayoría de los pacientes coinfectados es indistinguible del observado en pacientes mono infectados por *Leishmania* (Pineda Vergara y col., 2003).

1.1.4. Leishmaniosis en España

La vigilancia epidemiológica de la leishmaniosis en España comenzó en 1982, año en el que la enfermedad pasa a formar parte de la lista de enfermedades de declaración obligatoria. A partir de 1995 y con el cambio de legislación, pasó a ser enfermedad de declaración obligatoria sólo en 10 comunidades autónomas. La mayor parte de casos en humanos se dan en la Comunidad Valenciana, seguida de Madrid y Cataluña, de los cuales el 90% corresponden a casos de LV, asociándose el 43% a adultos en estado de inmunosupresión. En España *L. infantum* es el agente responsable de las leishmaniosis tanto cutánea como visceral. Además, los estudios de epidemiología molecular han puesto de manifiesto la existencia de un elevado polimorfismo en las cepas de *L. infantum* en nuestro país, registrándose 22 zimodemas de los 33 descritos en todo el mundo (de los que 12 han sido citados únicamente en España). Aunque la leishmaniosis en España se considera una zoonosis, siendo el perro el reservorio del parásito, sólo 6 de los 22 zimodemas identificados se han

aislado del reservorio canino, lo que podría indicar la existencia de zimodemas con un ciclo exclusivamente antroponótico.

1.1.4.1. El perro como reservorio

Como se ha adelantado anteriormente, en nuestro país el perro es el principal reservorio con un 5 al 10% de la población canina infectada, aunque existen algunos focos endémicos donde la prevalencia alcanza el 35% (Miró y col., 2008). Las regiones españolas más afectadas hasta el momento son Andalucía, Palma de Mallorca, Comunidad Valenciana y Cataluña, sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que no sólo las regiones con clima típico mediterráneo son proclives a la enfermedad. Las zonas del norte de España están registrando cada vez más casos de leishmaniosis canina. La presencia demostrada en nuestro país de perros enfermos o portadores, la mayoría de las veces sin signos clínicos, y de los vectores que la transmiten es un importante elemento de riesgo, sobre todo para la población susceptible e inmunocomprometida.

1.1.5 Tratamiento de las leishmaniosis

Ya desde la antigüedad en Egipto se utilizaba el tártaro emético en inyección intravenosa para combatir la enfermedad del sueño. Vianna en 1912, utilizó por primera vez los antimoniales en pacientes con leishmaniosis mucocutánea (LMC) mientras que Edmundo Escobel cinco años más tarde, empleó el óxido de antimonio para el tratamiento de la forma visceral. En 1942, Xavier Vilanova introduce el tratamiento intralesional con antimonio pentavalente (Vilanova, 1943).

El establecimiento de una quimioterapia idónea contra la leishmaniosis ha resultado difícil, ya que el éxito de la misma varía con la especie del parásito, la severidad de la enfermedad, el lugar de infección y el estado nutricional e inmunológico del paciente. Las indicaciones terapéuticas son diferentes de un tipo de leishmaniosis a otra, existiendo además diferentes grados de sensibilidad al tratamiento con antimoniales. Por ejemplo, la forma visceral es

sensible al tratamiento antimonial, sin embargo, la mucocutánea presenta gran resistencia al mismo.

En los últimos años se empieza a considerar la leishmaniosis como una enfermedad emergente o re-emergente debido a diferentes factores que están actualmente bajo discusión, ya estén relacionados con el comportamiento humano, como las migraciones, la deforestación o los conflictos bélicos, o con cambios medioambientales (a menudo consecuencia de la actividad humana), como el cambio climático y la consecuente subida de la temperatura global. Todos estos factores pueden favorecer la presencia de enfermedades parasitarias donde hasta ahora estaban ausentes. En la actualidad existe un conjunto de fármacos disponibles relativamente eficaces para el tratamiento de la leishmaniosis. Sin embargo no están exentos de inconvenientes; resistencias al medicamento, toxicidad y aparición de recidivas. Un ejemplo es el de los enfermos de LC difusa que no responden a ninguna forma de quimioterapia, principalmente debido a la elevada cantidad de estos pacientes que expresan resistencia a los medicamentos (Ouellette y col. 2004). En la India existen zonas (Bihar) donde entre el 30 y el 65% de los casos de LV son resistentes a glucantime, con la consecuente aparición de cepas de *L. donovani* resistentes a los antimoniales (Croft y col. 2006).

La toxicidad asociada a estos fármacos leishmanicidas y la frecuente aparición de resistencias, crea la necesidad de buscar nuevos fármacos contra estas zoonosis. Sumados a estos inconvenientes hay que señalar que la mayoría de estos fármacos no son fáciles de manejar, requieren tratamientos largos y costosos y en muchas ocasiones no están libres de efectos secundarios indeseables. Todos los inconvenientes asociados a los tratamientos actuales, la toxicidad hepática y renal exhibida por la mayoría de los compuestos, su elevado coste y sus pautas de administración, han incentivado la búsqueda de medicamentos alternativos, que puedan ser administrados oralmente, provoquen menos efectos secundarios y sean menos tóxicos y más económicos (Murray, 2001; Melby, 2002).

La reciente disponibilidad de la secuencia genómica de varias especies de *Leishmania*, ha favorecido la validación e identificación de nuevas dianas terapéuticas. Actualmente se están ensayando fármacos que inhiben la

síntesis del ergosterol (Roberts y col. 2003), de diversas cisteín-proteasas (Ponte-Sucre y col, 2006), del metabolismo y síntesis de la tripanotoinina y de la incorporación de purinas y síntesis de fosfolípidos (Heby y col. 2007). El lento desarrollo de estos fármacos, se debe principalmente a la falta de estímulos económicos que representan para la industria farmacéutica (Croft y col., 2005).

1.1.5.1. Inmunoterapia

Los linfocitos Th1 segregan IFN γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) y están asociados a funciones de la inmunidad celular, como la activación de macrófagos con IFN γ y la hipersensibilidad retardada. Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 y se relacionan con la inmunidad humoral, en especial las respuestas mediadas por inmunoglobulina E (IgE). Una estrategia para el tratamiento de la leishmaniosis consiste en la potenciación de los mecanismos inmunes protectores del hospedador mediante activadores del sistema inmune que potencian la respuesta Th1 frente a la Th2, ya que durante la infección producida por *Leishmania* se produce un descenso en la producción de estas linfocinas en las células Th1. *In vitro* y conjuntamente con fármacos derivados del Sb^v, la administración de IFN- γ ha demostrado mejorar la capacidad de los macrófagos para disminuir la carga parasitaria y se ha observado un aumento en los niveles de IL-2 (Li y col., 1997). Como consecuencia, la administración conjunta permite además disminuir los tiempos de tratamiento (Sundar y col., 1995). Los inconvenientes del uso del IFN γ son principalmente su elevado coste y los efectos adversos que produce su administración.

1.1.5.2. Vacunas

La característica principal que debe cumplir una vacuna consiste en mimetizar los efectos de una exposición al parásito de manera que consiga en el posible hospedador, una inmunidad que lo proteja frente a una infección natural posterior. En el caso de las leishmaniosis, se requiere una vacuna que estimule principalmente la respuesta inmunitaria de tipo Th1, que es la que se

presenta de manera natural en el desarrollo de la infección y que genere memoria a largo plazo. Este problema no es exclusivo de *Leishmania* por lo que la inmunización contra este tipo de enfermedades continúa siendo el gran desafío en la lucha frente a multitud de patógenos. Las razones que explican estas dificultades son diversas:

- Las infecciones parasitarias suelen derivar en crónicas debido a que los parásitos provocan a menudo respuestas inmunitarias ineficaces en el hospedador, previniendo su eliminación y prolongando la infección en el tiempo.
- Los parásitos desarrollan con frecuencia mecanismos de evasión de la respuesta inmune.
- Los parásitos tienen ciclos biológicos complejos con diferentes fases que complican el desarrollo de la vacuna.

Hasta la fecha, la única estrategia de inmunización utilizada con cierto éxito en la protección contra estas enfermedades se ha restringido a la LC 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".

Vacunas de primera generación

Incluye la *leishmanización* y la vacunación con parásitos muertos. La leishmanización 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. Consiste en la inoculación de parásitos vivos de una cepa cutánea (Nadim y col., 1983) con el fin de adquirir inmunidad clínica a cambio de sufrir una lesión controlada en una zona anatómica seleccionada. Desafortunadamente, el uso de cepas virulentas 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 (Khamesipour y col., 2006), por lo que la OMS aconsejó el abandono de esta práctica. Las vacunas con parásitos muertos se han mostrado seguras, con escasos efectos secundarios y

resultados variables dependiendo de los estudios, pero generalmente con niveles altos de respuesta inmunogénica.

Vacunas de 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).

Salazar en 1965 inoculó a 204 individuos con una cepa atenuada en laboratorio de *L. braziliensis* y hasta que no se estudió una protección subsiguiente, algo más de la mitad de los receptores dieron un resultado de *Leishmania* positivo. Manson-Bahr, en 1963 en un estudio clínico con una vacuna de *L. donovani* atenuada naturalmente no encontraron diferencias entre los sujetos inmunizados y los controles, lo que parecía apoyar la hipótesis de que sólo se va a desarrollar inmunidad frente a la LC cuando la infección haya progresado al estado ulcerativo.

Entre los estudios basados en este grupo de vacunas, recientemente se estudió la antigenicidad de proteínas de unión al ARNm de la familia PUF de *L. infantum* frente a suero de hámster afectado de LV (Folgueira y col., 2010) como posibles candidatos a vacunas. Se observó que los promastigotes carentes del gen DHFR eran capaces de sobrevivir en los macrófagos durante varios días y proporcionaban protección parcial frente a la LC (Titus y col., 1995). Se observó que al eliminar los genes que codificaban para una familia de cisteín proteasas, los promastigotes quedaban completamente atenuados y producían protección parcial frente a LC (Alexander et al., 1998). En Brasil se ha aprobado la vacuna basada en el ligando del receptor de fucosa-manosa (Leishmune[®]) (Dantas-Torres, 2006) para el tratamiento de la LV canina.

Vacunas de 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.

En la búsqueda de vacunas frente a la enfermedad existe otra vía abierta de investigación que consiste en la búsqueda de antígenos de *Leishmania*, capaces de inducir una respuesta Th1 y el diseño de proteínas en las que se expresen epítomos adecuados. Hasta la fecha, al menos diez antígenos diferentes de *Leishmania* recombinados se han utilizado para vacunar ratones contra la LC, incluyendo gp63, gp46, gp42, LACK (*Leishmania* homologue of receptors for Activated C Kinase) y hsp70 (Handman, 2001).

1.1.5.2. Prevención de la enfermedad

Actualmente, la prevención de la leishmaniosis constituye el gran reto de la OMS para erradicar la enfermedad en aquellos países en los que continúa siendo endémica. Las medidas preventivas para combatir esta situación deberían incluir la actividad coordinada de organizaciones de salud locales e internacionales, así como la colaboración entre estados ya que la enfermedad desconoce las fronteras.

La OMS reconoció en su Asamblea Mundial de la Salud de 2000 a la leishmaniosis como una de las enfermedades tropicales más desatendidas, además de considerar preocupante la falta de información epidemiológica imprescindible para su conocimiento y control. En líneas generales, las medidas preventivas deberían estar dirigidas en varias direcciones:

Información

Es indispensable el conocimiento de las áreas geográficas afectadas de leishmaniosis, la detección de posibles casos y el establecimiento de sistemas de vigilancia y análisis de datos, así como la formación de personal sanitario y auxiliar implicados en los programas de control. Además, insta a los países miembros, a que fomenten la sensibilización sobre su morbilidad y promuevan el acceso equitativo a los servicios de salud para su prevención y tratamiento, sin olvidar el impulso de las investigaciones relacionadas con el control de la leishmaniosis y la difusión de sus resultados.

Control de vectores

No sólo son necesarias las fumigaciones periódicas de las áreas endémicas sino también el conocimiento de la biología y naturaleza de los flebotominos, ya que estos insectos adquieren resistencias que perjudican el control de la enfermedad e indirectamente afectan a la sostenibilidad medioambiental.

Control de reservorios

En las formas zoonóticas americanas la posibilidad de actuar contra los reservorios es prácticamente nula dado su carácter selvático. En las leishmaniosis con reservorios domésticos (como es el caso de nuestro país) o peridomésticos, se aconseja el control de los animales en los focos zoonóticos, mediante exámenes serológicos de los perros sospechosos y su tratamiento en el caso de que no se acepte su eliminación.

Al igual que lo señalado en el apartado del vector, un mejor conocimiento de la especie reservorio permitirá un mejor sistema de control.

En la 63ª Asamblea Mundial de la Salud del 25 de marzo de 2010, la OMS continúa reconociendo la leishmaniosis como una de las enfermedades tropicales más desatendidas. La campaña de promoción de la OMS referente al acceso equitativo a los servicios de salud, en particular al acceso a los medicamentos, anunció dos grandes logros: el abaratamiento de dos de los cinco medicamentos existentes (un 90% la anfotericina B liposómica y un 60% el antimonio de meglumina) y la inclusión de dos nuevos medicamentos en la Lista Modelo OMS de Medicamentos Esenciales, la paromomicina en 2007 y la anfotericina B liposómica en 2008. Fruto de las peticiones de la Asamblea de la Salud, se han puesto en marcha tres programas de control regionales:

- 1) El programa para la eliminación del kala-azar en Asia Sudoriental, acordado por los ministros de Bangladesh, India y Nepal en 2005.
- 2) Un programa de la región de las Américas para reforzar el control y vigilancia de la leishmaniosis en esta zona, que comprende el mapeo de la enfermedad en 14 países y actividades encaminadas a frenar el avance de la LV en Argentina, Brasil y Paraguay.

- 3) Un programa aprobado por los Estados Miembros en una reunión sobre las estrategias de control de la leishmaniosis en la Región del Mediterráneo oriental: Aleppo, Siria, 2008.

En esta resolución, además se continúa instando a promover y apoyar la investigación aplicada sobre el control de la leishmaniosis.

1.1.5.3. Quimioterapia

Antimoniales pentavalentes: Históricamente el tratamiento de la leishmaniosis se ha realizado con compuestos derivados del antimonio pentavalente (Sb^V), como el estibogluconato sódico (Pentostam[®]) usado principalmente en Europa y el antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) en el Nuevo Mundo; su uso se remonta a hace más de setenta años aunque pronto hicieron su aparición las resistencias por abuso y sobredosificación. Para que el fármaco sea activo se requiere la reducción del estado de oxidación Sb^V a Sb^{III} , siendo la forma trivalente la responsable de la toxicidad del fármaco y de sus efectos secundarios adversos. La reducción tiene lugar tanto en el macrófago (Carter y col., 2005) como en el amastigote (Zhou y col., 2004). El principal efecto es un descenso en los niveles de ATP del parásito, debido a la alteración de la glucólisis y de la oxidación de ácidos grasos (Balaña-Fouce y col., 1998). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la reducción de la capacidad redox del parásito, esencialmente por depleción de los niveles de GSH y TSH inducidos por Sb^{III} (Wyllie y col., 2004) e inhibición de la tripanotiona reductasa que conduce a la muerte por apoptosis (Sudhandiran y Shaha, 2003). Los estudios recientes sobre los mecanismos de acción leishmanicida del Sb^V , enfocados a evaluar la inhibición de enzimas como las tirosín-fosfatasas (pTpasas) (Yi y col., 2002) y las Top (Walker y Saravia, 2004) han descrito diferencias en los efectos inhibitorios *in vitro* e *in vivo* entre los principios activos. La información bioquímica existente indica que el Pentostam[®] inhibe un rango distinto de pTpasas (Yi y col., 2002) y la Top I es sólo inhibida por Pentostam[®] y no por Glucantime[®] (Walker y Saravia 2004), pero se desconoce en qué medida estas diferencias influyen en la respuesta clínica al tratamiento. El uso generalizado de los antimoniales con

dosis inadecuadas para el tratamiento de la leishmaniosis canina podría ser uno de los orígenes de la aparición de resistencias (Croft y Yardley, 2002).

La OMS recomienda una dosificación basada en la cantidad de Sb^V diario de 20 mg/kg administrados por vía intramuscular o intravenosa (con un máximo al día de 850 mg de Sb^V) durante 20 días en la forma cutánea y 28 días en la forma mucocutánea y visceral. La administración intravenosa debe realizarse lentamente diluida en una solución de dextrosa en agua o suero fisiológico (Balaña-Fouce y col., 1998). Como efectos secundarios, pueden presentarse, artralgias, mialgias, malestar abdominal, elevación reversible de las enzimas hepáticas y ocasionalmente alteraciones relacionadas con la coagulación. En pacientes mayores de 45 años o que han recibido dosis excesivamente altas o durante tiempo prolongado, se han observado alteraciones electrocardiográficas. Se recomienda realizar exámenes en el laboratorio periódicamente y el tratamiento está contraindicado durante el embarazo y en personas con problemas hepáticos.

Anfotericina B: Se trata de un fármaco de segunda línea en el tratamiento de LV. Es un antibiótico macrólido poliénico producido por el actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Su mecanismo de acción depende de su unión preferente al ergosterol presente en la membrana del parásito frente al colesterol de la membrana de las células de mamífero (Ramos y col., 1996). Consecuentemente se producen alteraciones en el potencial de membrana del parásito y pérdida de metabolitos (Ramos y col., 1994). La anfotericina B es un fármaco utilizado principalmente en casos de LV recidivante o altamente resistente a antimoniales. En los últimos años, su actividad leishmanicida se ha visto mejorada en sus formas galénicas encapsuladas en liposomas, (Ambisome[®]), complejos discoidales con sulfato de colesteroil y complejos en forma de lazo de dimiristoil fosfatidilcolina (Amphocil[®]) y dimiristoil fosfatidil glicerol (Abelcet[®]), aumentando sus índices terapéuticos y disminuyendo su toxicidad en humanos (Clemons y Stevens, 1998). No es útil en el caso de las LC y LMC (Croft y col., 2006). Su absorción por vía oral es mínima, por lo que se administra por vía intravenosa. A pesar de todo lo comentado anteriormente, no es un fármaco inocuo y entre los efectos tóxicos derivados de su utilización, destacan tromboflebitis, miocarditis e hipocalcemia, por lo que se recomienda un seguimiento médico muy cercano.

Pentamidina: Es una diamidina aromática con acción frente a varias especies de *Leishmania* y tripanosomas africanos. Tiene un mecanismo de acción pleiotrópica inhibiendo la síntesis y el transporte de poliaminas en el parásito (Balaña-Fouce y col., 1989), uniéndose de manera reversible al surco menor del ADN del kinetoplasto impidiendo su síntesis (Johnson y col., 1998), inhibiendo la Top II y produciendo el colapso del potencial de membrana mitocondrial (Vercesi y Docampo, 1992; Basselin y Robert-Gero, 1998).

Se utiliza como terapia de sustitución en los casos más resistentes a Sb^v, pero debido a su alta toxicidad su uso está prácticamente restringido como terapia de mantenimiento en pacientes con VIH.

Azoles: Son fungicidas sintéticos de estructura imidazólica. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición del lanosterol, un intermediario del ergosterol en la membrana del parásito (Berman, 2003). Como consecuencia, se produce la alteración de las membranas subcelulares y procesos autofágicos que llevan a la muerte de la célula (Balaña-Fouce y col., 1998). Los azoles más comunes ensayados en *Leishmania* son fluconazol, ketoconazol e itraconazol (Roberts y col., 2003). Su administración es tanto tópica como oral. Entre los efectos secundarios más frecuentes derivados de su utilización pueden aparecer trastornos de los tejidos epidérmicos (prurito) y gastrointestinales. Otras reacciones menos frecuentes aparecen a nivel del sistema nervioso central y reproductivo, trastornos hematológicos y hepatobiliares.

Alopurinol: El alopurinol es un análogo de la hipoxantina que inhibe la xantina oxidasa, interfiriendo así con el metabolismo de los ácidos nucleicos del hospedador, e impidiendo la liberación de purinas. Las leishmanias son incapaces de sintetizar las purinas por sí mismas (Hammond y Gutteridge, 1984) y necesitan las del hospedador, por lo que la acción del alopurinol impide la síntesis de ácidos nucleicos del parásito. El alopurinol es un análogo de la adenosina que es captado activamente por la célula, que lo transforma en su correspondiente nucleósido y nucleótido antes de incorporarlo al ARN (Marr y Berens, 1983).

Paromomicina: La paromomicina (Humatin[®]) es un antibiótico aminoglucósido producido por *Streptomyces krestomuceticus* con amplia actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *Leishmania* y que además ha

demostrado poseer eficacia clínica. Debido a que su uso aún no está extendido no existen casos de resistencia; la administración es tanto tópica como por vía intramuscular. En ensayos clínicos de LV en India el porcentaje de curación de la paromomicina es similar al obtenido con anfotericina B (Sundar y col., 2007). Su mecanismo de acción se debe a su capacidad para unirse al ARN ribosomal 16S del protozoo inhibiendo la síntesis de proteínas. En *Leishmania* se ha observado disfunción mitocondrial (Croft y col., 2006). *In vitro*, la paromomicina y los antimoniales demuestran efecto sinérgico frente a *Leishmania* spp.

Miltefosina: La miltefosina o es un análogo de la fosfocolina descubierto en el instituto Max Planck. A pesar de que se diseñó originariamente como antineoplásico, su actividad antileishmanicida sobre *L. donovani* fue descrita por primera vez en 1987 (Achterberg y Gercken, 1987; Croft y col., 1987). En 2002 fue aprobada como fármaco frente a la LV en la India bajo el nombre de Impávido® (Zentaris, Alemania) (Sindermann y col., 2004). Su mecanismo de acción se basa en la estimulación de los linfocitos T y de la acción microbicida de los macrófagos, pero al no ser T-dependiente, como es el caso de los antimoniales, podría constituir un interesante candidato en el tratamiento de los enfermos coinfectados con VIH (Russoy col., 1999). La miltefosina además induce apoptosis en los parásitos (Verma y col., 2007) y sus dianas parecen ser muy diversas, origina disfunción mitocondrial en *Leishmania* con reducción del potencial electroquímico mitocondrial (Luque-Ortega y Rivas, 2007), así como la inhibición de la síntesis de éter-lípidos e inversión en la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina de la membrana plasmática (Rakotomanga y col., 2007). Sus ventajas radican en su administración oral (aunque puede realizarse también tópicamente) y los escasos efectos secundarios, entre los que se han descrito molestias gastrointestinales y cierta actividad teratogénica en ratones, por lo que se desaconseja su uso durante la gestación (Murray, 2000). Hasta hoy sólo se han descrito resistencias *in vitro*, relacionadas con mutaciones de proteínas tipo aminofosfolípido-traslocasas o a bombas de eflujo (Perez-Victoria y col., 2003; Perez-Victoria y col., 2006).

Actualmente, debido a su elevada actividad antiparasitaria, se utiliza tanto en el tratamiento de leishmaniosis humana como canina (Woerly y col., 2009). Al igual que otros alquilfosfolípidos, tiene la capacidad de ser incorporada

selectivamente por microorganismos eucariotas, ya que también es eficaz frente a otros protozoos, amebas, hongos y levaduras. Recientemente, se han desarrollado análogos fluorescentes de la miltefosina, que permitirían detectar cepas resistentes y mejorar por tanto, los tratamientos (R+D CSIC).

1.2 LAS ADN TOPOISOMERASAS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS

1.2.1 La Topología del ADN

En 1965 Vinograd y col. (Vinograd y col., 1965), obtuvieron las primeras microfotografías electrónicas del ADN circular del virus del poliovirus (SV40) y observaron que bajo ciertas condiciones experimentales la molécula de ADN adquiría una conformación retorcida parecida a una goma elástica girada varias veces sobre sí misma, forma que recibió el nombre de "supercoiled" (superenrollada) en oposición a la forma topológica no retorcida o "relaxed" (relajada). El superenrollamiento de una molécula de ADN, se debe a la tensión generada por un exceso o un defecto en el número de enlace (Δl_k) entre las dos cadenas antiparalelas de la doble hélice. En este estado de superenrollamiento la información codificada del material genético no es accesible a los mecanismos de replicación y transcripción, así que la torsión debe disiparse reduciendo Δl_k a cero. Para relajar el ADN superenrollado, es necesario que se produzcan cortes en las cadenas, que permitan a sus extremos rotar libremente. Las moléculas de ADN lineales tienen que relajar los dominios discretos entre estructuras que se mantienen condensadas. Los mecanismos de relajación del ADN superenrollado deben cortar una o las dos cadenas para que las atraviesen otras y continuar con su sellado para restaurar la integridad del mensaje genético. Estos cambios en la topología del ADN, son generados por proteínas que originan cortes transitorios en las hebras de ADN, permitiendo el paso de la otra hebra por el hueco creado antes de su sellado.

1.2.2 Las ADN Topoisomerasas

Las ADN topoisomerasas (Top) catalizan cambios en la topología del ADN durante los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación

del genoma. En primer lugar pueden cortar y empalmar repetidamente los enlaces fosfodiéster del esqueleto de polifosfodesoxirribosa que alberga en su interior a las bases nitrogenadas codificadoras del mensaje genético. En segundo lugar, permiten que otras cadenas de ADN pasen entre los dos cabos transitoriamente escindidos. En el desempeño de esa tarea, las Top utilizan la energía del enlace internucleotídico para unirse covalentemente al extremo 3' o 5' del ADN. Cuando empalman nuevamente las cadenas de ADN, revierten esa unión covalente, restableciendo el enlace internucleotídico inicial. (Wang, 1996; Champoux, 2001; Wnag, 2002; Corbett y Berger, 2004).

Se han caracterizado tres tipos de Top en función de sus propiedades catalíticas, gasto energético y estructura de su proteína: las ADN topoisomerasas de tipo I (TopI, subtipos IA y IB) y las ADN topoisomerasas de tipo II (TopII) (Tabla 1.1).

1.2.2.1 Topoisomerasas tipo II (Top II)

Las TopII son enzimas homodiméricas que generan cambios topológicos complejos en el ADN (relajación, desanudado y desencadenado) mediante la ruptura transitoria de las dos cadenas de la doble hélice facilitada por gasto energético en forma de ATP (Witz y Stasiak, 2010). Durante el proceso de ruptura y empalme, se produce un intermediario covalente entre los extremos 5' de cada una de las hebras del ADN y cada una de las subunidades enzimáticas. Se han identificado y expresado funcionalmente las de varios parásitos como: *P. falciparum* (Cheesman y col., 1994), *Cryptosporidium parvum* (García-Estrada y col., 2010), *T. brucei* (Strauss y Wang, 1990), *T. cruzi* (Fragoso y Goldenberg, 1992) y varias especies del Gen. *Leishmania* (Das y col., 2001; Hanke y col., 2003) sin que existan grandes diferencias morfológicas o cinéticas con las de sus correspondientes hospedadores.

La unión de la Top II a la cadena de ADN se realiza mediante un enlace covalente a través del residuo de Tyr de una de sus dos subunidades. En el ser humano, se presentan dos isoformas: α y β , que difieren tanto en el peso molecular (170 kDa y 180 kDa, respectivamente) como en su regulación génica. La localización del residuo activo de Tyr también es diferente en las isoformas y está localizado en el aminoácido (aa) 804 para α y en el aa 821

para β . Después de la ruptura de las dos cadenas de la molécula de ADN, la TopII permite el paso de otra doble cadena a través de la mella creada, permitiendo la relajación de la molécula de ADN. Una vez que esta segunda cadena ha atravesado la hélice rota, la TopII religa la molécula de ADN mellada. La hidrólisis del ATP sirve para recuperar la conformación de su sitio activo, liberándose de la molécula de ADN modificada, y comenzar un nuevo ciclo catalítico.

Tabla 1.1 Características estructurales y bioquímicas de las Top eucarióticas

	Subfamilia I		Subfamilia II
	TopIA	TopIB	TopII
Estructura			
Estado oligomérico	monómero (A)	monómero (A)	homodímero (A ₂)
Dominio ATPasa	no	no	GHLK
Toprim	sí	no	sí
Bioquímica			
Dependencia metálica	Mg ²⁺	no	Mg ²⁺
Lugar escisión	5' cadena sencilla	3' cadena sencilla	5' doble cadena
$\square \Delta Lk$	+1	+/-n	+/-2
Enzimas			
	TopIA; TopIII; girasa reversa	TopIB; TopV	TopII α , β ; ymtTopII; ADN girasa; TopIV

Las TopII son dianas de un gran número de agentes terapéuticos incluidos compuestos antineoplásicos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios. Muchos compuestos actúan estabilizando el complejo Top-ADN interfiriendo en la capacidad de estas enzimas para religar las cadenas melladas.

1.2.2.2 Topoisomerasas tipo I (Top I): subfamilias IA y IB

Al contrario de lo que sucede con las TopII, las enzimas de tipo I rompen sólo una de las hebras del ADN y únicamente permiten relajar el ADN superenrollado. Se subdividen en función de que formen el intermediario covalente con el extremo 5' del segmento escindido (IA) o con el extremo 3' (IB). Este intermediario se establece tras el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la Tyr de su centro activo con un grupo fosfato de la cadena nucleotídica, originando un enlace fosfodiéster transitorio que rompe la cadena de ADN. En este momento la hebra mellada gira a través de su complementaria alcanzándose un mayor grado de relajación (Stewart y col., 1998). Finalmente la enzima religa la cadena mellada.

Las TopI son enzimas monoméricas – con la excepción de las encontradas en tripanosomátidos – y no necesitan ATP para relajar el ADN superenrollado positiva o negativamente (Tabla 1.1).

Las TopIA fueron originariamente descritas sólo en células procariotas, aunque más recientemente se identificaron en muchos organismos eucariotas, incluidos humanos y se nombraron como TopIII. A esta subfamilia pertenecen también las girasas reversas, que en las bacterias termofílicas previenen la desnaturalización térmica del ADN. Las TopIA sólo son capaces de relajar el ADN superenrollado negativamente y dependen de la presencia de iones Mg^{2+} para completar su actividad (Viard y de la Tour, 2007).

Por el contrario las enzimas clasificadas dentro de la subfamilia TopIB no necesitan iones metálicos para relajar las hélices superenrolladas positiva o negativamente, uniéndose covalentemente al extremo 3' del ADN. Estas enzimas han sido descritas casi exclusivamente en organismos eucariotas, con excepción de una TopIB hallada en el virus de vacinia, que comparte ciertas características estructurales y funcionales con el resto de las TopIB eucarióticas (Sharma y col., 1994). En esta subfamilia se incluye también la TopV de *Methanopyrus kandleri*, un organismo metanogénico del reino Archaea (Slesarev y col., 1993).

TopIB humana: La TopIB humana (hTopIB) ha sido caracterizada estructuralmente con gran detalle y sirve como modelo comparativo para el resto de las proteínas ortólogas. La hTopIB es una enzima monomérica de 765 aminoácidos con una masa molecular teórica de 91 kDa. Los estudios cristalográficos permiten distinguir cuatro dominios estructurales: i) extremo N-terminal; ii) dominio "core"; iii) extremo C-terminal y iv) dominio "linker" (Stewart y col., 1996; Redinbo y col., 1998).

El extremo N-terminal de 24 kDa (214 aa) está poco conservado filogenéticamente. Está compuesto mayoritariamente por aa cargados positivamente que no están involucrados en la relajación del ADN. Contiene cuatro posibles señales de localización nuclear (NLS): NLS I (aa 59-65); NLS II (aa 150-156); NLS III (aa 174-180) y NLS IV (aa 192-198). NLS II parece ser la encargada de conducir hTopIB al núcleo, mientras que NLS IV la relocaliza en el nucleolo (Mo y col. 2002). Además estos autores describieron una NLS funcional no canónica con dos residuos de Asp situados entre los aa 117 y 146, lo que apoyaría la hipótesis de dos mecanismos de transporte nucleocitoplasmático, distintos e independientes.

Existen estudios que han demostrado el papel que juegan los aa de las posiciones 186 a 210 en la actividad y sensibilidad a camptotecina (un inhibidor específico de TopIB). En 2001, Lisby y col., demostraron que la ausencia del dominio N-terminal provocaba cambios en los patrones de relajación y pérdida de sensibilidad de la hTopIB a CPT. Sin embargo, si se mantenían los 16 aa últimos de este dominio, no se observaban cambios en la actividad catalítica de la enzima. En 2003, Christensen y col. Demostraron que los residuos situados entre las posiciones 190 a 210 son necesarios para la actividad correcta de la enzima *in vivo*, pero no *in vitro*.

El dominio central o "core" comprende 421 aa (54 kDa) con elevado grado de conservación filogenética. Este dominio es esencial para la relajación del ADN superenrollado al contener todos los aa necesarios para la actividad enzimática excepto la Tyr del centro activo.

Los estudios cristalográficos realizados en presencia de ADN demostraron la estructura bilobular del "core" en presencia de su sustrato. El primer lóbulo lo integran los subdominios I (aa 215 a 232 y aa 320 a 433) y II (aa 233 a 319) que conforman una caperuza con dos hélices a en forma de V. El segundo lóbulo constituye la base en la que se asienta la molécula de ADN y lo integran el subdominio III del "core" (aa 434 a 635) y el extremo C-terminal de la proteína. Los dos lóbulos están conectados entre sí por una hélice α . En el lado opuesto a esta hélice, los subdominios I y III, interactúan a través de seis aa (367-369 del subdominio I y 497-499 del subdominio III) formando dos lazos opuestos entre sí llamados labios (lips) y un puente salino conecta la caperuza con la base de la enzima. De este modo los subdominios mencionados junto con el extremo C-terminal forman un canal cargado positivamente donde está instalada la Tyr del centro activo, entre el subdominio III y el extremo C-terminal, cerca del grupo fosfato de la hebra de ADN que va a ser escindida (Redinbo y col., 1998) (Fig. 1.9).

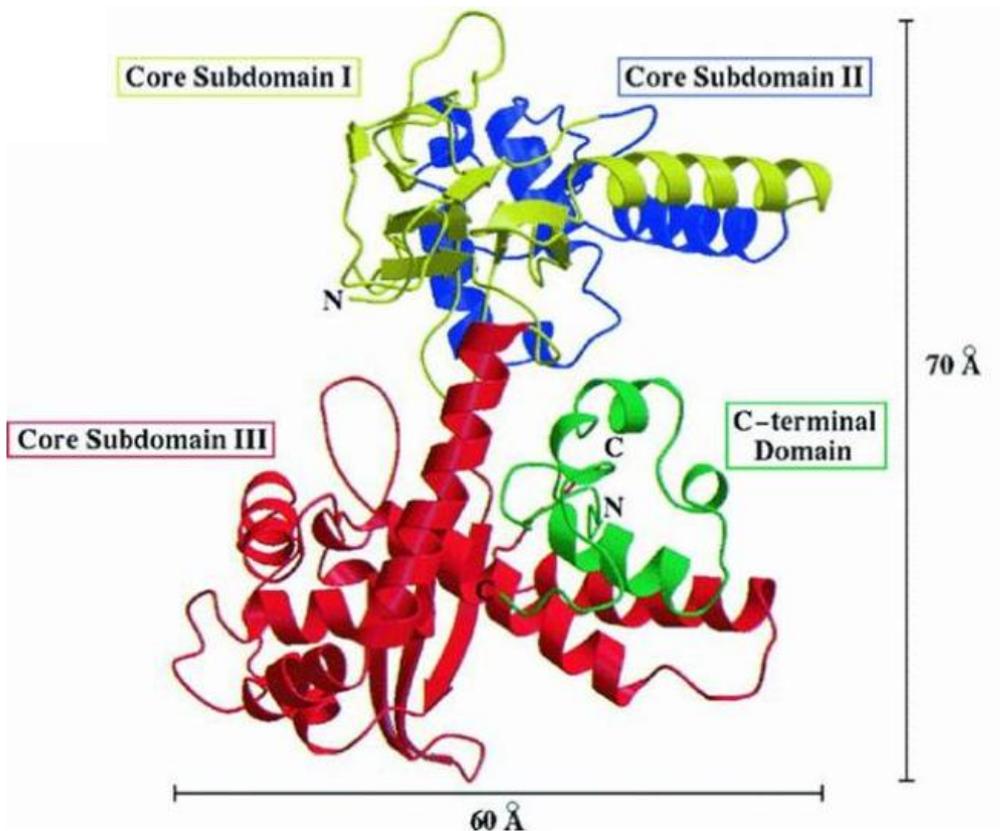


Fig. 1.9 Modelo 3D de la estructura de la hTopIB en ausencia de ADN (Champoux, 2001).

El extremo C-terminal lo constituyen los últimos 53 aa y contiene el centro activo de la enzima, representado por la Tyr-723 dentro del motivo estructural conservado SKLNY, que establece el enlace fosfodiéster transitorio con la molécula de ADN durante los procesos de relajación.

Conectando el dominio C-terminal con el "core" se encuentra una región de escasa conservación filogenética denominada "linker" que no interviene funcionalmente en la relajación del ADN. El "linker" lo constituyen 77 aa que sobresalen del resto de la proteína ya que únicamente contacta con la parte final del subdominio III del "core". La parte más cercana al ADN está cargada positivamente gracias a la presencia de varios residuos de Lys y Arg. La Lys 650 y Arg 708 establecen contacto con la hebra de ADN, interaccionando con los grupos fosfato de los nucleótidos situados entre las posiciones +9 y +10 de la hebra escindida y los +7 y +8 de la que permanece intacta.

1.2.3 TopII de Tripanosomátidos

Se han descrito múltiples isoformas de TopII tanto en el núcleo como en la mitocondria de los organismos eucariotas (Zhang y col., 2007). La TopII nuclear está presente en dos formas: TopII α y TopII β , que participan en los procesos de mitosis y/o meiosis de las células de mamífero. De manera similar, dos genes localizados en el cromosoma 11, codifican para las formas nucleares α y β de la TopII de *T. brucei* (Kulikowicz y Shapiro, 2006). Asimismo, un gen complementario situado en el cromosoma 9 codifica para la TopII mitocondrial de *T. brucei* (mtTopII) y está asociado al ADNk. Esta característica es exclusiva de tripanosomátidos, aunque se haya descrito una parte de actividad mitocondrial en la TopII de mamíferos, parece ser una forma truncada de la TopII β nuclear. Los diferentes genes que codifican para la TopII nuclear y mitocondrial, se han detallado en los proyectos del genoma de todos los tripanosomátidos hasta la fecha y parece que son esenciales para la replicación del ADNk. Los árboles filogenéticos incluyen múltiples genes que codifican para las TopII de diferentes organismos, concluyendo que todas las TopII nucleares tienen un origen eucariótico común, mientras que los genes que codifican para la mtTopII de tripanosomátidos, son filogenéticamente más cercanos a la rama de las ADN-girasas procariontas (Forterre y col., 2007).

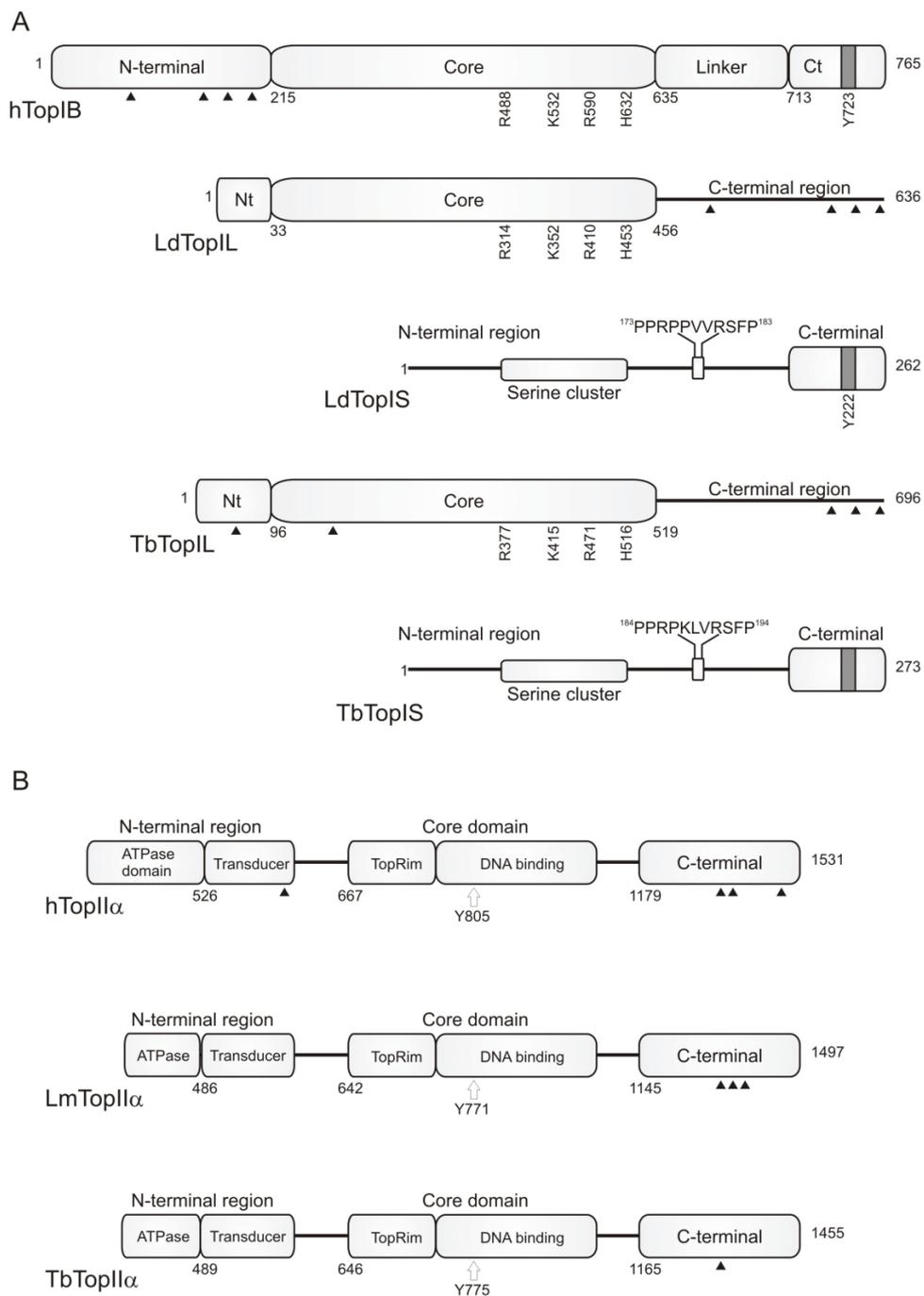


Fig. 1.10 A) Estructura esquemática de la TopIB de *L. donovani* comparada con la enzima humana.; B) Estructura esquemática de la TopII de *L. major* comparada con la enzima humana (Díaz-González y col., 2008).

Desde el punto de vista estructural la TopII de *Leishmania* es un monómero que conserva todas las características de la enzima eucariota: i) el extremo N-terminal de 489 aa contiene un dominio con actividad ATPasa; ii) el dominio "linker" comunica el extremo N-terminal con el resto de la proteína; iii) el dominio "core" conservado contiene un tipo inusual de pliegue Rossmann llamado Toprim que coordina dos iones Mg^{2+} así como el centro activo en el que se sitúa la Tyr catalítica; iv) el dominio C-terminal poco conservado con múltiples NLS (Das y col., 2001; Hanke y col., 2003) (Fig. 1.10).

Mediante técnicas de ARN de interferencia (siARN), el grupo de Shapiro logró silenciar la expresión de ambas TopII, mitocondrial y nuclear en *T. brucei*, observando profundos defectos en la morfología celular y nuclear. Ya que la mtTopII participa en el desenrollamiento del ADNk dentro de los minicírculos antes de la replicación, el silenciamiento de esta enzima genera un fenotipo singular, carente de ADNk (diskinetoplasia) que conduce a la muerte celular (Kulikowicz y Shapiro, 2006).

1.2.4 TopIB de Tripanosomátidos

Todos los tripanosomátidos poseen una TopIB típicamente eucariota, además de marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican proteínas putativas con función TopIA y TopIII respectivamente.

En 1999, Broccoli y col. sugirieron la existencia de un gen que codificaba para una proteína de 636 aa en *L. donovani* similar a una TopIB, pero carente del motivo "SKxxY" del extremo C-terminal (conservado en todas las TopIB), que contiene la Tyr catalítica. Este polipéptido recombinante era incapaz de desenrollar el ADN *in vitro*, lo que apuntaba a que se trataba de un pseudogen o a que tenía que existir otro gen que codificase una proteína capaz de completar el extremo C-terminal.

Más tarde, Villa y col. (2003) encontraron dentro del cromosoma 4 de *L. major*, un segundo gen que codificaba para una proteína que contenía el centro activo perdido y por tanto, conservaba el motivo "SKxxY" con la Tyr 222 necesaria para la actividad catalítica. Tras clonar ambos genes en un vector biscistrónico de expresión en levaduras, se consiguió purificar una

enzima recombinante capaz de relajar ADN *in vitro*. Gracias a estos resultados la TopIB de *L. donovani* (LdTopIB), fue caracterizada como una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad grande de 636 aa y 73 kDa (LdTopIL) que contenía el extremo N-terminal y el dominio "core" y una subunidad pequeña de 262 aa y 28 kDa (LdTopIS), que conservaba la Tyr catalítica. Posteriormente Bodley y col. (2003) publicaron resultados similares en tripanosomas africanos usando un modelo clásico de purificación de proteínas. Parece que esta singular organización genómica de la TopIB, que combina dos protómeros de diferentes tamaños para construir la enzima activa, es exclusiva de tripanosomátidos.

De la comparación estructural de las TopIB de tripanosomátidos con la enzima ortóloga humana, se pueden asignar dominios y subdominios funcionales que aparecen detallados en el esquema de la Fig. 1.10 (Díaz-González y col., 2008).

La subunidad LdTopIL contiene el extremo N-terminal más corto que el de la enzima humana y muy poco conservado filogenéticamente. El dominio central o "core" sí guarda alta homología con el de otras TopIB y es donde se encuentran la mayoría de aa que interaccionan con el ADN, como la Arg-314 (Arg-488 en la enzima humana), Lys-352 (Lys-532 en la enzima humana), Arg-410 (Arg-590 en la enzima humana) e His-453 (His-632 en la enzima humana). Finalmente la enzima presenta una extensión C-terminal que carece de homología con otras proteínas ortólogas (Díaz-González y col., 2008).

La subunidad LdTopIS contiene un extremo N-terminal largo no conservado y rico en serinas susceptibles de fosforilación, que podrían constituir un mecanismo de regulación post-traducciona. En su extremo carboxilo guarda una alta homología con el extremo C-terminal de otras TopIB y es donde se sitúa la Tyr-222 (Tyr-723 en la enzima humana), esencial para la ruptura transitoria de la cadena nucleotídica del ADN (Reguera y col., 2006).

La localización del "linker" es hasta ahora desconocida. Podría estar formado por parte de los extremos de la dos subunidades que al interaccionar entre sí estabilizarían el conjunto, o podría generarse como consecuencia de modificaciones post-traduccionales que eliminasen parte de los grupos amino y carboxilo de las diferentes subunidades. Se han realizado estudios en los

que se ha delecionado parte de los extremos N y C-terminales de ambas subunidades en la enzima de *Leishmania*. Los resultados muestran que casi 70 aa del extremo C-terminal de la subunidad grande (que parecen contener NLS putativos) y la mayor parte del extremo N-terminal de la subunidad pequeña, no son necesarios para la actividad catalítica (Díaz-González y col., 2007). Por otro lado, Das y col., han sugerido que la pérdida de los aa 1 al 39 del extremo N-terminal de la subunidad grande, disminuyen la velocidad de religación de la enzima, apuntando a su posible papel en la coordinación entre el ADN y otras partes de la enzima. Además, la pérdida de los 99 primeros aa del extremo N-terminal, originan la pérdida de la actividad de relajación de la enzima. Estos resultados sugieren que los aa de las posiciones 40-99 podrían participar en la interacción entre las dos subunidades del heterodímero, colocando correctamente la Tyr del centro activo para su ataque nucleofílico sobre la molécula de ADN sustrato.

A excepción de las levaduras, la Top IB es esencial para los organismos eucariotas. El silenciamiento, mediante técnicas de siARN, de cada una de las subunidades, da como resultado una drástica reducción de la síntesis de ADN y ARN en tripomastigotes africanos *in vitro*, de forma similar a cuando se tratan las formas intraeritrocitarias de tripanosomas con CPT (Bakshi y col., 2004). Además, el doble reemplazamiento génico del gen que codifica LdTopIS, origina un fenotipo no viable en *L. major* (Balaña Fouce y col. 2008).

1.2.5 Inhibición de la TopIB en Tripanosomátidos

Desde su descubrimiento en 1970 las TopIB se han considerado potenciales dianas de intervención terapéutica. Debido a su papel relevante en la preservación de la fidelidad de la información genética, su estructura ha permanecido filogenéticamente conservada, lo que hace que los compuestos destinados a su inhibición, no discriminen entre la enzima del hospedador y la del parásito. La TopIB de tripanosomátidos es una destacable excepción, ya que difiere profundamente de la enzima de mamíferos, tanto en su estructura como en su nivel de expresión, lo que ha abierto una nueva línea de diseño de moléculas que actúen específicamente sobre la forma del parásito (Das y col., 2004; Díaz-González y col., 2009).

Los inhibidores de la TopIB se han clasificado en dos categorías: i) inhibidores de tipo I o venenos que actúan estabilizando el complejo de escisión enzima-ADN; ii) inhibidores de tipo II que interfieren en las funciones catalíticas de la enzima (D'Arpa y col., 1989).

1.2.5.1 Inhibidores de clase I

La camptotecina (CPT): La CPT y sus derivados son el mejor ejemplo de venenos enzimáticos o inhibidores de clase I. Estructuralmente la CPT es un alcaloide pentacíclico natural aislado de la corteza y el tallo de la planta *Camptotheca accuminata*, un árbol ornamental de la familia Nyssaceae, originario del sudeste de China y de Tibet (Wall y col., 1966). La CPT y sus sales llegaron a los ensayos preclínicos en la década de los 70, pero fueron rechazados debido a su toxicidad. A pesar de ello, dieron origen a numerosas series de compuestos con actividad anti-tumoral, muchos de ellos incluidos en terapias contra el cáncer y otros muchos en fase de evaluación (Pommier, 2006).

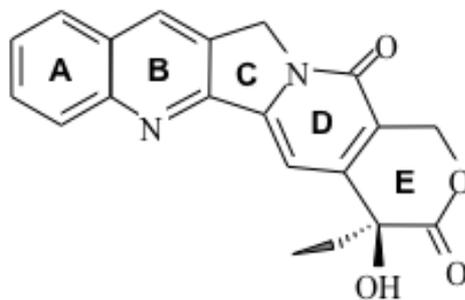


Fig. 1.11 Estructura de la camptotecina en su forma activa alfa-OH-lactona en el anillo E.

En condiciones fisiológicas normales, los procesos de ruptura y religado que lleva a cabo la TopIB están estrechamente coordinados y el intermediario covalente enzima-ADN es apenas detectable. Sin embargo, la CPT estabiliza esos complejos ternarios con el ADN mellado (complejos de escisión o

complejos de "cleavage"), impidiendo que la brecha abierta en el ADN sea de nuevo sellada (Champoux y col., 2000; Liu y col., 2000).

Bioquímicamente, la CPT es un potente inhibidor no competitivo de la TopIB, con actividad a concentraciones sub-micromolares, que posee un anillo terminal de lactona que la hace inestable en soluciones acuosas, produciéndose la rápida hidrólisis no enzimática y dependiente del pH, para formar un anillo abierto de ácido hidroxicarboxílico, con menor actividad inhibitoria. A pH neutro o básico, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de especies menos activas, mientras a pH ácido se favorece la formación de lactona activa. La CPT contiene un carbono asimétrico en posición 20, siendo la forma S la configuración farmacológicamente activa (Pommier y col., 1998) (Fig. 1.11).

Se ha comprobado que la CPT genera complejos covalentes enzima-ADN en preparaciones de material genético nuclear y kinetoplástico en tripanosomas, leishmanias y otros protozoos parásitos. Los ensayos realizados por Bodley y Shapiro en 1995 para evaluar *in vitro* una serie de análogos de la CPT, frente a tripanosomas africanos y leishmanias, mostraron que su toxicidad estaba estrechamente relacionada con su habilidad para promover la formación de complejos covalentes enzima-ADN, lo que parecía indicar que su diana celular era exclusivamente la TopIB.

Staker y col., en 2005 basándose en estudios de co-cristalización de la hTopIB con CPT y ADN, propusieron una serie de interacciones entre los diferentes componentes del complejo de escisión, que podría asumirse para la enzima de tripanosomátidos (aceptando su estructura heterodimérica). De acuerdo con este modelo, la CPT se intercalaría en el punto donde se produce la escisión de la cadena de ADN imitando un par de bases nitrogenadas. Dentro del sitio de intercalación, la cadena lateral del Asp-353 en LdTopIL (correspondiente al Asp-533 en la enzima humana), establece un puente de hidrógeno con el radical 20(S)-OH de la lactona terminal de la CPT, mientras que la Arg-190, (Arg-364 en humana) se une mediante otro puente de hidrógeno con un átomo de N del anillo B de la CPT. La Asn-221 (Asn-722 en la enzima humana), 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 importante residuo involucrado en el mecanismo de inhibición de la CPT es el motivo conservado Phe-361-X-Gly-363 del dominio "core" de *Leishmania* y la Arg-364. También se han encontrado dos aa en la enzima humana, Glu-418 y Ala-653, relevantes en la resistencia al fármaco. Estos aa no están conservados en levaduras ni leishmanias. Marquis y col. (2005) han descrito dos mutantes en LdTopIB resistentes a CPT que presentaban dos sustituciones en el dominio "core" de la subunidad grande, G185R y D325E. Estos mutantes son incapaces de formar complejos enzima-ADN con la CPT *in vitro*, perdiendo el fármaco su efecto citotóxico.

El dominio "linker" juega también un importante papel en la inhibición por CPT. Delecciones parciales del dominio "linker" de la hTopIB que conservaban la actividad de relajación, perdían la capacidad de establecer el complejo enzima-ADN en presencia de CPT (Stewart y col., 1999). En *Leishmania*, formas truncadas en las extensiones C-terminal y N-terminal de las subunidades grande y pequeña respectivamente, perdían la sensibilidad a CPT en ensayos *in vivo*, conservando la actividad de relajación. Se pudo delimitar un undecapéptido en LdTopIS crucial para la sensibilidad a este fármaco que está siendo estudiado en la actualidad (Díaz-González y col., 2007).

Al igual que otros agentes causantes de daños en el ADN, los inhibidores de clase I son eficientes inductores de apoptosis, algo que podría explicar el efecto citotóxico de estos compuestos sobre los tripanosomátidos. Sen y col. en 2004 demostraron que la CPT en *L. donovani* generaba un incremento del potencial de membrana mitocondrial. Los autores mostraron que la CPT producía un aumento de las concentraciones intracelulares de ROS, lo que provocaba el aumento de la peroxidación lipídica y la disminución intracelular de GSH. Sin embargo, estos resultados no han podido ser reproducidos con otras especies de *Leishmania* (Balaña-Fouce y col., 2009).

Existen pocos estudios preclínicos *in vivo* del efecto de la CPT y sus derivados en infecciones experimentales. En 2001 el grupo del Dr. Bergeron estudió la eficacia de una formulación encapsulada de CPT en un modelo de LV murina, demostrando que el fármaco producía una reducción significativa de la carga parasitaria en hígado y bazo, con una dosis intraperitoneal de 2,5 mg/kg de

peso corporal. Una particularidad destacable, es que la encapsulación de CPT en liposomas no aumentaba la eficacia del fármaco, pero contribuía a disminuir su toxicidad (Proulx y col., 2001).

Irinotecán (CPT-11) y SN38: El irinotecán {[7 etil-10-[4-(1-piperidino)-1piperidino] carbonilo] CPT} 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, cuya actividad inhibitoria sobre la Top IB purificada y sobre células tumorales humanas y murinas es muy superior (Fig. 1.12). El SN38 muestra una decisiva actividad anti-tripanosomal ya que la carboxilasa responsable de la activación del irinotecán a SN38 no es activa en el parásito.

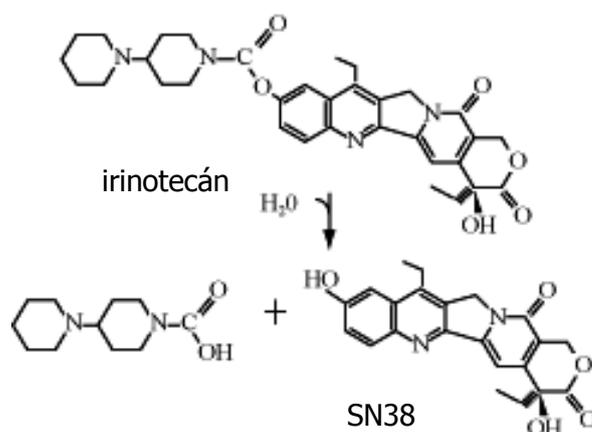


Fig. 1.12 Estructura del irinotecán y de su metabolito activo SN38, así como su mecanismo de transformación metabólica

El irinotecán ha sido comercializado para el tratamiento del cáncer colonrectal, tanto en las terapias de primera como de segunda línea, y de otros tumores sólidos (Potmesil, 1994). El SN38 es un sustrato de la uridin difosfato glucuronosiltransferasa (UGT1A) originando un glucurónido inactivo (SN38G) (Sparreboom y col., 1998), que facilita su eliminación en orina. Estudios recientes, han revelado que el irinotecán es poco efectivo frente a trypanostigotes de *T. brucei* debido fundamentalmente a su baja permeabilidad para atravesar la membrana plasmática del parásito, y no por su incapacidad para estabilizar los complejos enzima-ADN (Deterding y col.,

2005). El irinotecán y el SN38, han demostrado ser mutagénicos *in vitro* en el test de aberración cromosómica de células CHO y en el test *in vivo* del micronúcleo en ratón sin embargo, el test de Ames no ha evidenciado ningún potencial mutagénico.

Topotecán (Hycamtin®): El topotecán (9-dimetilaminometil-10-OH-CPT) (Fig. 1.13) es un segundo derivado hidrosoluble de la CPT, utilizado principalmente para el tratamiento del cáncer ovárico y de pulmón, además de otros tipos de cáncer. Al igual que otros derivados semisintéticos de la CPT, el topotecán estabiliza los complejos covalentes enzima-ADN, durante la fase S del ciclo celular, inhibiendo la religación y por tanto paralizando la maquinaria replicativa de la célula, lo que se traduce en una muerte celular por apoptosis. El topotecán tiene un anillo de lactona que se hidroliza de manera reversible hacia un anillo carboxilado inactivo (Kollmannsberger y col., 1999). La mayoría del fármaco es eliminado en orina.

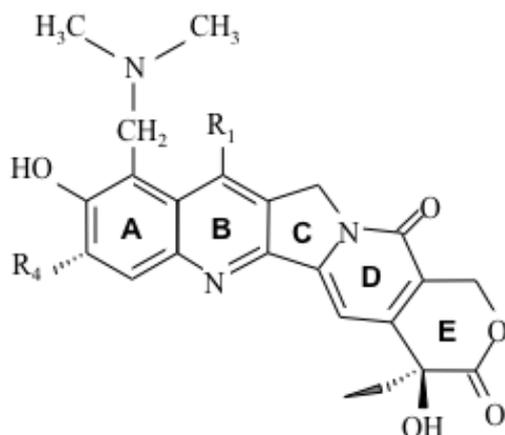


Fig. 1.13 Estructura del topotecán (TPT) en su forma alfa-OH-lactona

Los resultados de algunos estudios con hTopIB purificada revelan que el TPT se intercala en el lugar de escisión del ADN interaccionando con las bases tanto corriente arriba (-1) como corriente abajo (+1). La estructura molecular en forma de anillo plano del topotecán, le permite ocupar el espacio de un par de bases nitrogenadas en posición +1, como si el fármaco no estuviera ligado

al complejo. Específicamente, el eje más largo de la molécula de TPT, es paralelo al eje de las bases emparejadas, lo que difiere de los modelos informáticos publicados sobre el mecanismo de inhibición de la CPT, que sólo logra intercalarse en la cadena mediante un puente perpendicular al eje más largo de las bases +1 y -1 del punto de escisión. La intercalación se origina por una rotación del enlace fosfodiéster de la cadena intacta sobre la mella abierta por la TopIB sin necesitar la rotación de la otra hebra de ADN, ni la ruptura de ningún puente de hidrógeno existente entre pares de bases, como anteriormente se había descrito (Staker y col., 2002).

Indolocarbazoles (rebecamicina y derivados): Los derivados indolocarbazólicos, constituyen un prometedor grupo de inhibidores de clase I, con una estructura aromática poliheterocíclica (Fig. 1.14). La rebecamicina y sus derivados son producidos naturalmente por el actinomiceto *Saccharotrix aerocolonigenes*. Se han probado algunos derivados sintéticos de la rebecamicina *in vitro*, para evaluar su citotoxicidad frente a células tumorales humanas y animales y algunos han servido para empezar ensayos de importancia clínica (Prudhomme, 2003)

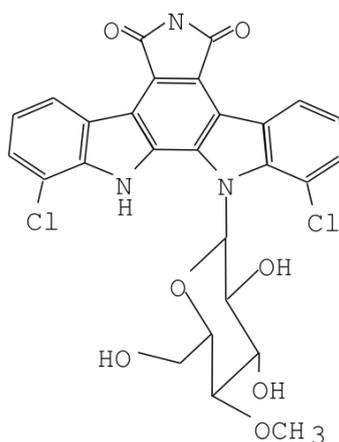


Fig. 1.14 Estructura del compuesto indolocarbazólico rebecamicina

La estructura plana de estas moléculas, las permite intercalarse entre los pares de bases del ADN, donde finalmente estabilizan los complejos enzima-ADN. La reacción entre la hTopIB y los análogos de la rebecamicina, muestra que uno de los dos grupos carbonilo del anillo maleimida interactúa con la Arg-364 (Arg-190 conservada en *Leishmania*) en el surco menor lateral del complejo de escisión. Los indolcarbazoles son moléculas simétricas, excepto por el enlace glucídico que sustituye al átomo de N de uno de los anillos indólicos. Debido a esta asimetría, el anillo indol glicosilado se une a las bases nitrogenadas de la cadena intacta de ADN, mientras que el anillo indol no glicosilado interacciona con la cadena mellada de la molécula de ADN, de manera que la Asn-722 (Asn-221 conservada en *Leishmania*), que es crucial para la inhibición producida por la CPT, es irrelevante en la formación del complejo enzima-ADN con estos compuestos (Woo y col., 2002).

En 2005, Deterding y col., demostraron que la rebecamicina presentaba efecto citotóxico frente a tripomastigotes de *T. brucei* *in vitro* a concentraciones sub-micromolares. Este efecto fue corroborado por nuestro grupo (Balaña-Fouce y col., resultados inéditos) utilizando una serie de análogos de la rebecamicina glucosilados y no glucosilados frente a promastigotes de *L. donovani*. Estos resultados, han demostrado que la presencia del sustituyente glucosídico incrementa la estabilidad del complejo de intercalación, al interactuar con el surco menor externo de la doble hélice del ADN.

Indenoisoquinolinas: Se trata de un tipo de inhibidores de clase I sintéticos, que actúan capturando y estabilizando el complejo transitorio enzima-ADN (Meng y col., 2003). 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 indolcarbazoles, que necesitan que la enzima esté activa para formar el complejo ternario). Otras interactúan directamente con la TopIB de mamíferos a concentraciones elevadas. En 2009, Bakhsi y col. han evaluado la actividad *in vitro* de una serie de indenoisoquinolinas frente a *T. brucei*. Los resultados obtenidos parecen demostrar que algunos compuestos de este tipo, poseen una elevada actividad tripanocida *in vitro*, a concentraciones micro y sub-micromolares. Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos en el parásito, actúan como venenos

frente a la Top dentro de las células y muestran evidencias de su eficacia en ratones desafiados con tripanosomas.

Naftoquinonas: El grupo de las naftoquinonas engloba pigmentos naturales que aparecen mayoritariamente en plantas superiores aunque también pueden encontrarse en ciertos hongos, erizos y estrellas de mar.

La diospirina (2,6-bis-7-metiljuglona) es una naftoquinona que se extrae de la especie *Diospyros chloroxylon* de la Familia Ebenaceae. Estructuralmente es un dímero asimétrico del lapachol que forma cristales cúbicos rojo-anaranjados (Fig. 1.15). En 1987, Hazra y col., describieron la toxicidad de la diospirina y algunos de sus derivados en promastigotes de *L. donovani in vitro*. De manera similar a la CPT la diospirina es capaz de inducir la estabilización enzima-ADN *in vitro* (Ray y col., 1998). Parece ser un inhibidor selectivo de la enzima de *Leishmania*, necesitándose concentraciones diez veces superiores para producir el mismo efecto en la enzima humana. La diospirina es un antitumoral capaz de inhibir el crecimiento de promastigotes de *L. donovani* además del crecimiento de *T. brucei* y *P. falciparum in vitro*.

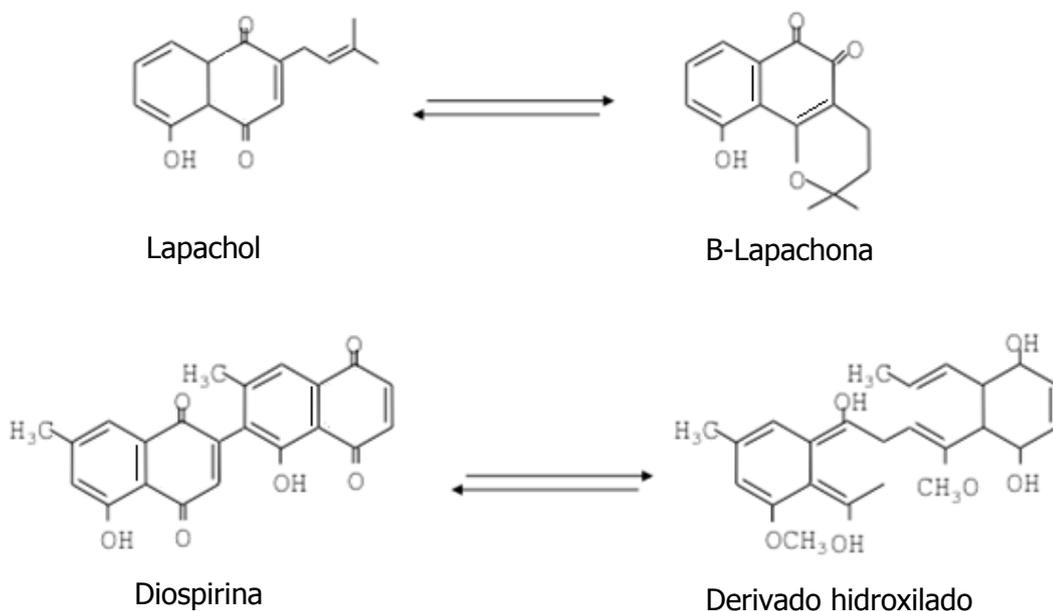


Fig. 1.15 Estructura de las naftoquinonas lapachol, β -lapachona y diospirina

El lapachol (2-OH-3-(3-metilbut-2-enil) naftaleno-1,4-diona) es un compuesto de origen vegetal procedente del árbol *Tabebuia avellanedae*, (lapacho) originario de Brasil. La β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto [1,2-b] piran-5,6-diona) se obtiene mediante un simple tratamiento con ácido sulfúrico sobre el lapachol, o fácilmente sintetizada a partir del lomatiol aislado de las semillas de la lomata, que crece en Australia. Las dos naftoquinonas tienen una amplia variedad de actividades terapéuticas 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 actividad citotóxica de estos compuestos.

Ácido betulínico y derivados: Se trata de 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. Uno de los derivados más estudiado del ácido betulínico es el ácido dihidrobetulínico (DHBA) (Fig. 1.16). El DHBA previene la formación del complejo binario enzima-ADN sobre las TopI y TopII de *Leishmania* (Chowdury y col., 2003).

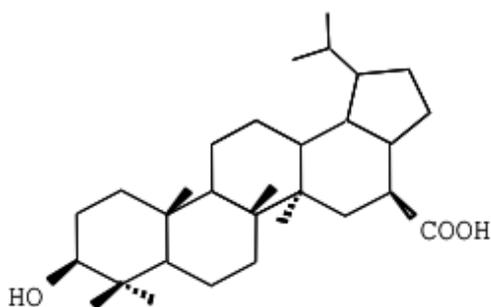


Fig. 1.16 Estructura del ácido dihidrobetulínico (DHBA)

A diferencia de la CPT, el DHBA no estabiliza el complejo ternario de escisión, sino que actúa sobre la enzima evitando que se una al ADN sustrato. El DHBA, pertenece a un grupo de inhibidores de Top que antagonizan con la CPT y el etopósido (inhibidor específico de TopII) en el establecimiento del complejo de escisión. Como consecuencia, el DHBA posee un drástico efecto inhibitorio sobre el crecimiento de promastigotes de *L. donovani*, a concentraciones micromolares. A pesar de causar daños en el ADN, produciendo desgranulación y desfragmentación del material genético, no produce daños en el ADNk, lo que apoya la correlación directa entre la inhibición de Top y la apoptosis en estos parásitos.

Antimoniales pentavalentes: Como ya se señaló anteriormente, el estibogluconato de sodio o Pentostam[®] (no así la meglumina de antimonio o Glucantime[®]), es capaz de estabilizar los complejos de escisión enzima-ADN (a concentraciones mucho más elevadas que la CPT), tanto de la TopIB purificada como en los promastigotes intactos de *L. donovani* (Chakraborty y Majumder, 1988). Sin embargo, el efecto estabilizador de los complejos de escisión, parece ser un efecto secundario del modo de acción de estos compuestos sin consecuencias terapéuticas (Lucumi y col., 1998).

Berberina: La berberina es un alcaloide bencilisoquinolínico cuaternario hallado en ciertas plantas de las Familias Annonaceae, Berberidaceae y Menispermaceae. Estos compuestos han sido utilizados clínicamente para el tratamiento de la leishmaniosis durante más de 50 años, demostrándose que poseen actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* (Merschjohann y col., 2001) (Fig. 1.17).

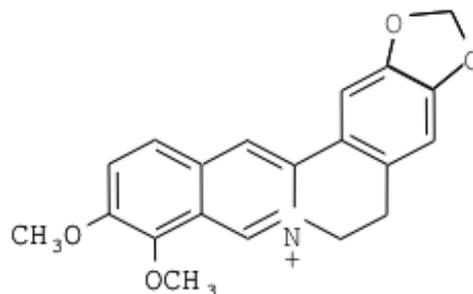
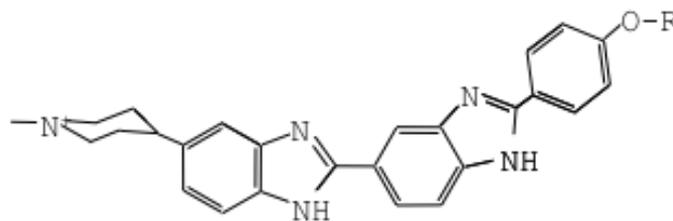


Fig. 1.17 Estructura química de la berberina.

La berberina disminuye parcialmente la carga de amastigotes de *L. donovani* en macrófagos hepáticos y reduce en más del 50% el tamaño de la lesión en infecciones *in vivo* de *L. braziliensis panamensis* en cricetos (Vennerstrom JL. Y col., 1990).

Bisbenzimidazoles: Los bisbenzimidazoles inhiben el acceso de la TopIB al ADN sustrato por unirse a regiones ricas en AT del surco menor de la doble hélice (Chen y col., 1993). Los más estudiados y utilizados debido a su actividad antiprotozoaria son el Hoechst 33342 [2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperizinil)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol trihidroclortrihidrato] y el Hoechst 33258 [2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperizinil)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazol trihidroclor pentahidrato] (Fig. 1.18). A diferencia de otros, el Hoechst 33342 es capaz de atravesar las membranas celulares con mayor facilidad y es fácilmente captado por las células viables por lo que se utiliza extensivamente en análisis de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Este grupo de inhibidores estabilizan el complejo de escisión enzima-ADN, pero no son capaces de inhibir el ciclo catalítico de las TopII.

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 endorreducción cromosómica, además de demostrar variabilidad en sus niveles de citotoxicidad dependiendo de la especie de *Leishmania* tratada (Wilson y col., 2008).



Hoechst 33342 R = H

Hoechst 33258 R = ethyl

Fig. 1.18 Estructura de los bisbenzimidazoles Hoechst 33342 y Hoechst 33258.

Diamidinas aromáticas: Como ya se hizo referencia anteriormente, la pentamidina es una droga de segunda generación utilizada en el tratamiento de LV y LMC resistente a antimoniales pentavalentes (Balaña-Fouce y col., 1998). Las diamidinas aromáticas son compuestos pleiotrópicos a los que se ha asignado como mecanismo de acción principal la inhibición de la síntesis de poliaminas en varios puntos (Reguera y col., 2005). De la misma manera que los derivados bisbenzimidazólicos, las diamidinas aromáticas se unen a regiones del ADN ricas en AT del surco menor de la doble hélice (Johnson y col., 1998). Al unirse a estas regiones específicas, interfieren en la catálisis de las TopI y TopII pero no son capaces de estabilizar los complejos de escisión (Jean-Moreno y col., 2006) (Fig. 1.19).

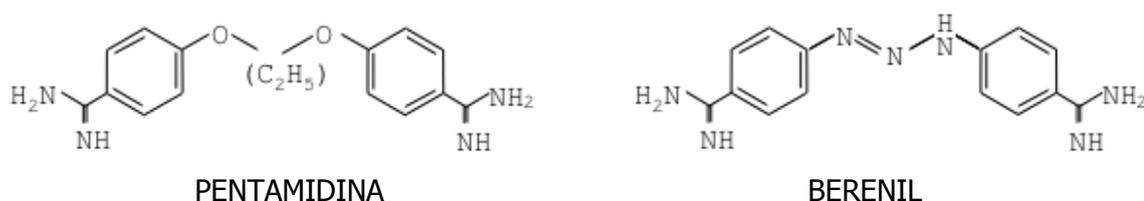


Fig. 1.19 Estructura de las diamidinas aromáticas pentamidina y berenil.

Ácidos grasos acetilénicos y metoxilados:

Los fosfolípidos procedentes de organismos marinos contienen ácidos grasos de estructura anómala sin contrapartida en los organismos terrestres. Los ácidos grasos ramificados de los ácidos penta-, hepta- y octadecenoico, procedentes de esponjas del Caribe y los derivados acetilénicos de los ácidos heptadecenoicos e icosanoicos, han mostrado actividad inhibitoria frente a LdTopIB a concentraciones micromolares (Carballeira y col., 2009 a y b) por un mecanismo alternativo a la estabilización del complejo enzima-ADN. La toxicidad comparada entre promastigotes de *Leishmania* y macrófagos peritoneales indica que estos compuestos podrían tener potencial terapéutico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Estudiar la capacidad terapéutica de los inhibidores de LdTopIB en promastigotes de *L. infantum*, *L. major*, *L. donovani*, estimando además su toxicidad sobre macrófagos de ratón RAW 264,7 y macrófagos intraperitoneales murinos.
2. Estudiar el efecto inhibitorio *in vitro* sobre la actividad enzimática de LdTopIB de estos compuestos y sobre la formación *in vivo* de complejos enzima-ADN
3. Estudiar la utilidad de dos cepas de promastigotes de *L. infantum* y *L. major* modificados genéticamente, que expresan marcadores fluorescentes para el cribado de fármacos leishmanicidas.
4. Estudiar el efecto terapéutico de los inhibidores de Top en infecciones *in vitro* sobre macrófagos intraperitoneales de ratón, comparada con fármacos leishmanicidas convencionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cepas bacterianas

La cepa de *Escherichia coli* DH5α que se utilizó en los experimentos de transformación para la amplificación de plásmidos, fue adquirida a Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA. EEUU).

Tabla 3.1 Descripción genotípica de la cepa bacteriana utilizada en el estudio

cepa de <i>E. coli</i>	genotipo
DH5α	<i>deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺) relA1 supE44 thi-1</i> $\Delta(\text{lacZYA-argFSV169})$ f80δlacZDM15 F λ^+

3.1.2. Cepas de levaduras

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EKY3, deficiente en γ TopIB, utilizada para sobreexpresar la proteína recombinante, fue cedida por la Dra. Mary A. Bjornsti (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, EEUU).

Tabla 3.2 Descripción genotípica de la cepa de levaduras utilizada en el estudio.

Cepa de levadura	genotipo
EKY3	<i>MAT Δura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 trp1Δ63 top1Δ::TRP1</i>

3.1.3. Cepas de *Leishmania*

En este trabajo se utilizaron cinco cepas diferentes del género *Leishmania*:

Promastigotes de *Leishmania major* Lv39c5: fueron amablemente cedidos por el Dr. Stephen M. Beverley, Ph.D. (Department of Molecular Microbiology; Washington University in St. Louis)

Promastigotes de *Leishmania infantum* JPC: fueron amablemente cedidos por el Dr. José María Requena (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid).

Promastigotes de *Leishmania donovani* MHOM/ET/67/L82: fueron amablemente cedidos por el Dr. Luis Ignacio Rivas (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid).

Promastigotes de *Leishmania major* y *Leishmania infantum* que sobreexpresan genes fluorescentes: en este laboratorio se realizaron transfecciones estables en las cepas salvajes mediante electroporación con el vector pLEXY-hyg2 (Jena Bioscience, Germany). De este modo, se obtuvieron promastigotes capaces de expresar las proteínas fluorescentes mCherry y citrina.

Amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*: los amastigotes pertenecientes a la línea axénica desarrollada por el Dr. A. A. Pan, fueron cedidos por el Dr. Luis Ignacio Rivas (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid).

3.1.4. Línea macrofágica murina RAW 264.7

Los macrófagos de la línea monocítica murina RAW 264.7 procedentes de ratones BALB/c fueron cedidos por el Dr. Luis Ignacio Rivas (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid).

3.2. VECTORES

3.2.1. pBluescript SK (+/-)

Los plásmidos de la serie pSK (Stratagene) tienen un tamaño de 2958 pb y contienen un gen que confiere resistencia a ampicilina (amp). Poseen el origen de replicación monocatenario del bacteriófago FI, lo que permite la

obtención de ADN circular de cadena sencilla y la selección por color de los transformantes.

3.2.2. pESC URA⁻ GAL

El vector pESC (Stratagene) tiene parte del esqueleto del fagémido pBluescript (II) SK (+) y está diseñado para la expresión y el análisis funcional de genes eucarióticos en *S. cerevisiae*. Este vector contiene los promotores *GAL1* y *GAL10* en orientación opuesta, lo que permite la expresión simultánea de dos genes en una cepa de levaduras bajo el control de un promotor reprimible. Además el plásmido posee el gen *amp^r* para su amplificación y selección en *E. coli*. El marcador URA3 permite su selección en medios de levaduras auxótrofos.

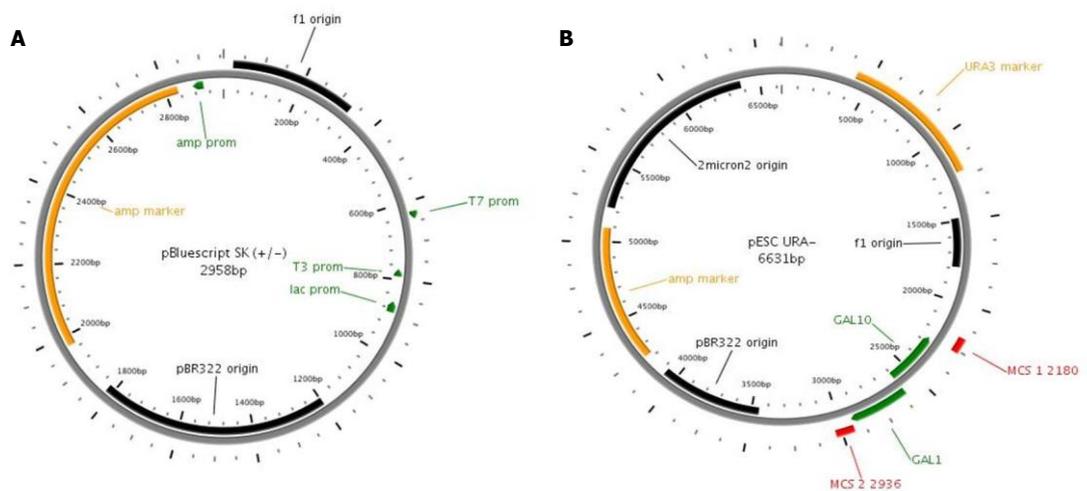


Fig. 3.1 Mapa de los vectores plasmídicos utilizados en la memoria. A) Mapa del vector plasmídico pBluescript SK(-); B) Mapa del vector pESC URA⁻ para la expresión de genes en levaduras.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

3.3.1. Medio Luria-Bertani (LB)

Es el medio de cultivo estándar para el crecimiento de las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio. Se preparó disolviendo 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 L de H₂Odd, con un pH final de 7,0. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro de medio de cultivo. La esterilización se realizó en autoclave Sterilclav-18 (Raypa) durante 20 min a 120 °C.

3.3.2. Medio YPD

Es el medio de cultivo estándar usado para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Se preparó disolviendo 20 g de extracto de levadura y 10 g de bactopectona en 900 mL de H₂Odd y posteriormente se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 °C. Para su uso se añadieron 50 µg/mL de ampicilina estéril y se ajustó la concentración final de glucosa al 2%.

3.3.3. Medio SC URA⁻

Es el medio de cultivo para el crecimiento de levaduras que portan el plásmido pESC URA⁻, que no contiene el nucleótido uracilo y es suplementado con los azúcares requeridos en distintos momentos. Se preparó disolviendo 1,7 g de medio para levaduras sin aminoácidos y 0,7 g de una mezcla de aminoácidos sin uracilo en 900 mL de H₂Odd; para su uso se añadieron 20 g de agar por 900 mL de medio de cultivo. Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 °C, y posteriormente se añadieron 100 mL de glucosa, rafinosa o galactosa al 20% (p/v).

3.3.4. Medio M199

Es un medio de cultivo básico para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania spp.* Se preparó un stock concentrado 5x para poder partir de él a la hora de preparar medio líquido para las distintas especies de *Leishmania*. Para ello se disolvieron 53,15 g de M199 en 1 L de H₂Odd, al que se añadió

ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintanosulfónico (HEPES) hasta una concentración final de 25 mM. El pH se ajustó a 7 y para esterilizarlo se utilizaron filtros de 22 µm de diámetro de poro.

Para el crecimiento de cultivos líquidos de promastigotes de *L. major* se diluyeron 100 mL de medio M199 5x en 500 mL de H₂Odd estéril. Se suplementó con 10% de FBS, 40 mM HEPES pH 7,4, 0,1 mM adenina, 0,5% hemina, 0,1% biotina, 2 ng/mL de biopterina y 2,5 mL de un cóctel de antibióticos penicilina/estreptomicina.

Para el crecimiento de cultivos líquidos de promastigotes de *L. donovani* y *L. infantum* se diluyeron 100 mL de medio M199 5X en 500 mL de H₂Odd estéril. Se suplementó con el 10% de FBS, 40 mM HEPES pH 6,9, 2 mM de glutamina, mix de vitaminas, 0,1 µg/mL de ácido fólico y 0,25 mM de adenosina, 2,5% de hemina y 2,5 mL de un cóctel de antibióticos penicilina/estreptomicina.

Para el crecimiento de cultivos de amastigotes axénicos se diluyeron 100 mL de medio M199 5X en 500 mL de H₂Odd estéril y se suplementó con el 20% de FBS, 5% de tripticasa, 50 µg/mL de hemina, 2 mM de glutamina, 13,8 mM de glucosa y 2,5 mL de un cóctel de antibióticos penicilina/estreptomicina.

3.3.5. MEDIO RPMI

Tanto los macrófagos peritoneales de ratón como los pertenecientes a la línea RAW 264,7 se cultivaron en medio RPMI 1640 pH 7,2, suplementado con el 10% de FBS, 2 mM de glutamina, 24 mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES y 2,5 mL de un cóctel de antibióticos penicilina/estreptomicina.

3.4. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.4.1. Bacterias y levaduras

Tanto las cepas de bacterias como las de levaduras se mantuvieron a 4 °C en placas petri con su correspondiente medio en agar o congeladas a -80 °C después de ser resuspendidas en el medio adecuado suplementado con glicerol al 20% (v/v).

3.4.2. Promastigotes de *Leishmania spp.*

Se mantuvieron congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización, resuspendiendo los cultivos en medio M199 suplementado con el 10% de DMSO, 5% de FBS y en ausencia de tampón HEPES y antibiótico. Una vez descongelados se incubaron en medio M199 a 26 °C y en aireación en frascos de 75 cm².

3.4.3. Amastigotes de *Leishmania pifanoi*

De manera similar a los promastigotes, los amastigotes axénicos se mantuvieron congelados en N₂ líquido resuspendidos en medio RPMI 1640 al 40% en ausencia de HEPES y NaHCO₃ y suplementado con el 10% de DMSO y 50% de FBS. Tras ser descongelados los parásitos se mantuvieron en el medio M199 citado en el apartado 2.3.4. de esta sección a 32 °C en frascos de cultivo de 75 cm².

3.4.4. Macrófagos RAW 264,7

Para mantener las células congeladas en N₂ líquido, los cultivos de macrófagos se resuspendieron en medio RPMI 1640 al 40% sin HEPES y NaHCO₃, suplementado con el 50% de FBS y 10% de DMSO. Una vez descongelados, los cultivos se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² en el medio citado en el apartado 2.3.5. a 37 °C y en una atmósfera con el 5% de CO₂.

Tabla 3.3. Medios de cultivo, reactivos, material y equipo.

REACTIVOS	CASA COMERCIAL
Triptona	Sigma-Aldrich
Extracto de levaduras	Pronadisa. Hispanlab.
NaCl	Fisher BioReagent® ChemAlert®
Agar	Pronadisa. Hispanlab.
Bactopeptona	Oxoid. LTD.
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Penicilina/Streptomina	Sigma-Aldrich
Glucosa	Sigma-Aldrich
Rafinosa	Sigma-Aldrich
Galactosa	Sigma-Aldrich
Medio para levaduras sin uracilo	Sigma-Aldrich
Mezcla de aminoácidos sin uracilo	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	Sigma-Aldrich
FBS (Suero Fetal Bovino)	Gibco. Invitrogen. Fisher Scientific
M199	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Adenosina	Sigma-Aldrich
Adenina	Sigma-Aldrich
Glutamina	Sigma-Aldrich
Hemina	Sigma-Aldrich
Biotina	Sigma-Aldrich
Biopterina	Sigma-Aldrich
Tripticasa	Becton Dickinson.
Ácido fólico	Sigma-Aldrich

NaHCO ₃	Prolabo. Fisher Scientific.
DMSO	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich
RPMI Mix de vitaminas 1649	Sigma-Aldrich,
EQUIPO/MATERIAL	CASA COMERCIAL
Autoclave Sterilclav-18	Raypa®
Frascos de 75 cm ²	Nunc. Fisher Scientific
Incubador 26 °C	Heraeus
Incubador 32 °C	Heraeus
Placas Petri	Fisher Scientific
Crioviales	Fisher Scientific
Incubador 37 °C	Thermo Scientific
Filtros de 22 µm	Nalgene Thermo Fisher Scientific

3.5. MANIPULACIÓN DEL DNA

3.5.1 Aislamiento de DNA

Para la obtención de ADN plasmídico se inoculó desde una placa fresca una colonia aislada y transformada con el vector deseado y se creció en medio LB con antibiótico durante 12 h. A continuación, se utilizó alguno de los kits siguientes: "Plasmid Mini", "Qiaprep Spin Mini" y "Plasmid Maxi", dependiendo de la cantidad requerida y la pureza deseada. En todos ellos se siguieron siempre las instrucciones del fabricante.

3.5.2. Cuantificación, pureza y conservación del ADN

La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante la medida de la absorbancia a 260 nm de una dilución 1:100 de la muestra correspondiente en un espectrofotómetro "GeneQuant II". Para conocer la concentración de ADN de dicha dilución en µg/mL se multiplicó el valor obtenido por un coeficiente, cuyo valor es 50 para muestras de ADN de doble cadena. Como criterio de

pureza se utilizó el cociente entre la absorbancia a 260 y 280 nm de la muestra. Tras su purificación, el ADN fue conservado a corto plazo a -20 °C y a largo plazo a -80 °C.

3.5.3. Secuenciación de ADN

Todas las muestras de ADN, tanto las obtenidas por PCR como las construcciones obtenidas en los vectores plasmídicos, fueron enviadas a Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España) para su secuenciación analítica, usando iniciadores específicos o universales según el caso.

3.6. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

3.6.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* se prepararon mediante el método del CaCl₂, una variación del descrito por Cohen y col (Cohen y col. 1972), de la siguiente manera:

Una colonia aislada se inoculó en 3 mL de LB líquido para incubarse O/N a 37 °C y en agitación a 250 r.p.m. Una vez crecido, el cultivo obtenido se inoculó en 100 mL de LB líquido y se incubó a 37 °C en agitación hasta que el crecimiento celular alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 595 nm.

A partir de ese momento, se iniciaron una serie de incubaciones de 20 min en hielo, siempre procurando que las células no superaran los 4 °C, por lo que las soluciones empleadas en los pasos sucesivos fueron previamente enfriadas.

Tras la primera incubación, las bacterias se centrifugaron a 3000 x *g* y 4 °C durante 15 min, se resuspendieron en 20 mL de MgCl₂ 0,1 M y se mantuvieron en hielo otros 20 min. La suspensión se centrifugó nuevamente a 3000 x *g* a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 20 mL de CaCl₂ 0,1 M, seguido de una nueva incubación en hielo.

Para finalizar, las células se recuperaron por centrifugación a 3000 x *g* a 4 °C durante 15 min y fueron resuspendidas en 2 mL de una solución de CaCl₂ 0,1 M y glicerol al 15% (v/v). Las células competentes preparadas mediante este

protocolo, se congelaron en N₂ líquido repartidas en alícuotas de 200 µL y se mantuvieron a – 80 °C hasta su utilización.

3.6.2. Procedimiento de transformación

El procedimiento de transformación de las células competentes de *E. coli* DH5a es el descrito por Hanahan y col (Hanahan y col. 1983).

En un baño de hielo se descongelaron 200 µL de células competentes a las que se añadieron 50 ng de ADN. La mezcla se incubó durante 20 min en hielo y seguidamente fue sometida a un choque térmico por inmersión en un baño a 42 °C durante 45 s, seguido por un enfriamiento rápido en hielo durante 5 min. Después se añadieron 800 µL de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37 °C en agitación para facilitar la recuperación de las células. Para que las bacterias que hayan incorporado el plásmido expresen el gen de resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección, estas células se sembraron en placas de LB sólido con 50 µg/mL de ampicilina.

3.7. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

La cepa de levaduras EKY3 fue transformada siguiendo el protocolo del acetato de litio (Ito H. y col. 1983). Para ello, se inoculó una colonia en 5 mL de medio YPD suplementado con glucosa al 2% (p/v) y 50 µg/mL de ampicilina para minimizar las contaminaciones bacterianas. Este cultivo inicialmente incubado a 30 °C O/N se inoculó en un volumen mínimo de 100 mL y se incubó a 30 °C en agitación. Cuando alcanzó una DO₅₉₅ entre 1,0 – 1,3, las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron, en condiciones de esterilidad, en 200 µL de una solución de TE 0.1 M con acetato de litio 0,1 M. Sobre esta mezcla se añadieron 700 µL de la misma solución con polietilenglicol 3350 al 40% (p/v). Las células se incubaron con el plásmido requerido para la transformación y en presencia de 15 µg de ADN de esperma de salmón a 30 °C en agitación durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, la transformación continuó mediante choque térmico a 42 °C durante 15 min y todo el contenido fue repartido y plaqueado en placas selectivas con medio SC URA⁻ suplementado con glucosa al 2% (p/v).

TE 0,1 M: 0,1 M Tris, 0,1 M EDTA. pH 8.

Tabla 3.4 Reactivos, material y equipo.

MATERIAL/EQUIPO/REACTIVOS	CASA COMERCIAL
Plasmid Mini	Qiagen
Quiaprep Spin Mini	Qiagen
Plasmid Maxi	Qiagen
Gene Quant II	Amershan Biosciences
CaCl ₂	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Sigma Aldrich
Centrífuga 5415 R	Eppendorf
Baño Unitronic 3200R	J. P. Selecta
Acetato de Litio	Sigma Aldrich
Polietilenglicol 3350	Sigma Aldrich
Agitador 30 °C - 37 °C Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
ADN esperma de salmón	Sigma Aldrich

3.8. PURIFICACIÓN DE LA TOPOISOMERASA IB DE *LEISHMANIA* A PARTIR DE CULTIVOS DE LEVADURAS

3.8.1. Sobreexpresión de Topoisomerasa de *Leishmania*:

Se inoculó una colonia de EKY3 de no más de una semana de antigüedad y transformada con el plásmido pESC, en 5 mL de SC URA⁻ líquido suplementado con glucosa al 2% (p/v) y se incubó durante 3 h a 30 °C en agitación. Transcurrido este tiempo, el cultivo se llevó a 500 mL de SC URA⁻ suplementado con el 2% de rafinosa y se incubó a 30 °C en agitación hasta que alcanzó una DO₅₉₅ de 1,9 - 2. Este tiempo de incubación permite al cultivo crecer hasta agotar toda la glucosa presente en el medio, que es un potente inhibidor del promotor GAL del plásmido. Para inducir este promotor de expresión, el cultivo crecido fue suplementado con el 2% de galactosa y se

incubó de nuevo a 30 °C en agitación durante 6 h. A partir de este momento, todos los reactivos utilizados fueron previamente enfriados a 4 °C procurando que las condiciones del ensayo no superasen esta temperatura. Las células fueron lavadas dos veces y centrifugadas con agua estéril. Tras la última centrifugación, el pellet recogido se resuspendió en 12 mL de TEEG 1X 0,2 M de KCl conteniendo la proporción adecuada de Inhibidores de proteasas y se congeló la mezcla a -80 °C.

Tabla 3.5 Composición de medios de levaduras URA⁻ y YPD y de TEEG 1X, buffer en el que se presenta la LdTopIB purificada a partir de cultivos de levaduras

URA ⁻	YPD	TEEG 1X
1,7 g Medio Base para levaduras 0,7 g Mezcla de aminoácidos sin uracilo 900 ml de H ₂ O _{dd} . Autoclavar	10 g Extracto de levadura 20 g Bactopeptona 0,7 g Adenina 900 ml de H ₂ O _{dd} . Autoclavar	50 mM Tris 1 mM EDTA 1 mM EGTA 10% Glicerol

3.8.2. Preparación de la columna de fosfocelulosa (P11)

Para activar la matriz de fosfocelulosa se mantuvieron en agitación lenta 4 g de P11 en 1 L de H₂O_{dd} a 4 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se realizaron 5 decantaciones con agua fría no estéril cada 15 min, para eliminar la mayor parte de partícula fina. La resina fue filtrada y lavada a través de papel Wathman, realizando lavados con los reactivos que se muestran en la tabla 3.6, todos ellos mantenidos a 4 °C:

Tabla 3.6 Procedimiento de lavado para la activación de la matriz de fosfocelulosa.

REACTIVOS DE LAVADO	VOLUMEN UTILIZADO	TIEMPO DE LAVADO
0,5 M NaOH	25 mL	no más de 5 min
H ₂ O estéril	1 L	
0,5 N HCl	25 mL	no más de 5 min
H ₂ O estéril	1L	
KPO ₄ pH=7	25 mL	no más de 5 min
H ₂ O estéril	1 L	
KPO ₄ pH=7	25 mL	no más de 5 min

Aprovechando 10 mL del último lavado, la resina fue recuperada en un tubo de 50 mL y para su mantenimiento a 4 °C, se añadieron 20 µL de EDTA 1 mM a pH 8. Una vez activada la resina, 5 mL de la misma fueron compactados en una columna de Biorad®, siempre procurando que la temperatura no superara los 4 °C. Suavemente, para evitar que se levante la matriz, se añadieron 5 mL de 5X TEEG 1XG 1 M KCl y se lavó la resina con 10 mL de TEEG 1X 0,2 M KCl con la proporción adecuada de inhibidores de proteasas.

5X TEEG 1XG: 250 mM Tris KCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 10% Glicerol

3.8.3. Preparación de la columna de fenilsefarosa (PSP)

La resina de PSP no es necesario que sea activada. Para su compactación y lavado se procedió de manera similar a la columna P11. Se compactaron 2 mL de la resina y se añadieron cuidadosamente 10 mL de agua fría para eliminar el etanol en el que la resina 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 de sulfato de amonio con una mezcla de inhibidores de proteasas.

3.8.4. Obtención del lisado y clarificado

Para evitar un excesivo choque térmico, el cultivo de levaduras mantenido a -80 °C, fue descongelado en un baño de agua fría y posteriormente suplementado con la siguiente mezcla de inhibidores de proteasas:

Tabla 3.7 Inhibidores de proteasas.

	Volumen	Concentración madre
Quimostatina	1 µL	20 mg/mL en DMSO
Aprotinina	3 µL	10 mg/mL en H ₂ O
Fosforamidon	1 µL	10 mg/mL en H ₂ O
E-64	9 µL	20 mg/mL en H ₂ O o Etanol
Pestatina	7 µL	1 mg/mL en Metanol
Leupeptina	1 µL	1 mg/mL en H ₂ O
Antipaina	2 µL	20 mg/mL en H ₂ O
Bestatina	7,5 µL	1 mg/mL en 0,15 M NaCl
NaF (Fluoruro de Sodio)	150 µL	100X en H ₂ O
NaBi (Bisulfito de sodio)	150 µL	50X en H ₂ O
PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonio)	100 µL	100X en Isopropanol

La cámara "bead-beater" que se utilizó para romper las levaduras fue previamente enfriada a -20 °C y mantenida en esas condiciones mediante un baño de agua con hielo, para evitar la degradación de la proteína. Sobre el cultivo descongelado, se añadió el mismo volumen de bolas de vidrio estériles refrigeradas a 4 °C y se procedió a la ruptura de las células mediante ciclos de 1 min, alternados con descansos de 1 min, hasta completar 16 ciclos. Después, el sobrenadante con los restos celulares fue centrifugado en frío durante 10 min a 16.000 r.p.m. para obtener el clarificado que fue aplicado a las columnas.

3.8.4.1. Columna P11

El clarificado fue diluido a la mitad con el mismo volumen de 1X TEEG 0,2 M de KCl y añadido suavemente sobre la resina. Seguidamente, se llevaron a cabo dos lavados consecutivos con 10 mL de TEEG 1X 0,2 M KCl y TEEG 1X 0,4 M KCl, recogiendo los 5 mL finales de este último lavado. Finalmente, la columna fue eluida con 10 mL de TEEG 1X 0,8 M KCl.

3.8.4.2. Columna PSP

Se mezclaron a partes iguales los 5 mL del segundo lavado y los 10 mL del eluido con 15 mL de 1X TEEG 2 M de sulfato de amonio para obtener un volumen final de 30 mL de 1X TEEG 1 M de sulfato de amonio, que se aplicó suavemente a la nueva columna. La columna se lavó con 5 mL de 1X TEEG 1 M de sulfato de amonio y posteriormente con 3 mL de 1X TEEG 0,8 M de sulfato de amonio. Finalmente, se procedió al eluido de la columna con 4 mL de 1X TEEG recogiendo fracciones de 1mL.

3.8.4.3. Diálisis

El volumen eluido de la columna PSP, se colocó en una tripa de diálisis previamente hervida durante 15 min y lavada con agua fría. Seguidamente se sumergió en un litro de buffer de diálisis durante 2 h, a 4 °C de temperatura, repitiendo el proceso tres veces.

BUFFER DE DIÁLISIS	
10 mM Tris-HCl pH= 7,5	0,1 mM EDTA
50 mM KCl	150 µg/mL BSA
5 mM MgCl ₂	Glicerol 10%

3.8.4.4. Concentración de proteína

Procurando que la temperatura no superase los 4 °C, la muestra fue concentrada en columnas Amicon® Ultra 50 K hasta un volumen final de 60-70 µL.

3.8.4.5. Cuantificación de la actividad TopIB

Antes de valorar la actividad de los inhibidores de Top IB sobre la enzima purificada, realizamos un ensayo destinado a cuantificar la actividad de la misma sobre el ADN superenrollado. Para ello, preparamos una mezcla con el ADN superenrollado y el buffer en el que se realizaron las diluciones de la enzima:

DNA MIX	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
DNA	0,5 µg	4 µL
10X CB	1X	8 µL
H ₂ O		68 µL
ENZIMA MIX		
10X CB	1X	50 µL
H ₂ O		450 µL

1X CB: 100 mM Tris pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 500 mM KCl; 150 mg/mL BSA.

Se colocaron 10 μL de DNA mix en cada tubo de reacción, a los que se añadieron 10 μL de la dilución de enzima correspondiente:

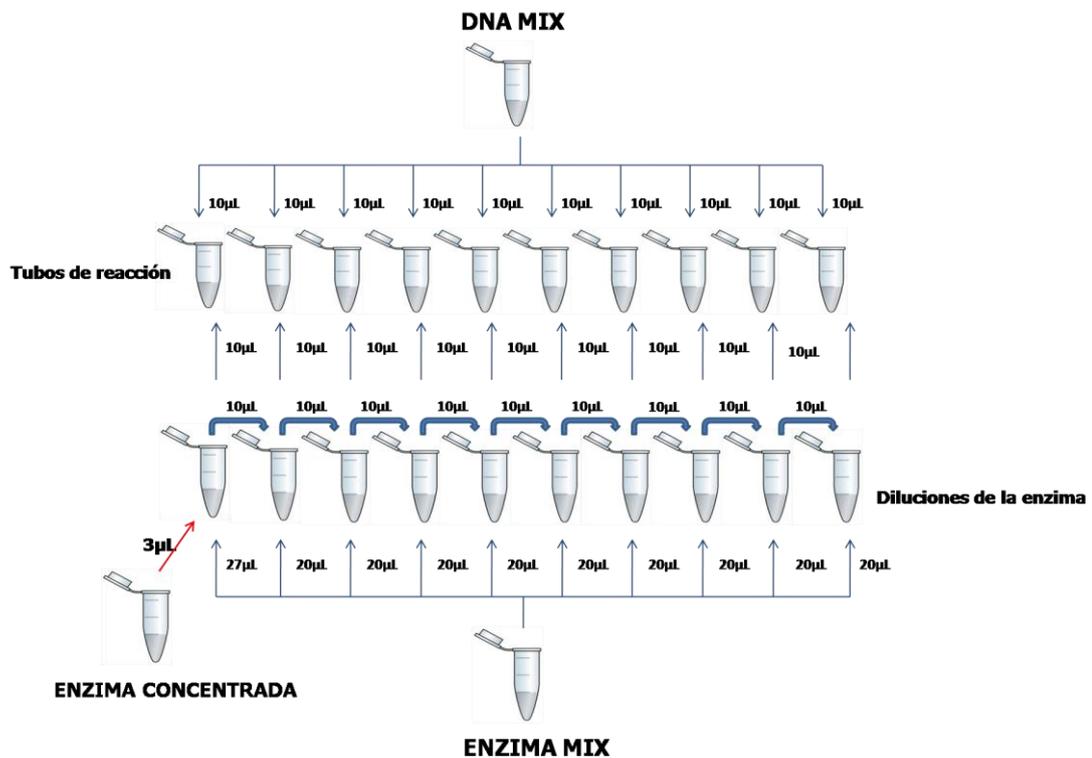


Fig. 3.2 Ensayo de cuantificación de actividad de TopIB purificada

Los tubos de reacción se incubaron durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ y transcurrido este tiempo, la reacción fue interrumpida con 1 μL de SDS al 10% y 1 μg de Proteinasa K. La reacción se incubó nuevamente a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h y los topoisómeros se separaron mediante electroforesis (O/N a 30 V) en un gel de agarosa al 1% preparado en TBE. Para su visualización el gel se tiñó durante 20 min en una solución de Bromuro de Etidio a 0,25 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Tabla 3.8 Reactivos, material y equipo.

REACTIVOS/MATERIAL/ EQUIPO	CASA COMERCIAL
KCl	Fisher BioReagent® ChemAlert®
Inhibidores de proteasas	Roche Diagnostics
Resina P11	Whatman International. Ltd
Papel Wathman 3 mm	Whatman International. Ltd
Tubos de centrifuga de 50 mL	Fisher Scientific
EDTA	Prolabo
Columna de purificación	Bio-Rad®
Resina PSP CL-4B	Sigma Aldrich
Bromuro de Etidio	Sigma Aldrich
ØX174 RfI DNA	New England Biolabs
SDS	Sigma Aldrich
Proteinasa K	Sigma Aldrich
Sulfato de Amonio	Sigma Aldrich
Cámara Baed beater	BioSpec Products, Inc.
Bolas de vidrio 0,5 mm	BioSpec Products, Inc.
Tripa de diálisis	Sigma Aldrich
Columnas Amicon Ultra 50K	Nalgene Nunc International
Agarosa	Fisher BioReagent® ChemAlert®
PMSF	Roche Diagnostics

TBE 10X (1L): Tris Base 108 g, ác. Bórico 55 g, 40 mL de EDTA 0,5 M a pH 8 en 960 mL de H₂O. Autoclavar.

10X Top Mix: 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 150 mg/mL BSA

3.9. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA RELAJACIÓN

Para determinar la actividad de los inhibidores estudiados sobre la TopIB de *Leishmania* purificada, preparamos una mezcla de ADN superenrollado en el buffer correspondiente:

ADN MIX	Volumen
RfI ADN (0,5 µg)	10,9 µL
10X Top Mix	14,5 µL
3 M KCl	3,34 µL
H ₂ Odd	101,86 µL
Total	130,6 µL

Los inhibidores y los disolventes en los que son presentados, fueron incubados en hielo durante 20 min, en presencia de la topoisomerasa. Transcurrido este tiempo, el ADN superenrollado fue expuesto al inhibidor y al disolvente en un bloque seco a 37 °C y la reacción fue detenida a diferentes tiempos por la adición de una mezcla formada por SDS y azul de carga.

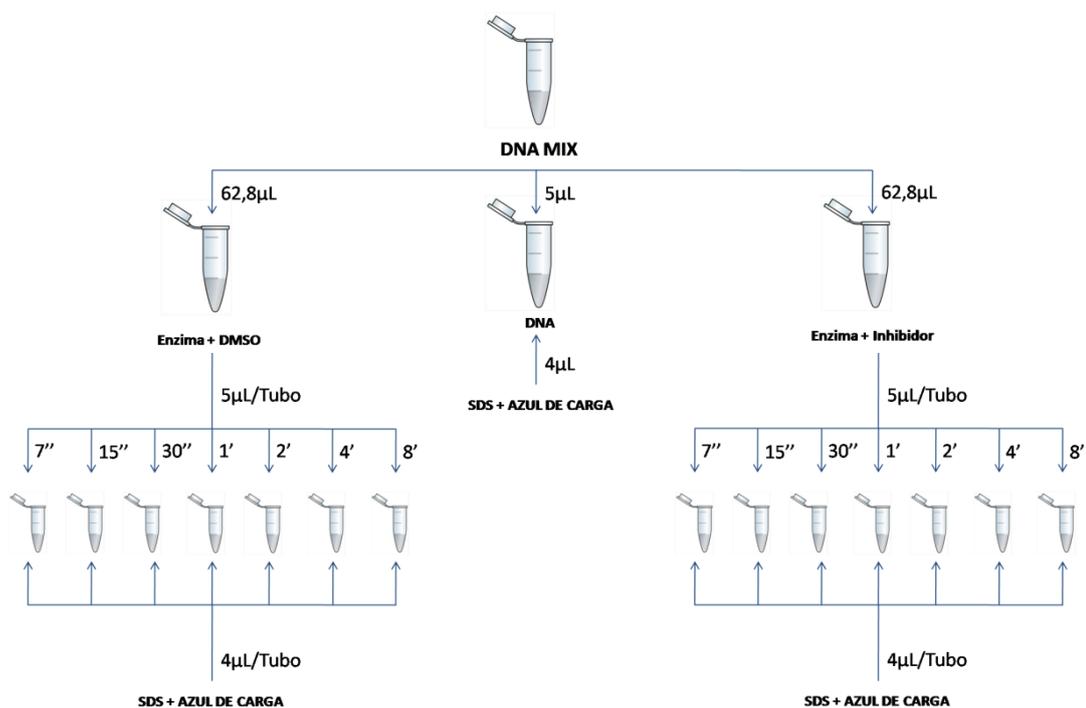


Fig. 3.3 Ensayo de inhibición de la relajación del ADN.

La reacción se aplicó a un gel de agarosa al 1% preparado con TBE que fue sometido a electroforesis O/N a 25 V. Para su visualización, el gel fue teñido durante 20 min con una solución de Bromuro de Etidio a 0,25 µg/L.

3.10. DETECCIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES TOPOISOMERASA-DNA EN CULTIVOS DE PROMASTIGOTES

En este ensayo, realizamos una precipitación selectiva de los complejos covalentes formados entre la ADN Top y el ADN por la acción de determinados inhibidores de ésta. Dichos inhibidores estabilizan el complejo de escisión e impiden el sellado de la brecha abierta en el material genético y por tanto, su posterior religación. Para ello se utilizó un método de precipitación dependiente de K⁺ y SDS. El SDS es un detergente capaz de disociar las interacciones no covalentes enzima-ADN favoreciendo la precipitación de los complejos covalentes en presencia de KCl, pero no la del ADN libre.

Se prepararon cultivos de promastigotes a una densidad de 10⁶ parásitos/mL en medio M199 1X suplementado con FBS al 10%. Dichos cultivos se incubaron a 26 °C en aireación durante 24-72 h en presencia de 0,04 µCi/mL de Timidina [2-¹⁴C] (53 mCi/mmol). Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con medio, centrifugándose a 3.000 r.p.m. durante 10 min y se resuspendieron en el volumen inicial de medio fresco. Transcurridas 3 h de recuperación, las células se sembraron en medio fresco sin FBS y se expusieron alícuotas de 1 mL a varias concentraciones del inhibidor, incubándose a 26 °C durante 30-45 min. En cada experimento, dos alícuotas no fueron expuestas al inhibidor, para calcular el ADN total que había sido marcado y se prepararon controles con el disolvente en el que se presentan los inhibidores (DMSO o ddH₂O).

3.10.1. Cálculo del ADN total marcado

Las células no tratadas con el inhibidor, fueron centrifugadas a 3.500 r.p.m. durante 5 min y lisadas con 500 µL de TCA al 5%. El lisado se aplicó a filtros Whatman® de 3 mm, previamente humedecidos con PBS. Posteriormente, los filtros se lavaron con 5 mL de PBS. Colocamos cada filtro en un vial de

centelleo y una vez secos, añadimos líquido de centelleo para su análisis en un detector Packard.

3.10.2. Detección de complejos de cleavage

Las distintas alícuotas se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 5 min y se resuspendieron en 1 mL de solución de lisis (Tabla 3.10) precalentada en un baño a 65 °C. Tras incubar las muestras durante 10 min en un baño a esa misma temperatura, se detuvo el proceso de lisis celular añadiendo KCl frío hasta una concentración de 65 mM. Las suspensiones se agitaron vigorosamente en vórtex durante 10 s, para asegurar que la fragmentación del ADN sea reproducible y uniforme. Las muestras se incubaron 1 h en hielo permitiendo la precipitación de los complejos covalentes. Para recuperar estos complejos, se utilizaron filtros Whatman® de 25 mm de fibra de vidrio. Todas las soluciones utilizadas se atemperaron a 4 °C antes de realizar el ensayo.

Después de humedecer los filtros con solución de lavado (Tabla 3.10), se añadieron las muestras previamente resuspendidas para mezclar las dos fases formadas durante la precipitación. Se lavaron los filtros 5 veces con 5 mL de solución de lavado cada vez. Para fijar los complejos covalentes a los filtros, se realizaron dos lavados con 10 mL de etanol al 95% y dos más con 10 mL de etanol al 70%. Los filtros se colocaron en tubos de centelleo hasta la evaporación del etanol. Una vez secos, se añadieron 10 mL de líquido de centelleo (Tabla 3.9) y se analizaron en un detector en fase líquida Packard.

La siguiente fórmula se aplicó a los datos obtenidos tras el análisis con el contador de centelleo, para calcular el porcentaje de formación de complejos de cleavage:

$$\frac{dpm \text{ muestra} - dpm \text{ control}}{dpm \text{ DNA total}}$$

Tabla 3.9 Medios, reactivos, material y equipo.

MEDIOS/REACTIVOS	CASA COMERCIAL
Timidina [2- ¹⁴ C]	Amhersan GE Healthcare
Dimetilsulfóxido DMSO	Sigma-Aldrich, Madrid, España
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, Madrid, España
TCA (Ácido tricloracético)	Merck, Darmstadt, Alemania
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Sigma-Aldrich, Madrid, España
DNA de esperma de salmón	Sigma-Aldrich, Madrid, España
EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)	Prolabo
Tris (Trizma® Base)	Sigma-Aldrich, Madrid, España
HCl (ácido clorhídrico)	Merck, Darmstadt, Alemania
KCl (cloruro potásico)	Fisher Bioreagent
Etanol	Prolabo
Líquido de centelleo (Optiphase "Hisafe 3")	Perkin Elmer, U.S.A.
MATERIAL/ EQUIPO	CASA COMERCIAL
Wathman® glass microfiber filters 25 mm	Sigma-Aldrich, Madrid, España
Wathman® glass microfiber GRADE 3 mm	Wathman, Inglaterra.
Frascos de cultivo de 75 cm ²	Thermo Scientific, Nunc. Fisher Scientific, Madrid, España.
Centrífuga 5415 R (con refrigeración)	Eppendorf Ibérica, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España.
Centrífuga 5702 R	Eppendorf Ibérica, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España.
Tubos de centelleo	Kartell
Colector de filtros (1225 Sampling Manifold)	Millipore, Madrid, España.
Detector de centelleo en fase líquida	Packard

Tabla 3.10 Buffers utilizados en el ensayo de detección de complejos enzima-ADN

BUFFERS	
BUFFER DE LISIS	12,5 mL SDS 10%; 4 mL ADN de esperma de salmón (Deoxyribonucleic acid sodium salt, type XIV. from herring testes) a 10 mg/mL; 1 mL EDTA 0,5 M pH 8.
BUFFER DE LAVADO	10 mL de Tris HCl pH 8 1 M; 10 mL ADN de esperma de salmón (Deoxyribonucleic acid sodium salt, type XIV. from herring testes) a 10 mg/mL; 7,45 g de KCl 1 M; 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8.

3.11. EXTRACCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES

Para la extracción de macrófagos se utilizaron ratones Balb/C de entre 8 y 10 semanas, adquiridos en el animalario de la ULE. 48 h antes de la extracción, los animales fueron intraperitonealmente inyectados con 2 mL de una solución estéril de almidón al 2% en agua. Tras el sacrificio, los macrófagos se extrajeron mediante lavado intraperitoneal con medio RPMI no suplementado y refrigerado. Los macrófagos recuperados se centrifugaron a 2.000 r.p.m. durante 10 min y se resuspendieron en medio RPMI suplementado al 10% con FBS y precalentado en un baño a 37 °C. Después de contarlos en cámara de Neubauer, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

3.12. CÁLCULO DE LA IC₅₀

La IC₅₀ se define como la concentración de compuesto que reduce el número de células en un 50%, cuando el cultivo en ausencia del mismo alcanza la fase logarítmica tardía del crecimiento.

3.12.1. Citotoxicidad en cultivos de promastigotes de cepas salvajes de *Leishmania*

Se prepararon cultivos de las distintas cepas de promastigotes en medio M199 1X suplementado con el 10% de FBS a una densidad de 10⁶ parásitos/mL y se repartieron en frascos de 75 cm² (Tabla 3.11) en volúmenes de 4 mL cada uno, que fueron expuestos a diferentes concentraciones del compuesto. Los

cultivos se incubaron a 26 °C en agitación y se realizaron contajes a distintos tiempos utilizando un contador de células Beckman Coulter® Z1 (Tabla 3.11).

3.12.2. Citotoxicidad en cultivos de promastigotes de cepas transformadas de *Leishmania*

Los ensayos de proliferación de cepas transformadas se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo negro (Tabla 3.11). Se iniciaron cultivos en medio M199 1X suplementado con el 10% de FBS a una densidad de 10^6 parásitos/mL. De estos, se dispusieron alícuotas de 200 μ L por pocillo y se expusieron a diferentes concentraciones del inhibidor incubándose a 26 °C. Posteriormente, se procedió a la lectura de la señal emitida, procedente únicamente a las células viables, en un lector multimodal de placas Synergy HT (Tabla 3.11).

3.12.3. Citotoxicidad en cultivos de macrófagos Raw 264.7 y peritoneales murinos

Los macrófagos sembrados en placas de 96 pocillos se expusieron a distintas concentraciones de inhibidor durante diferentes tiempos. Para determinar la viabilidad de estas células utilizamos un indicador de crecimiento de óxido-reducción (azul alamar, tabla 3.11), que contiene Resazurin (7-Hidroxi-3H-fenoxazin-3-on 10-óxido). Las células se incubaron durante 4 h a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO₂ y con un 20% de resazurin. El tiempo de incubación permite a las células reducir este compuesto a otro producto que emite fluorescencia a 290 nm, el Resofurin (Fig. 3.4). 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, la señal emitida se detecta con un lector multimodal de placas Synergy HT (Tabla 3.11)

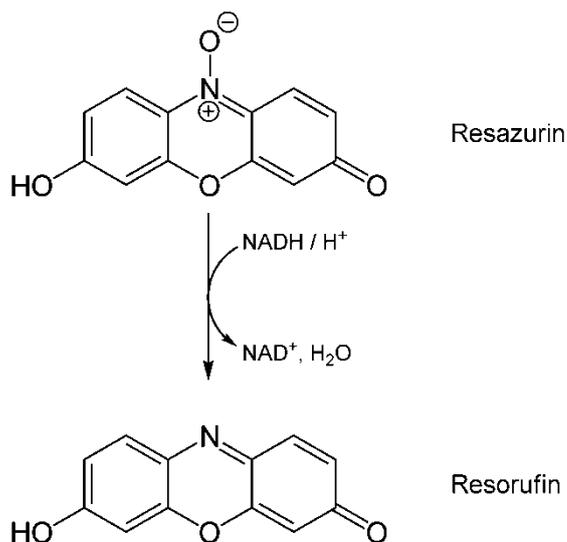


Fig. 3.4 Transformación de Resazurin a Resorufin, que emite fluorescencia a 290 nm, por la actividad metabólica de las células.

Tabla 3 .11 Reactivos, medios, equipos y material.

MEDIOS/REACTIVOS	CASA COMERCIAL
M199	Sigma-Aldrich, Fluka.
FBS (Suero Fetal Bovino)	Gibco
Almidón Soluble	Sigma-Aldrich, Fluka.
Azul Alamar (CellTiter-Blue® Cell viability assay)	Promega Biotech Ibérica.
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, Fluka.
Trypsin 10X	Sigma-Aldrich, Fluka.
SDS (Dodecilsulfato sódico)	Sigma-Aldrich.
Isopropanol	Prolabo, Merck.
MTT(7-Hidroxy-3H-phenoxazin-3-one) 10-oxide	Sigma-Aldrich.
MATERIAL/ EQUIPO	CASA COMERCIAL
Frascos EasyYFlask™ 75 cm ²	Thermo Scientific, Nunc. Fisher Scientific.
Placas microtitulación 96 pocillos fondo negro 96 MicroWell™Plates	Thermo Scientific, Nunc. Fisher Scientific.
Placas microtitulación 96 pocillos fondo transparente 96 MicroWell™Plates	Thermo Scientific, Nunc. Fisher Scientific.
Jeringas de 10 mL y 2 mL	Terumo.

Agujas de 18G Agujas de 23G	Terumo, Alcalá de Henares.
Contador de células y partículas (cell and particle Counter)	Beckman Coulter Z1
Lector Multi-Modal de microplacas Synergy HT	BioTek
Incubador 26°C	Heraeus Instruments.
Incubador 37°C (Direct Heat CO ₂ Incubator)	Thermo Scientific, Fisher Scientific.
Agitador móvil (orbital shaker)	Thermolyne

3.13. INFECCIÓN *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS PERITONEALES CON AMASTIGOTES AXÉNICOS DE *L. pifanoi*

Para comprobar el efecto de los inhibidores de la Top IB sobre un modelo de infección *in vitro*, seguimos una modificación del método de Neal y Croft (Neal S.L. Y Croft R.A., 1984). Los macrófagos peritoneales extraídos de ratones Balb/C se repartieron en placas LabTeck® tratadas de 8 pocillos (Tabla 3.12), a una densidad de 50.000 células por pocillo y se incubaron O/N a 37 °C y 5% de CO₂ para facilitar su adherencia. El cultivo de amastigotes axénicos en fase estacionaria fue centrifugado a 3.500 r.p.m. durante 10 min y lavado dos veces en la mitad de volumen con PBS. Posteriormente, los parásitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 a la densidad necesaria para exponer a los macrófagos a una proporción de 5 amastigotes por macrófago. Los LabTeck® fueron incubados a 32 °C y 5% de CO₂ durante 4 h para permitir la entrada de los parásitos en las células de mamífero. Transcurrido ese tiempo, se retiraron los parásitos que no habían internalizado lavando 5 veces los pocillos con medio RPMI 1640 precalentado a 37 °C, tras lo cual, la infección fue expuesta a diferentes concentraciones del inhibidor durante 48 h. Para la observación de los parásitos internalizados, los pocillos que contenían células infectadas se fijaron con metanol durante 5 min y se dejaron secar al aire para ser teñidas con Giemsa (Tabla 3.12) durante 20 min. El exceso de colorante se eliminó lavando los pocillos 5 veces con PBS.

Tras fijar las preparaciones con metanol y teñirlas con Giemsa, se determinó el porcentaje de infección y el número de amastigotes por célula mediante la

observación de al menos 300 macrófagos por pocillo, en un microscopio óptico con lente de inmersión (40X).

Tabla 3.12 Medios, Reactivos, material y equipo.

MEDIOS/REACTIVOS	CASA COMERCIAL
PBS	Sigma Aldrich
RPMI 1640	Sigma Aldrich
Metanol	Merck
Giemsa	Merck
MATERIAL/EQUIPO	CASA COMERCIAL
LabTeck® tratados de 8 pocillos	Thermo Scientific, Nunc. Fisher Scientific.
Incubador 37 °C (Direct Heat CO ₂ Incubator)	Thermo Scientific, Fisher Scientific.
Microscopio óptico de lente de inmersión	Olympus

3.14. INFECCIONES EXPERIMENTALES

Se utilizó una cepa de *L. infantum* JPC para realizar infecciones experimentales en ratones Balb/C con el fin de reproducir un cuadro de LV y evaluar el efecto terapéutico de las dos indenoisoquinolinas seleccionadas en la memoria. Se establecieron cuatro grupos de animales (5 animales/grupo) que fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola con un inóculo infectivo de 10^7 promastigotes estacionarios (recuperados 7 días después de iniciar el subcultivo) en 100 µL de PBS. En todos los casos, los animales fueron previamente anestesiados con anestesia gaseosa de isofluorano. Las indenoisoquinolinas utilizadas se prepararon a una concentración de 20 mg/mL en DMSO y 14 días después de la infección los animales recibieron siete dosis de tratamiento, administrado por vía intraperitoneal, en días alternos. El grupo control fue tratado con el vehículo en el que se presentan los principios activos que se iban a evaluar, es decir, con 5 µL/dosis de DMSO en un volumen total de 500 µL de PBS. A los animales del grupo 1 se les administró 2,5 µL/dosis de MNR 2-50 en un volumen total de 500 µL de PBS (50 µg de compuesto por ratón). Los animales del grupo 2, tratados con AM1355, se repartieron en dos subgrupos de acuerdo a la concentración de indenosioquinolina que contenía la dosis recibida durante el tratamiento: 2,5 µL/dosis o 5 µL/dosis de AM1355 (50 o

100 µg de compuesto por ratón respectivamente) en un volumen total de 500 µL de PBS.

5 días después de finalizar el tratamiento los animales se sacrificaron por dislocación cervical para proceder a la extracción del bazo y el hígado y determinar la carga parasitaria de los mismos utilizando el método de la dilución límite (Carrión y col., 2006).

Estos ensayos han sido realizados enteramente por el equipo del Dr. José María Requena en la plataforma de experimentación animal, que se ha establecido en el CBM "Severo Ochoa" CSIC-UAM de Madrid perteneciente a la Red de Grupos RICET (Red de Investigación Cooperativa de Enfermedades Tropicales) subvencionada por el ISCIII. Esta plataforma posee un laboratorio P2 adecuado para trabajar con este agente infeccioso. Para realizar el ensayo se eligieron ratones Balb/C y no otra especie alternativa (cricetos) que pueda desarrollar igualmente la enfermedad, por el tamaño (la disponibilidad de compuestos es muchas veces comprometida) y la reproducibilidad de los experimentos. Todos estos ensayos se realizaron de acuerdo a los criterios recogidos en el RD 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los inhibidores de clase I de las Top IB estabilizan el complejo enzima-ADN que ralentiza o imposibilita el paso de religación del ADN previamente mellado. La formación de complejos enzima-ADN estabilizados por la CPT y sus análogos, no es intrínsecamente citotóxico sino que es el paso previo a la interferencia con el avance de la horquilla de replicación del ADN, provocando la transición de las rupturas de cadena sencilla (SSB) a roturas de cadena doble (DSB), potencialmente letales si no se regenera la integridad de la doble hélice por los mecanismos de reparación celulares. Todo ello conduce a la interrupción del ciclo celular en fase G2 y posteriormente a la muerte de la célula. En levaduras se ha comprobado que en los mutantes en *rad52* y otros genes implicados en la reparación por recombinación homóloga, tienen aumentada su susceptibilidad a estos fármacos entre 10 y 100 veces, con respecto a las cepas salvajes (Alessandri, M. y col., 2004).

Los venenos de las Top I producen parada del ciclo celular y pueden provocar apoptosis por un mecanismo intrínseco ligado a la caída del potencial de membrana mitocondrial, liberación del citocromo C del espacio intermembranoso de la mitocondria y formación del apoptosoma unido a la activación de la procaspasa 9 (Khon, K.W. y col., 2000).

Los venenos de la TopI son potenciales fármacos antitumorales. La CPT se utilizó como antitumoral a finales de los años ochenta del siglo anterior pero con un escaso margen terapéutico y problemas galénicos que dificultaban su administración (D'arpa & Liu, 19899). En cualquier caso, los estudios pre-clínicos *in vitro* demostraban un extraordinario potencial antiproliferativo ante una amplia gama de células tumorales en el rango submicromolar. Fue el primer compuesto que se describió como inhibidor específico de la TopIB de células eucarióticas, sin efecto sobre la TopIA de bacterias y otros procariontes y con un mecanismo de acción perfectamente definido tras la caracterización de los cristales obtenidos con la enzima humana y un oligonucleótido de doble cadena de ADN (Champoux, 2000). Uno de los inconvenientes de la CPT como fármaco es un elevado carácter lipofílico y su inestabilidad en soluciones

acuosas. Desde un punto de vista galénico, la CPT debe ser administrada con un solvente aprótico polar como el DMSO, con todos los inconvenientes que eso conlleva. Además un segundo problema de la CPT es la presencia de un anillo de lactona terminal que la hace inestable en soluciones acuosas, produciéndose la hidrólisis no enzimática y dependiente del pH para formar un anillo hidrocarboxílico que es menos potente inhibiendo las TopIB. Así a pHs neutros o básicos, el equilibrio se desplaza hacia las especies menos activas, mientras que a pHs más ácidos se favorece la formación de la lactona con mayor potencia inhibitoria (Fig. 4.1).

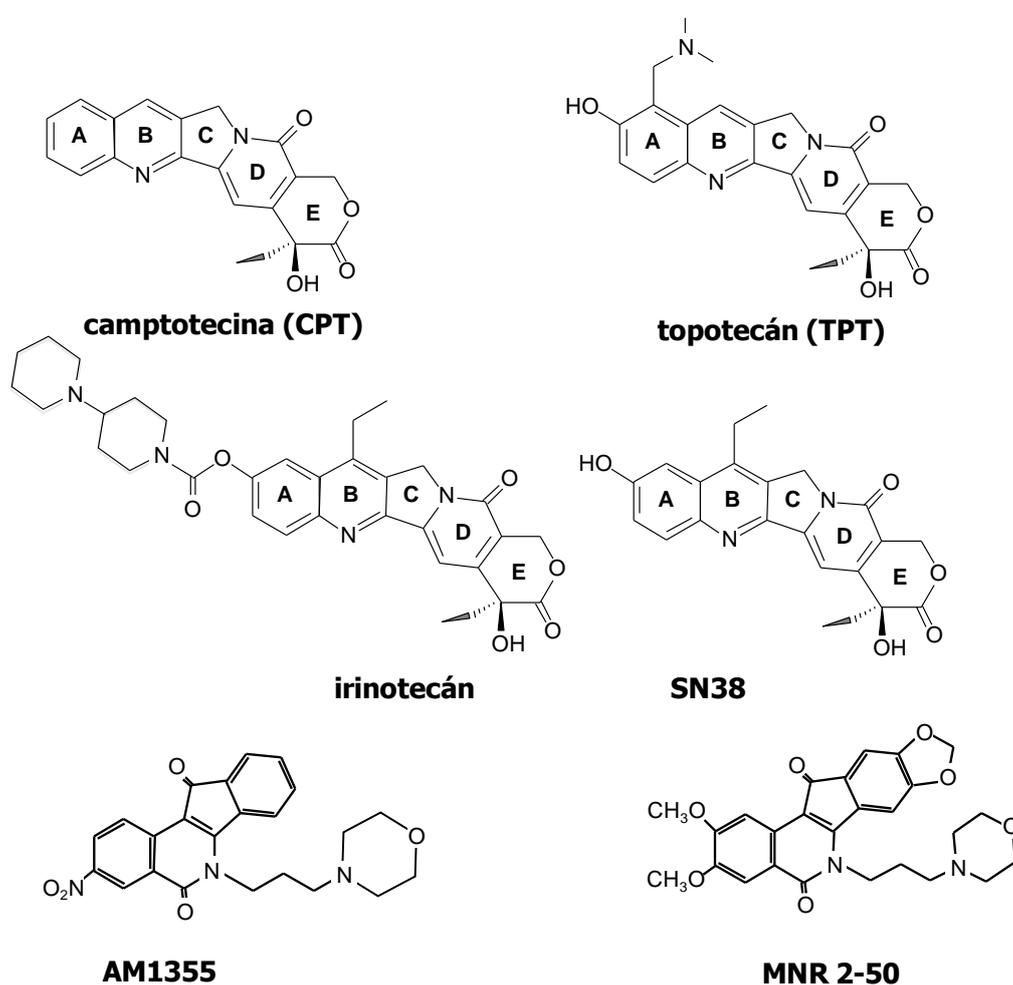


Fig. 4.1 Estructura química de los inhibidores de TopIB utilizados en la memoria.

El topotecán (TPT) y el SN38 (principio activo del pro-fármaco irinotecán) (Fig. 4.1), son dos derivados hidrosolubles introducidos en los años 90 en la quimioterapia de tumores sólidos y con uso clínico en la actualidad en clínica humana. Desde un punto de vista galénico, el TPT y el irinotecán pueden ser administrados por vía oral y/o endovenosa y en el caso del irinotecán debe ser activado metabólicamente por hidrólisis a SN38, un compuesto liposoluble, que es el inhibidor efectivo de la TopIB (Fig. 1.12).

Las posibilidades de estos compuestos en la lucha antiparasitaria fueron ya puestas de manifiesto por el grupo de la Dra. Shapiro en los años 90, cuando aún no se había descrito la TopIB de ningún protozoo parásito (Bodley y Shapiro, 1995), y posteriormente por el grupo del Dr. Majumder (Das y col., 2004) y el nuestro a principios de este siglo, cuando se caracterizaron las enzimas de leishmanias y trypanosomas africanos mostrando su peculiar estructura de dos subunidades heterólogas (Balaña-Fouce y col., 2006). La novedosa estructura de estas enzimas con respecto a sus homólogas de mamíferos, hizo pensar en ellas como una diana única de intervención terapéutica en la que nuevos inhibidores fueran dirigidos hacia la enzima heterodimérica del parásito y no hacia la monomérica del hospedador. Sin embargo, los estudios posteriores de mutagénesis dirigida sobre los aa del centro activo, mostraban un alto grado de conservación filogenética a pesar de estar repartidos entre los dos protómeros que constituyen la enzima del parásito. Así, el denominado pentámero catalítico del centro activo de la enzima humana constituido por los aa Arg 488 y Arg 590, His 632, Lys 532 y Tyr 723, que es el aminoácido responsable de romper el ADN por ataque nucleofílico, está conservado y adopta las mismas posiciones espaciales que los aminoácidos Arg 314 y 410, His 453, Lys 352 (de la subunidad grande) y Tyr 222 (de la subunidad pequeña) en *Leishmania* y otros tripanosomátidos (Díaz-González y col., 2008).

Este alto grado de conservación de los aa catalíticos hace pensar que la CPT y sus derivados tendrán un efecto semejante sobre la TopIB de *Leishmania* y que su potencial terapéutico, si lo hubieran, sería debido más al grado de expresión y funcionamiento de la enzima durante la rápida proliferación del parásito que a otras diferencias cinéticas con la enzima del hospedador.

Con estas premisas, hemos realizado un cribado de varios inhibidores de la TopIB (Fig. 4.1) en tres especies de *Leishmania*: *L. major*, agente etiológico de la LC en el Viejo Mundo, *L. donovani*, la especie responsable de la LV y por último *L. infantum*, especie endémica en el suroeste europeo y más concretamente en España, responsable de la leishmaniosis canina en nuestro país, de los casos subclínicos de leishmaniosis críptica y de los casos de leishmaniosis ligadas a inmunosupresión asociados al VIH. *L. infantum* produce lesiones en el lugar de la picadura que evolucionan hacia LV, en muchos casos grave para humanos y letal o incurable para perros.

Hemos demostrado que los efectos citotóxicos son debidos a la inhibición de la TopIB y la producción de complejos de enzima-ADN responsables de la muerte del parásito. Además hemos introducido dos cepas modificadas genéticamente que expresan proteínas reporteras fluorescentes, como posibles alternativas para realizar rápidos cribados de citotoxicidad en *Leishmania*.

Por último, dos indenoisoquinolinas, AM1355 Y MNR 2-50 (Fig. 4.1), compuestos con un marcado índice terapéutico en macrófagos murinos, fueron utilizadas en un ensayo preclínico *in vivo* con ratones Balb/C infectados con *L. infantum*, demostrando una gran potencialidad como nuevos fármacos leishmanicidas.

4.1. EFECTO DE LOS VENENOS DE LA TopIB FRENTE A PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA

4.1.1. Efecto de venenos de la TopIB frente a promastigotes de *L. major*

Los compuestos utilizados en los ensayos fueron la CPT, sus derivados hidrosolubles (TPT, irinotecán y el metabolito activo de este último, SN38), dos indenoisoquinolinas (AM1355 y MNR 2-50) sintetizadas en el laboratorio del Dr. Marks Cushman y cedidas por el Dr. Yves Pommier del departamento de Medical Chemistry en el NIH Bethesda Ma (E.E.U.U.) y como control positivo la paromomicina y la miltefosina, dos fármacos de última generación que están en este momento en fase clínica frente a la leishmaniosis.

Las gráficas de la Fig. 4.2 muestran los ensayos dosis-respuesta realizados con los diferentes compuestos a concentraciones variables (adaptadas después de estudios preliminares no mostrados) determinadas por recuento con un contador Coulter y representadas mediante el programa de ajustes no lineales SigmaPlot[®], después de periodos de exposición de 48, 72 y 96 h con cada principio activo. Las gráficas muestran los valores medios, con sus correspondientes errores estándar, de al menos tres experimentos diferentes realizados por triplicado. Los valores de IC₅₀ obtenidos aparecen en la Tabla 4.1.

En una primera aproximación, se puede observar el mayor potencial citotóxico de los venenos de la TopIB (con la excepción del irinotecán) respecto a los dos fármacos leishmanicidas tomados como referencia. Los valores de IC₅₀ para CPT, TPT y SN38 estuvieron en el rango de 0,37 a 12,22 μM y en el caso de las indenoisoquinolinas estuvieron por debajo de 1,14 μM. Esto contrasta con la miltefosina y la paromomicina, cuyas IC₅₀ fueron 26,13 μM y 22,47 μM respectivamente. El escaso poder citotóxico del irinotecán (IC₅₀ entre 60,97 y 282,45 μM) fue debido a su naturaleza de pro-fármaco. El irinotecán debe ser transformado metabólicamente por la célula en SN38 (auténtico principio activo) para que tenga actividad antiproliferativa. Es notorio cómo este compuesto va perdiendo actividad según va pasando el tiempo, de manera que tuvo su mayor potencia a las 48 h (IC₅₀=60,97 μM) y la fue perdiendo paulatinamente hasta las 96 h. En este caso, no parece que haya una metabolización por parte del parásito que vaya generando más SN38, y la pérdida de potencia puede deberse a que las condiciones del medio de cultivo vayan formando la estructura hidrocarboxílica del anillo E en una forma menos activa. No hubo diferencias notorias en las IC₅₀ del TPT, CPT ni SN38 con el tiempo. La mayor potencia de las dos indenoisoquinolinas, las hizo candidatas para ensayos posteriores *in vitro* e *in vivo* ya que demostraban una potencia inhibitoria inusual para estos compuestos por debajo incluso de 0,1 μM (MNR 2-50).

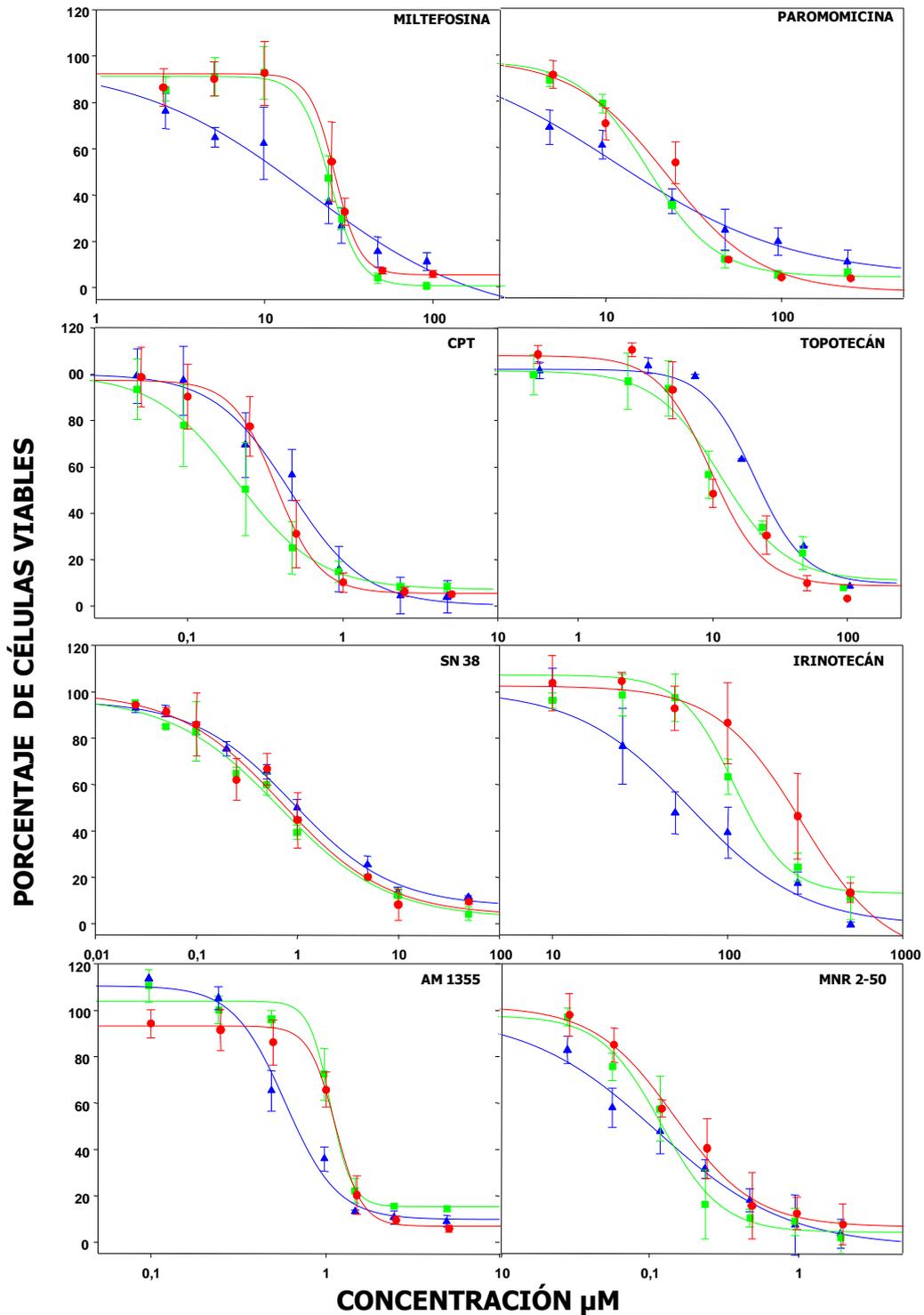


Fig. 4.2 Citotoxicidad de los inhibidores de TopIB en promastigotes de *L. major*. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a ▲ 48, ■ 72 y ● 96 h de exposición. Cada curva corresponde a los valores medios obtenidos, con sus correspondientes errores estándar, de tres determinaciones realizadas por separado.

Tabla 4.1 Cálculo de las IC₅₀ a las 48, 72 y 96 h de los compuestos seleccionados en promastigotes de *L. major*. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.2, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®.

<i>L. major</i>	48 h	72 h	96 h
MILTEFOSINA	13,95 µM± 6,22	25,49 µM± 0,77	26,13 µM± 0,97
PAROMOMICINA	11,97 µM± 2,38	18,16 µM± 1,08	22,47 µM± 5,40
CAMPTOTECINA	0,48 µM± 0,07	0,37 µM± 0,01	0,37 µM± 0,02
TOPOTECÁN	10,16 µM± 1,12	12,22 µM± 2,44	9,62 µM± 1,77
SN 38	0,91 µM± 0,11	0,50 µM± 0,11	0,70 µM± 0,20
IRINOTECÁN	60,97 µM± 15,16	108,17 µM± 20,21	282,45 µM± 17,50
AM1355	0,59 µM± 0,08	1,08 µM± 0,04	1,13 µM± 0,04
MNR 2-50	0,11 µM± 0,02	0,12 µM± 0,01	0,14 µM± 0,01

4.1.2. Efecto de los venenos de TopIB sobre promastigotes de *L. infantum*

Los promastigotes de *L. infantum* crecidos en las mismas condiciones que sus homólogos de *L. major* y *L. donovani*, fueron expuestos a diferentes concentraciones de venenos de TopIB (decididas mediante experimentos de aproximación previos que no se muestran en la memoria) durante periodos de 48, 72 y 96 h. En estos ensayos el número de células fue determinado mediante contador Coulter y las curvas obtenidas ajustadas no linealmente para calcular los valores de IC₅₀ en cada tiempo (Fig. 4.3) (Tabla 4.2). Aparte merece la pena destacar el alto valor obtenido para la CPT con respecto a los obtenidos en las otras cepas de *Leishmania* estudiados (IC₅₀ entre 1,12 µM y 2,78 µM), a diferencia del TPT y sobre todo el SN38 cuyos valores de IC₅₀ fueron 10,86 µM y 0,69 µM respectivamente. De la misma manera que en los casos anteriores, el irinotecán tuvo un pobre comportamiento citotóxico (IC₅₀ >200 µM).

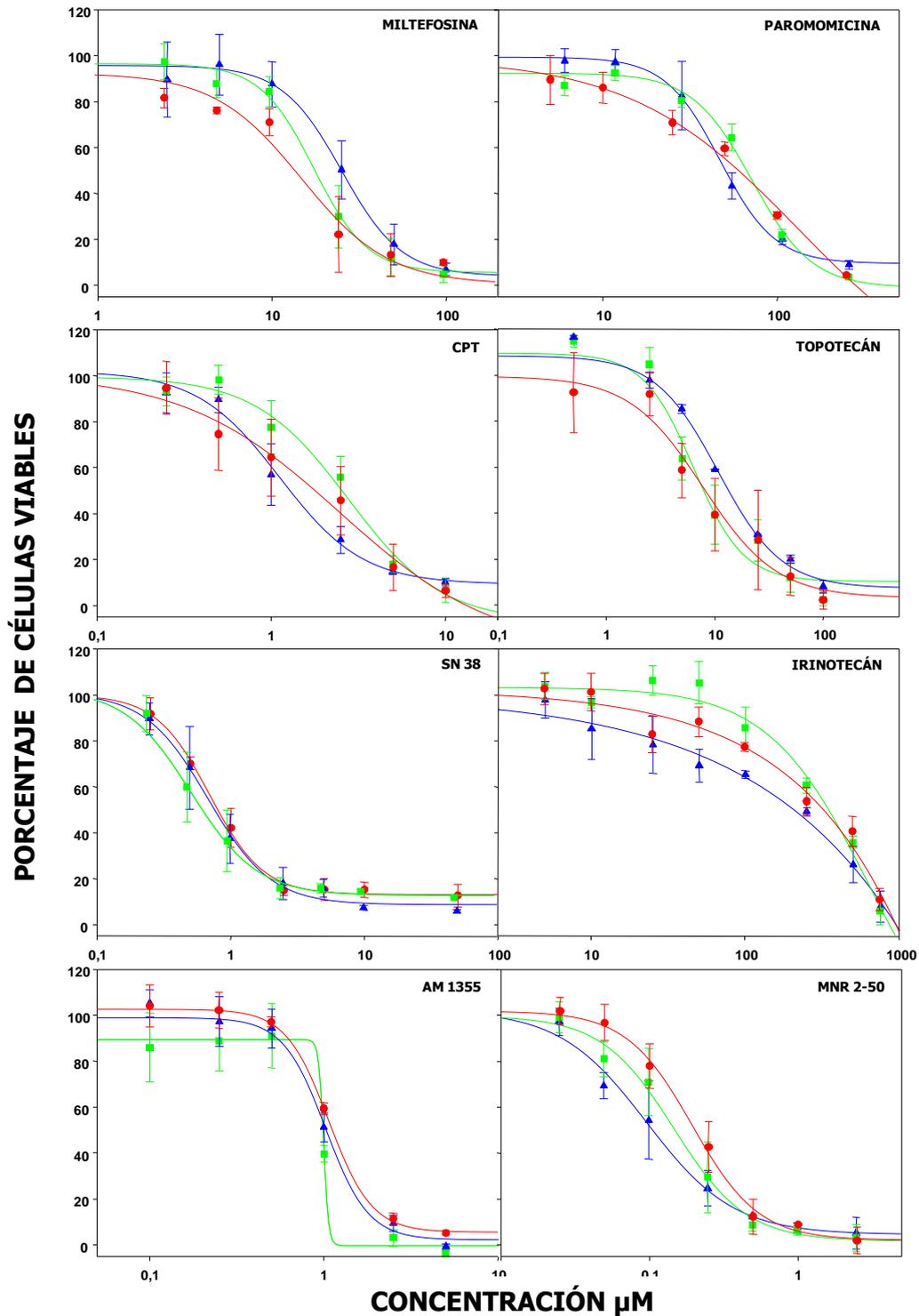


Fig. 4.3 Citotoxicidad de los inhibidores de la TopIB en promastigotes de *L. infantum*. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a \blacktriangle 48, \blacksquare 72 y \bullet 96 h de exposición. Cada curva corresponde a los valores medios con sus correspondientes errores estándar obtenidos de tres determinaciones realizadas por separado.

La potencia inhibidora de las indenoisoquinolinas fue igualmente elevada. La IC₅₀ de AM1355 estuvo próxima a 1 µM (por encima de la obtenida con *L. major* y *L. donovani*), pero MNR 2-50 tuvo una IC₅₀ de 0,19 µM. Estos valores están muy por debajo de los encontrados para los agentes leishmanicidas de referencia, como la miltefosina (IC₅₀ =25,15 µM) y sobre todo la paromomicina (IC₅₀ =133,25 µM).

Tabla 4.2 Cálculo de las IC₅₀ a las 48, 72 y 96 h de los compuestos seleccionados en promastigotes de *L. infantum*. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.3, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®.

<i>L. infantum</i>	48 h	72 h	96 h
MILTEFOSINA	25,15 µM± 2,35	18,05 µM± 1,69	15,37 µM± 4,36
PAROMOMICINA	42,41 µM± 1,65	66,24 µM± 9,09	133,25 µM± 81,02
CAMPTOTECINA	1,12 µM± 0,13	2,78 µM± 0,72	2,47 µM± 1,39
TOPOTECÁN	10,86 µM± 1,64	6,39 µM± 1,47	7,82 µM± 2,29
SN 38	0,68 µM± 0,06	0,53 µM± 0,02	0,69 µM± 0,04
IRINOTECÁN	>200 µM	>200 µM	>200 µM
AM1355	1,02 µM± 0,09	0,99 µM± 0,79	1,06 µM± 0,03
MNR 2-50	0,10 µM± 0,08	0,15 µM± 0,01	0,19 µM± 0,01

4.1.3. Efecto de los inhibidores de la TopIB frente a promastigotes de *L. donovani*

De la misma manera que para *L. major* y *L. infantum*, se determinó la citotoxicidad de los compuestos inhibidores de la Top IB sobre cultivos de promastigotes de *L. donovani* en condiciones semejantes de concentraciones y tiempos, utilizando la miltefosina y la paromomicina como fármacos leishmanicidas de referencia (Fig. 4.4) (Tabla 4.3). Los valores de IC₅₀ para la CPT y el TPT, estuvieron dentro del mismo rango que los obtenidos en *L. major* (1,68 µM para la CPT y 20,32 µM para el TPT), pero las curvas

obtenidas con el SN38 fueron mucho peores, con un valor de IC_{50} muy superior a los obtenidos en la cutánea.

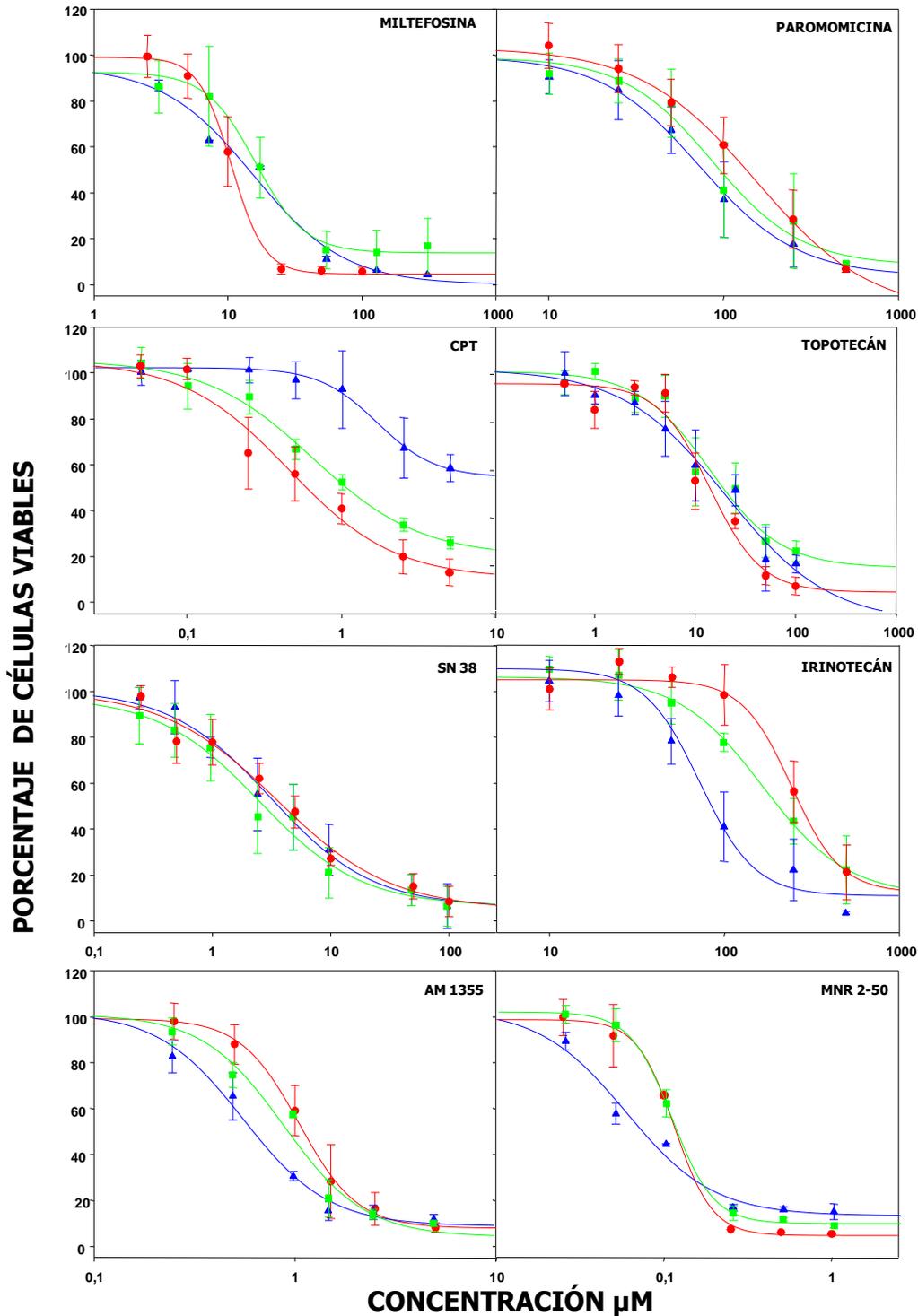


Fig. 4.4 Citotoxicidad de los inhibidores de TopIB en promastigotes de *L. donovani*. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a \blacktriangle 48, \blacksquare 72 y \bullet 96 h de exposición en promastigotes de *L.*

donovani. Cada curva corresponde a los valores medios obtenidos, con sus correspondientes errores estándar, de tres determinaciones realizadas por separado.

Tabla 4.3 Cálculo de las IC₅₀ a las 48, 72 y 96 h de los compuestos seleccionados en promastigotes de *L. donovani*. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.4, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®.

<i>L. donovani</i>	48 h	72 h	96 h
MILTEFOSINA	10,16 µM± 5,32	9,43 µM± 0,84	10,63 µM± 0,32
PAROMOMICINA	72,51 µM± 9,80	85,90 µM± 21,87	152,31µM± 35,16
CAMPTOTECINA	1,68 µM± 0,32	0,66 µM± 0,12	0,47 µM± 0,17
TOPOTECÁN	20,32 µM± 12,32	13,84 µM± 5,24	7,81 µM± 0,26
SN 38	1,93 µM± 1,45	4,04 µM± 6,06	1,60 µM± 2,06
IRINOTECÁN	72,67 µM± 16,32	166,54 µM± 41,53	>200 µM
AM1355	0,56 µM± 0,05	0,88 µM± 0,16	1,05 µM± 0,05
MNR 2-50	0,05 µM± 0,07	0,12 µM± 0,36	0,12 µM± 0,09

De la misma manera, el irinotecán (profármaco del SN38), tuvo una IC₅₀ en el rango de 72,67 - >200 µM, influenciada por el tiempo de incubación, de manera que fue perdiendo actividad leishmanicida según iba transcurriendo el experimento.

Análogamente a lo que ocurre en las dos especies anteriores, las dos indenoisoquinolinas se mostraron como los compuestos más potentes, ambas con IC₅₀ por debajo de 1 µM (0,12 µM para el caso de MNR 2-50). También parecía observarse una pérdida de potencia para los dos compuestos según transcurría el tiempo, que pudo ser debida a la inestabilidad de sus estructuras en el medio acuoso. Todos los inhibidores de la TopIB, con excepción del irinotecán, fueron más potentes sobre los promastigotes de *L. donovani* que los dos fármacos leishmanicidas seleccionados como controles, la miltefosina (IC₅₀ =9,43 - 10,63 µM y la paromomicina IC₅₀ =72,51 - 152,31

μM). Merece la pena indicar que la paromomicina fue significativamente menos potente inhibiendo el crecimiento de los promastigotes de *L. donovani* que de *L. major*, aunque sí se observó una mayor potencia relativa de la miltefosina sobre *L. donovani*.

La CPT es el único de estos compuestos que ha sido estudiado *in vivo*. Proulx y col. (2001), en un ensayo pre-clínico en ratones, observó que tras la administración intraperitoneal de CPT a una dosis de 2,5 mg/kg de peso a ratones infectados con *L. donovani*, se producía una cierta disminución de la carga parasitaria en bazo e hígado, pero nunca se conseguía un aclaramiento eficaz de la infección. El tratamiento mejoraba, aunque sin resultados absolutamente satisfactorios, cuando el principio activo era encapsulado en liposomas que conducían el compuesto hacia los macrófagos infectados.

Nuestros resultados parecen indicar que la CPT previene el crecimiento de los promastigotes de las tres especies después de un periodo de 48 h. Sin embargo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio, apuntan a que el crecimiento de promastigotes de *L. major* tratados con el fármaco puede parar en la fase G2 del ciclo celular y establecer un checkpoint para poder recuperar posteriormente el crecimiento celular detenido (Balaña-Fouce y col; 2008).

No existen sin embargo, resultados con el TPT y el SN38 en la literatura. Nuestros experimentos indican que el TPT fue menos potente que la CPT con valores de IC_{50} aproximadamente 10 veces mayores que las encontradas para ésta. No fue así con el SN38, cuyos resultados en las tres especies, fueron menores que los del TPT y cercanos a los de la CPT. Estos compuestos están actualmente en fase 4 frente a tumores sólidos y no han sido probados frente a una enfermedad originada por patógenos. La mayor actividad proliferativa de las células tumorales y por tanto la mayor expresión de las TopIB, son el objetivo terapéutico de estos fármacos de manera semejante a lo que ocurre en una infección por *Leishmania* u otro protozoo parásito. Las IC_{50} aunque no tan potentes como las de las indenoisoquinolinas, sí les hace atractivos para su mayor estudio preclínico *in vitro*.

4.2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE TOP IB SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Para evaluar la validez de los inhibidores seleccionados en un posible tratamiento de las leishmaniosis, es crítico conocer su toxicidad sobre las células del hospedador. Como las células diana de *Leishmania* spp. a las que va a infectar y sobre las que se va a desarrollar son los macrófagos del hospedador o sus precursores, células monocíticas, hemos realizado un ensayo de citotoxicidad sobre éstas con el fin de conocer los índices terapéuticos que nos indiquen cuales de los compuestos pueden ser idóneos para ensayos preclínicos *in vitro* e *in vivo*. Con este fin, hemos utilizado las líneas de macrófagos murinos Raw 264,7 procedentes de ratones Balb/C de origen tumoral y por lo tanto capaces de proliferar en medio de cultivo. A su vez, hemos obtenido macrófagos peritoneales murinos de ratones a los que habíamos administrado almidón por vía intraperitoneal dos días antes de su sacrificio. A diferencia de los macrófagos Raw 264,7, los macrófagos peritoneales no tienen origen tumoral y no proliferan en las condiciones de cultivo. La diferente procedencia de estas líneas es importante a la hora de interpretar los resultados. Debido a su origen, los macrófagos de la línea Raw 264,7 (aislada a partir de ratones a los que se había inducido un tumor por el virus de la leucemia murina de Abelsan), pueden responder tanto como consecuencia de sus características tumorales adquiridas, como por sus características tegumentarias innatas. No ocurre lo mismo con los macrófagos peritoneales murinos que únicamente responden como células inmunitarias, dianas específicas de la parasitación por *Leishmania* spp.

4.2.1. Efecto de los inhibidores de TopIB sobre los macrófagos Raw 264,7

Los macrófagos Raw 264,7 se cultivaron de forma rutinaria en placas de 96 pocillos con medio completo y las concentraciones de principio activo que se consideraron adecuadas en ensayos previos a los que aparecen en las gráficas de la Fig. 4.5. Después de 48 h de incubación con el compuesto, el porcentaje de supervivencia se determinó mediante el ensayo de azul alamar.

La Tabla 4.4 muestra los valores de IC_{50} obtenidos con las gráficas de la Fig. 4.5. Si nos fijamos en el efecto citotóxico de los inhibidores de la TopIB, CPT, TPT, SN38 y su precursor, el irinotecán, observamos valores de IC_{50} submicromolares para los dos primeros y dentro del rango 11,83 y 36,70 μM respectivamente, para las dos últimas. Merece la pena señalar, que a pesar de que la IC_{50} del SN38 es menor que la del irinotecán, el efecto citotóxico del pro-fármaco es evidente y demuestra que el irinotecán fue metabolizado a SN38 en las primeras 48 h de ensayo por los macrófagos tumorales. Este efecto contrasta con los resultados obtenidos en los promastigotes de las tres especies de *Leishmania*, en los que las diferencias entre fármaco y pro-fármaco fueron mucho mayores, lo que parece indicar que las células parasitarias carecerían de las herramientas para metabolizar el irinotecán.

Por su parte, las indenoisoquinolinas seleccionadas en el estudio, fueron igualmente potentes inhibiendo el crecimiento de los macrófagos tumorales. Sin embargo, cabe destacar el menor efecto del compuesto AM1355 (IC_{50} =8,13 μM) frente a MNR 2-50, cuya IC_{50} estuvo en el rango submicromolar, de una manera semejante a lo que ocurría con los promastigotes de *Leishmania* spp.

Los resultados de los compuestos testados se compararon con los dos leishmanicidas de uso en clínica humana, cuyas gráficas aparecen en los paneles superiores de la Fig. 4.5. La miltefosina inhibe la proliferación de los macrófagos Raw 264,7 dentro del rango micromolar (miltefosina IC_{50} =0,9 μM) valor muy por debajo de los encontrados para las tres especies de *Leishmania*. La paromomicina sin embargo, muestra un efecto citotóxico mucho menor frente a los macrófagos RAW 264,7, con una IC_{50} de 5,70 mM

Estos resultados nos permitieron calcular el índice terapéutico (IT) de todos los compuestos con células Raw 264,7 y las tres especies de *Leishmania* (cociente entre la IC_{50} determinada en el cultivo de macrófagos y la IC_{50} en el parásito a las 48 h de exposición) tal y como aparece reflejado en la Tabla 4.4. Resulta sorprendente no sólo el bajo valor de IT alcanzado por los inhibidores de la TopIB, sino también el de la miltefosina, lo que indicaría un efecto tóxico permanente y un bajo perfil terapéutico para todos ellos. El valor de IT obtenido por la paromomicina resultó ser muy superior (IT_{48h} =476,2 en

L. major), sugiriendo que estamos ante un compuesto con un mejor comportamiento terapéutico. La miltefosina se sintetizó inicialmente como un fármaco antineoplásico (Impávido®) de uso en la clínica de ciertos tumores, lo que explicaría las escasas diferencias de toxicidad entre células RAW 264,7 y promastigotes de *Leishmania*, que comparten la capacidad de crecer rápidamente en cultivos *in vitro* (Eibl, H. & Unger, C., 1990).

Analizando los resultados obtenidos para promastigotes de *L. major* con los inhibidores de TopIB merece la pena mencionar el comportamiento del SN38, ya que este metabolito del irinotecán mostró un IT_{48h} de 12,92 con células RAW 264,7, frente a los valores inferiores a 1 que presentaron CPT y TPT para el mismo parámetro. Este resultado contradice al obtenido para su pro-fármaco cuyo IT_{48h} fue de 0,6, lo que parece indicar que antes de su metabolización, el irinotecán es más tóxico para las células de mamífero que su principio activo.

Dentro de los resultados de toxicidad comparada entre promastigotes de *L. infantum* y macrófagos tumorales murinos RAW 264,7, destacamos el bajo perfil terapéutico de ambas indenoisoquinolinas, con IT_{48h} de 7,96 y 1,84 para AM1355 y MNR 2-50 respectivamente, el efecto selectivo del SN38 (con un valor de $IT_{48h}=17,19$) y la elevada toxicidad del irinotecán que presentaba un valor de 0,18 para este parámetro. El caso de la miltefosina es aún más significativo para los promastigotes de *L. infantum* con un IT_{48h} de 0,03, debido fundamentalmente a la menor potencia del fármaco sobre esta especie. Únicamente la paromomicina se mostró más selectiva ($IT_{48h}=134,4$), presentando un valor alto pero que dista mucho del encontrado para la especie cutánea.

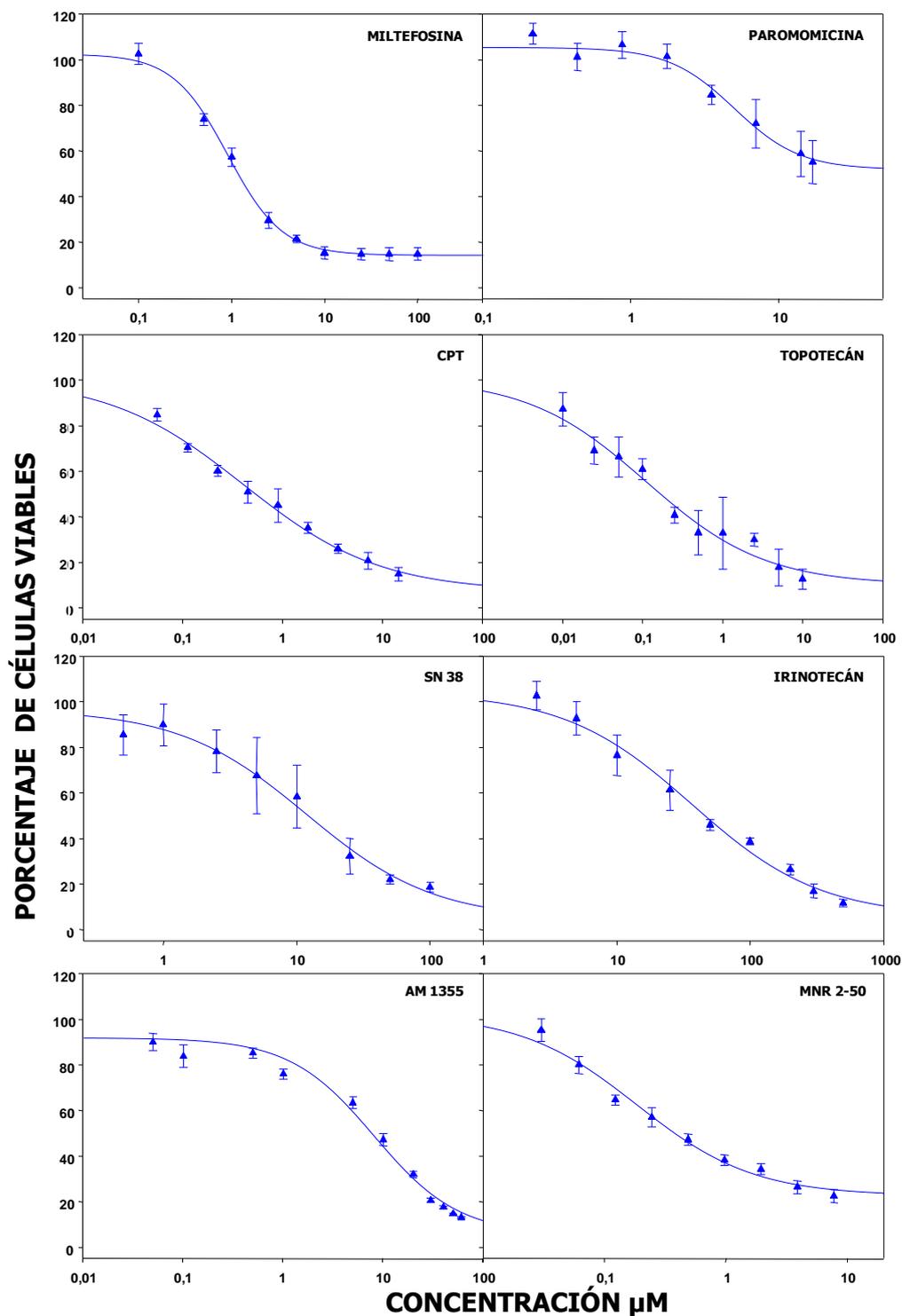


Fig. 4.5 Toxicidad de los inhibidores de TopIB en células de mamífero. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a 48 h en la línea de macrófagos RAW 264,7. Cada curva corresponde a los valores medios obtenidos con sus respectivos errores estándar de tres determinaciones realizadas por separado.

Tabla 4.4 Cálculo de las IC₅₀ a las 48 h de los compuestos seleccionados en células RAW 264,7 y de los valores de IT a las 48 h entre dicha línea celular y los promastigotes de las tres especies *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.5, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®. Los valores de IT son resultado del cociente entre el valor de la IC₅₀ del cultivo de macrófagos RAW 264,7 y el valor de IC₅₀ del cultivo de promastigotes.

	IC₅₀ RAW 264,7 48 h	IT_{48h} <i>L.major</i>	IT_{48h} <i>L.infantum</i>	IT_{48h} <i>L.donovani</i>
MILTEFOSINA	0,90 µM± 0,06	0,06	0,03	0,08
PAROMOMICINA	5,70 mM± 1,36	476,2	134,4	78,6
CAMPTOTECINA	0,41 µM± 0,10	0,85	0,36	0,24
TOPOTECÁN	0,11 µM± 0,04	0,01	0,01	0,05
SN38	11,83 µM± 4,21	12,92	17,19	6,11
IRINOTECÁN	36,70 µM± 9,97	0,60	0,18	0,50
AM1355	8,13 µM± 3,44	13,59	7,96	14,44
MNR2-50	0,18 µM± 0,03	1,60	1,84	3,36

Finalmente, respecto a los valores de IT_{48h} obtenidos para promastigotes de *L. donovani* y macrófagos tumorales, sobresale el de la indenoisoquinolina AM1355 que fue el mayor de los calculados. El IT_{48h} del SN38 superó el de su pro-fármaco, indicando que es necesaria la activación del mismo para obtener un compuesto con un buen perfil terapéutico. Al igual que para *L. infantum*, el IT_{48h} de la paromomicina descendió hasta 78,6, el menor de las tres especies, lo que demuestra la peor eficacia de este compuesto contra las especies con tropismo visceral.

Una explicación para este hecho es la procedencia de los cultivos RAW 264,7 y su capacidad proliferativa. Las células RAW 264,7 se aislaron originariamente del líquido ascítico de ratones Balb/C que padecían leucemia de Abelson, un tipo de cáncer de origen vírico que únicamente afecta a ratones. Como

consecuencia de su origen, estas células no han perdido la capacidad de crecer en las condiciones de cultivo. Esta capacidad proliferativa es compartida por los promastigotes de *Leishmania* spp. y por lo tanto, susceptible de ser diana de los inhibidores de Top. Como veremos más adelante, las TopIB activas pueden crear SSB durante la duplicación del ADN que se promueven a DSB si no se reparan adecuadamente. Estos complejos enzima-ADN irreversibles típicos de los venenos de Top, son favorecidos en condiciones de crecimiento y no en células quiescentes.

Con respecto a la miltefosina, debemos recordar que es un fármaco utilizado con éxito frente a células tumorales, que forma parte de la composición del Impávido[®], un fármaco antitumoral en fase clínica. Ya que la miltefosina puede ejercer una acción antiproliferativa con mayor eficacia en cultivos de macrófagos RAW 264,7 que de promastigotes de *Leishmania* spp., descartamos esta línea tumoral como célula diana en las infecciones *in vitro* y que decidimos estudiar el efecto tóxico sobre macrófagos peritoneales de ratón Balb/C.

4.2.2. Efecto de los inhibidores de la Top IB sobre los macrófagos peritoneales de ratón

Para evitar que los compuestos estudiados pudieran tener un efecto no buscado sobre células del hospedador, se han extraído macrófagos peritoneales murinos de ratones Balb/C que habían sido tratados 48 h antes con almidón al 2% (p/v) para su activación. Estos macrófagos fueron aislados de los ratones en condiciones de esterilidad y sembrados en placas de microtitulación de 96 pocillos a las que se añadió, después de su adherencia al fondo plástico, distintas concentraciones de los principios activos usados a lo largo de la memoria. Transcurridas 48 y 96 h, se procedió a analizar la viabilidad del cultivo mediante la técnica de azul alamar, tal y como se describe en el apartado 3.12.3 de materiales y métodos.

Como se puede observar en las gráficas de la Fig. 4.6 y en los resultados recopilados en las Tablas 4.5 y 4.6, los análogos de la CPT, mostraron un potente efecto citotóxico tanto a las 48 como a las 96 h, sin grandes diferencias entre los dos tiempos analizados para ninguno de los cuatro

principios activos, con excepción del irinotecán. CPT y SN38, tuvieron valores de IC_{50} cercanos a $1 \mu M$, siendo SN38 el más potente de los dos, con una $IC_{50}=0,54 \mu M$, mientras que el TPT presentó un valor de IC_{50} de $4,96 \mu M$. En este caso, el irinotecán fue débilmente metabolizado ya que su IC_{50} a las 48 h ($191,12 \mu M$) muestra un valor más de 500 veces superior al de su metabolito activo. Este hecho demuestra la escasa transformación del pró-fármaco en su forma activa por parte de los macrófagos, lo que contrasta con las células monocíticas murinas RAW 264,7, en las que como vimos con anterioridad, esta diferencia era de apenas tres veces a favor de SN38. Muy diferente fue el efecto encontrado con las indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50. Las curvas de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales muestran valores de IC_{50} por encima de $25 \mu M$ para ambos casos, lo que contrasta con las IC_{50} submicromolares encontradas en promastigotes de las tres especies de *Leishmania* y con los valores obtenidos en macrófagos tumorales murinos (IC_{50} AM1355= $8,13 \mu M$; IC_{50} MNR 2-50= $0,18 \mu M$). Esto nos hace pensar que el efecto citotóxico de estos compuestos está íntimamente ligado a la capacidad proliferativa de las células diana y seguramente a la expresión de la TopIB en las mismas como veremos más adelante.

Los dos agentes leishmanicidas utilizados en la memoria, fueron igualmente ensayados frente a los macrófagos murinos con una toxicidad moderada (IC_{50} de $64,68 \mu M$ para la miltefosina e IC_{50} de $15,7 \mu M$ para la paromomicina) tanto a las 48 h como a las 96 h de incubación. Este efecto moderado de la miltefosina, contrasta con la elevada toxicidad encontrada en la línea RAW 264,7 que, como vimos anteriormente, presentaba una IC_{50} por debajo de $1 \mu M$. No ocurre así con la paromomicina, cuyos valores de IC_{50} en RAW 264,7 y macrófagos son elevados y relativamente similares. Por esta razón, y a partir de los datos obtenidos en las gráficas de la Fig. 4.6, se calcularon los IT de los ocho compuestos como resultado del cociente entre las IC_{50} en macrófagos y promastigotes a las 48 y 96 h para las tres especies de *Leishmania* estudiadas.

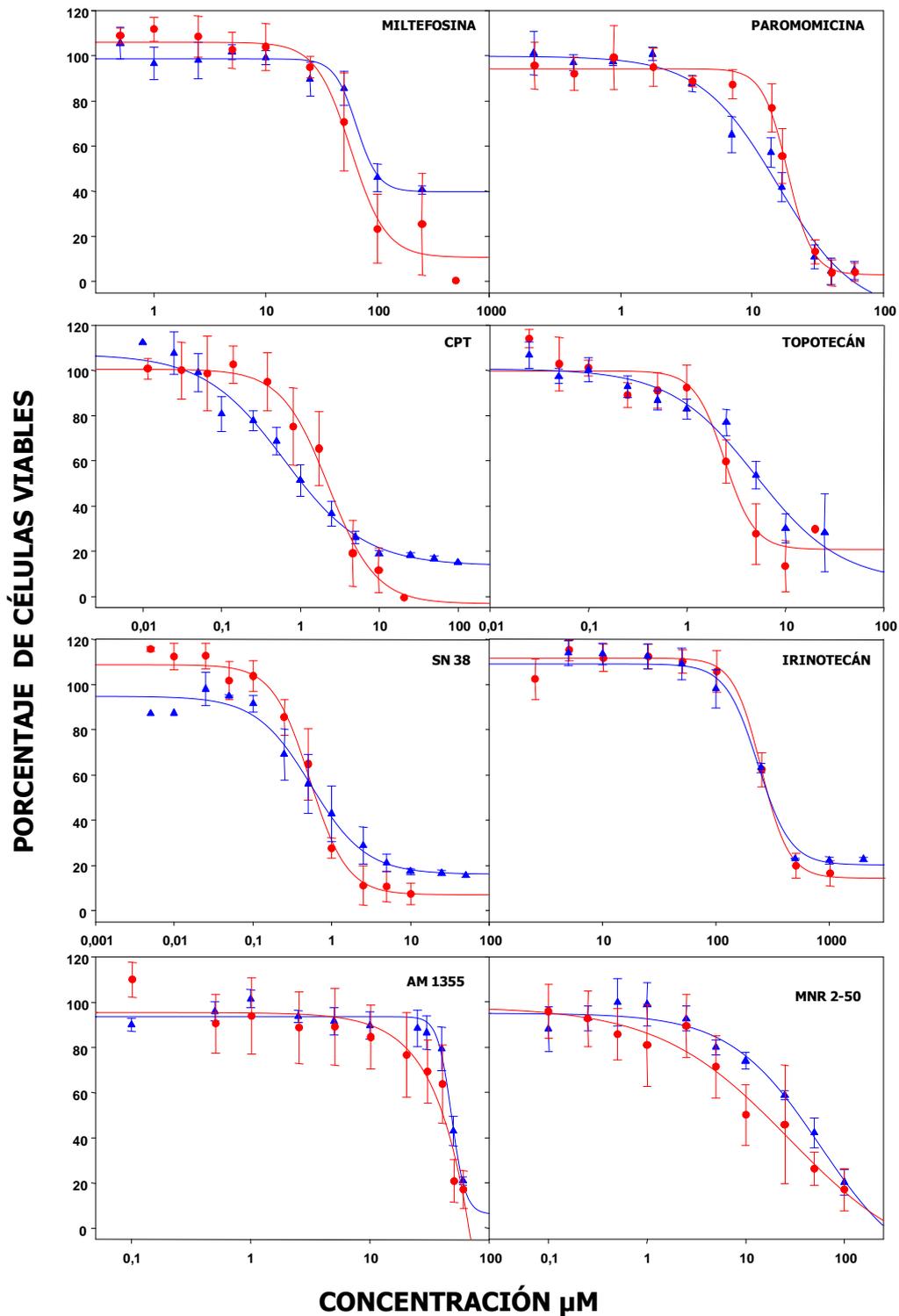


Fig. 4.6 Toxicidad de los inhibidores de TopIB en células de mamífero. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a ▲ 48 y ● 96 h en mamíferos peritoneales murinos. Cada curva corresponde a los valores medios obtenidos con sus correspondientes errores estándar, de tres determinaciones independientes.

Tabla 4.5 Cálculo de las IC₅₀ a las 48 h de los compuestos seleccionados sobre macrófagos peritoneales murinos y de los valores de IT en el mismo tiempo entre dichas células y los promastigotes de las tres especies *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.6, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®. Los valores de IT son resultado del cociente entre el valor de la IC₅₀ del cultivo de macrófagos peritoneales y el valor de IC₅₀ del cultivo de promastigotes.

	IC ₅₀ Balb/C 48 h	IT _{48h} <i>L.major</i>	IT _{48h} <i>L.infantum</i>	IT _{48h} <i>L.donovani</i>
MILTEFOSINA	64,68 µM± 7,05	4,63	2,57	6,36
PAROMOMICINA	15,70 mM± 3,54	1311,61	370,19	216,52
CAMPTOTECINA	0,62 µM± 0,13	1,29	0,55	0,37
TOPOTECÁN	4,96 µM± 0,95	0,48	0,45	0,24
SN 38	0,54 µM± 0,08	0,59	0,79	0,28
IRINOTECÁN	191,12 µM±47,02	3,13	0,95	2,63
AM1355	48,37 µM± 3,68	80,86	47,38	85,95
MNR 2-50	57,16 µM± 6,01	493,18	571,6	1143,2

En la Tabla 4.5 se muestran los índices terapéuticos de los ocho compuestos estudiados sobre los promastigotes de las tres especies tras 48 h de incubación y la Tabla 4.6 refleja los mismos parámetros a las 96 h. Los compuestos que mostraron una mayor eficacia y una menor toxicidad sobre el hospedador fueron las dos indenoisoquinolinas, AM1355 y MNR 2-50, comparándolas incluso con la miltefosina.

El IT_{48h} de AM1355 fue de 80,86 y de 34,23 a las 96 h sobre *L. major*, mientras que el MNR 2-50 tuvo un IT_{48h} de 493,18 y un IT_{96h} de 185,29 para la misma especie. Estos valores demuestran una gran selectividad de ambos compuestos sobre el patógeno y justifican la realización de ensayos *in vitro* e *in vivo* posteriores para valorar su eficacia terapéutica en infecciones experimentales.

Tabla 4.6 Cálculo de las IC₅₀ a las 96 h de los compuestos seleccionados macrófagos peritoneales murinos y de los valores de IT en el mismo tiempo entre dichas células y los promastigotes de las tres especies *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.6, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®. Los valores de IT son resultado del cociente entre el valor de la IC₅₀ del cultivo de macrófagos peritoneales y el valor de IC₅₀ del cultivo de promastigotes

	IC ₅₀ Balb/C 96h	IT _{96h} <i>L.major</i>	IT _{96h} <i>L.infantum</i>	IT _{96h} <i>L.donovani</i>
MILTEFOSINA	58,01 µM± 7,10	2,21	3,77	5,45
PAROMOMICINA	18,37 mM± 0,95	817,53	138,12	120,85
CAMPTOTECINA	1,30 µM± 0,17	3,47	0,52	2,71
TOPOTECÁN	2,40 µM± 0,40	0,24	0,30	0,30
SN 38	0,52 µM± 0,05	0,74	0,75	0,32
IRINOTECÁN	>200 µM	0,70	1	1
AM1355	38,77 µM± 5,98	34,23	36,25	36,87
MNR 2-50	27,44 µM± 3,58	185,29	138,52	214,56

No ocurre lo mismo con los análogos de las CPT cuyos IT fueron cercanos e incluso menores a 1 µM, lo que demuestra una evidente falta de selectividad a la hora de destruir las células parasitarias respecto a los macrófagos del hospedador. Además de las indenoisoquinolinas, la paromomicina se mostró como un compuesto seguro, con un índice terapéutico calculado de 1311,61 a las 48 h para *L. major*.

Estudiamos ahora los IT calculados para los diferentes compuestos frente a promastigotes de *L. infantum*, agente etiológico de la LV humana y canina en nuestro país. De manera semejante a *L. major*, las dos indenoisoquinolinas fueron los compuestos más potentes frente a *L. infantum* y menos tóxicos frente a macrófagos murinos con IT_{48h} de 47,38 y 567,06 para AM1355 y MNR

2-50 respectivamente y valores de IT_{96h} de 36,25 y 138,52 para los mismos compuestos y en este mismo orden.

En ambos casos se observó una cierta disminución del IT con el tiempo que se debió a un aumento en la toxicidad hacia el hospedador, más que a una pérdida de potencia sobre el patógeno. Estos compuestos fueron agentes más eficaces y seguros que la miltefosina, cuyos IT fueron de 2,57 y 3,77 a las 48 y 96 h respectivamente, aunque fueron menores a los de la paromomicina, el compuesto con mejor perfil terapéutico *in vitro*. Como en el caso de *L. major*, la CPT y sus derivados tuvieron ITs por debajo de la unidad, lo que puede descartarlos a primera vista como potenciales fármacos leishmanicidas a este nivel de estudios preclínicos.

Finalmente analizamos la eficacia y seguridad de estos compuestos sobre promastigotes de *L. donovani* comparados con los macrófagos peritoneales de ratones Balb/C. El perfil terapéutico obtenido no varía respecto a las dos especies comentadas con anterioridad. Son las dos indenoisoquinolinas, AM1355 y MNR 2-50, los compuestos más eficaces con IT_{48h} de 85,95 y 1143,2 respectivamente e IT_{96h} de 36,87 y 214,56 en este mismo orden. Es muy significativo el IT_{48h} del MNR 2-50 que supera al de la paromomicina (IT_{48h} de 216,6), compuesto más seguro observado en las otras dos especies analizadas previamente. De manera similar a lo que ocurrió en el caso de *L. major* y *L. infantum* los IT de los análogos de la CPT, fueron cercanos o inferiores a la unidad, lo que limita su actuación como potenciales leishmanicidas. En el caso de *L. donovani* se observó un mejor perfil terapéutico de la miltefosina ($IT_{48h} = 6,36$ y $IT_{96h} = 5,45$) respecto a *L. major* y *L. infantum*.

Los valores de IT calculados para los macrófagos peritoneales resultaron, por tanto, completamente diferentes a los obtenidos en los cultivos de macrófagos murinos RAW 264,7. Estos parámetros fueron especialmente relevantes en el caso de las dos indenoisoquinolinas, AM1355 y MNR 2-50, que resultaron substancialmente más inseguras para la línea monocítica tumoral que para los macrófagos peritoneales murinos. Las posibles razones de la disminución de este parámetro se comentaron con anterioridad y hay que atribuir las al origen de las células RAW 264,7 y al efecto de estos compuestos sobre los procesos

proliferativos. Las indenoisoquinolinas fueron sintetizadas como antitumorales y tal como demuestra Antony y col. (2006), su eficacia está intrínsecamente relacionada con la formación de complejos enzima-ADN con la TopIB humana. Estos mismos autores han demostrado que las indenoisoquinolinas sintetizadas por el grupo del Dr, Cushman tienen un fuerte efecto antitumoral siendo IJIII65 la primera que está participando en estudios preclínicos para empezar su carrera en la fase hospitalaria.

Sin embargo, no se puede concluir que este sea el único proceso en que intervengan estos compuestos como veremos más adelante. Estudios previos realizados sobre levaduras transgénicas carentes del gen de la Top IB, demuestran que las indenoisoquinolinas producen un efecto tóxico independiente de la inhibición enzimática, ya que no fueron capaces de crecer colonias de dichas levaduras (spot test) en presencia de estos compuestos, a diferencia de lo que ocurría con la CPT. Estos resultados no descartan el excelente perfil de ambos fármacos para estudios posteriores, ya que el bajo IT en células RAW 264,7, no invalida el excelente ratio obtenido en macrófagos peritoneales, células quiescentes cuyo crecimiento *in vitro* es nulo.

4.3. EFECTO DE LA CPT Y SUS ANÁLOGOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LdTopIB *IN VITRO*

El aislamiento y purificación de la TopIB de *L. donovani* (LdTopIB), se llevó a cabo a partir de una cepa de *S. cerevisiae* auxótrofa en su propia yTopIB pero que había sido previamente transformada con LdTopIB según el protocolo descrito en el apartado 3.8 de materiales y métodos (Villa y col., 2003).

La TopIB es una enzima muy conservada filogenéticamente entre las tres especies de *Leishmania* utilizadas en la memoria. *L. major* tiene una homología de más del 99% con sus análogas de *L. donovani* y *L. infantum*. El grado de identidad supone más del 95% entre las tres especies. Por esta razón, se ha utilizado LdTopIB para hacer los ensayos de inhibición de la relajación *in vitro* considerando que, en tales condiciones, los resultados obtenidos para las tres especies serían transferibles.

La sobreexpresión y purificación de la LdTopIB supuso el clonado de los dos genes codificantes de las dos subunidades en un vector bistrónico para la expresión en levaduras y su posterior purificación mediante cromatografía líquida en columna de baja presión. Los genes que codifican las dos subunidades de LdTopIB, LdTopIL y LdTopIS, se hayan localizados en los cromosomas 34 y 4 respectivamente del genoma de *L. donovani*. Para su clonado, se amplificaron a partir de ADN genómico ambas ORFs mediante PCR utilizando una Taq polimerasa de alta fidelidad y su posterior sub-clonado en el vector bistrónico pESC URA- que permite la expresión conjunta de las dos ORFs, al quedar ambas bajo el control de los dos promotores inducibles por galactosa; *GAL 1* y *GAL 10*. Villa y col. (2003) demostraron que los extractos de levaduras auxótrofos en yTopIB, podían ser reconstituidos cuando se clonaba este vector con ambas ORFs. Estos extractos tenían actividad TopIB y las levaduras se hacían automáticamente sensibles a CPT, a diferencia de las auxótrofas que eran capaces de crecer en presencia de este inhibidor. Los extractos procedentes de 500 mL de cultivo de *S. cerevisiae*, que habían sido crecidos en glucosa al 2% (p/v) para facilitar un crecimiento rápido y posteriormente en galactosa para estimular los dos promotores bajo los que están clonados los genes que codifican ambas subunidades, se obtuvieron por rotura mecánica con bolas de vidrio en un "bead beater" enfriado en hielo. Posteriormente se realizaron dos eluciones en columnas cromatográficas de intercambio iónico y de hidrofobicidad tal y como se describe en la sección 3.8 de materiales y métodos. Las fracciones recogidas de la última columna se concentraron mediante centrifugación a baja velocidad con filtros Amicon Ultra 50 que permiten el paso de moléculas de masa molecular menor de 50 kDa.

La proteína purificada por el procesamiento anterior se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE al 12,5% obteniéndose la fotografía de la Fig. 4.7 donde se observan las dos bandas mayoritarias, una de aproximadamente 75 kDa y otra de 30 kDa que corresponden a las masas moleculares estudiadas de cada unidad.

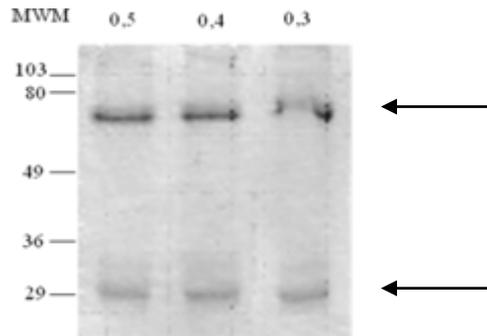


Fig. 4.7 Imagen obtenida de un gel de electroforesis de proteínas SDS-PAGE al 12,5% de los extractos purificado por las columnas P11 y fenil-sefarosa.

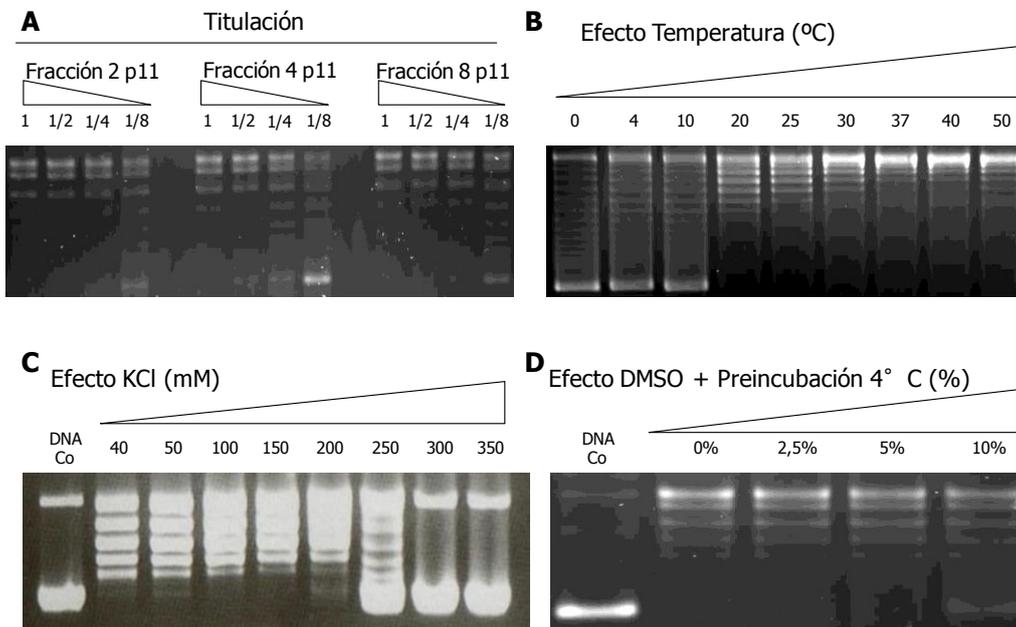


Fig. 4.8 Purificación y optimización de la actividad de relajación de LdTopIB. A) Actividad de relajación de distintas fracciones de elución procedentes de la comuna P11; B) Actividad de relajación en relación a la temperatura; C) Efecto del KCl en la actividad de relajación; D) Efecto de distintas concentraciones de DMSO en la actividad de LdTopIB. Los resultados son representativos de varios ensayos realizados independientemente.

A pesar de que el grado de purificación no fue completo y de que se observan otras bandas en el gel de electroforesis, consideramos que era suficiente para realizar los ensayos de inhibición de la relajación que se llevaron a cabo a continuación con los compuestos seleccionados en la memoria.

Un paso previo para poder realizar estos ensayos, fue determinar la actividad específica de las distintas fracciones obtenidas tras la elección de la columna P11 y así poder fijar las unidades de la LdTopIB que se utilizarían más adelante en los ensayos de inhibición.

Para ello, 1 μ L de cada fracción de proteína purificada y 3 diluciones seriadas 1:1 fueron añadidas a los tubos de reacción en presencia de 0,5 μ g de ADN circular superenrollado del virus ϕ X174 (RfI), durante un periodo de 30 min. La fotografía de la Fig. 4.8. A muestra la relajación completa de RfI en las primeras diluciones hasta que prácticamente los topoisómeros desaparecen en la última. Ya que 1U de actividad TopIB se define como la cantidad de enzima capaz de relajar por completo en 30 min 0,5 μ g de ADN circular superenrollado, se eligió la tercera dilución de enzima purificada en las condiciones descritas para realizar el resto de los ensayos de inhibición de la relajación que se describen más adelante.

Complementariamente, se estudió el efecto de la temperatura, la concentración de KCl y de DMSO en la actividad de relajación de LdTopIB *in vitro*. La actividad enzimática se midió en condiciones estándar a 4 °C, 15 °C, 26 °C, 37 °C, 40 °C y 50 °C durante 30 min (Fig. 4.8.B). Se observó que a temperaturas bajas la enzima perdió la capacidad de relajación, pero no por encima de los 26 °C (temperatura óptima de crecimiento de los promastigotes) en las que no se observaron cambios en la actividad catalítica. Igualmente, se determinó la concentración óptima de KCl en el ensayo de relajación a diferentes concentraciones de la sal; (40 a 350 mM) (Fig. 4.8.C). Los ensayos se realizaron según el procedimiento estándar a 37 °C observándose un máximo de actividad catalítica con una concentración de KCl de 150 mM, cantidad que fue estandarizada a partir de este momento en todos los ensayos de inhibición. Finalmente y con el ánimo de saber cuál es la concentración máxima de DMSO (disolvente aprótico polar de muchos de los compuestos utilizados en la memoria), que no interfería en la reacción de relajación, realizamos un ensayo estándar a 37 °C con distintas concentraciones del disolvente (2,5%, 5% y 10% (v/v)) en la mezcla de reacción (Fig. 4.8.D) observándose que el DMSO no interfería a concentraciones por debajo del 5% (v/v) en la relajación del ADN

superenrollado en dichas condiciones, estableciéndose estas concentraciones para todos los ensayos de inhibición que veremos a continuación.

Los estudios realizados con CPT a 100 μM y 1U de enzima purificada mostraban la incapacidad de prevenir la relajación de RfI durante un período de 30 min de incubación. Estos resultados fueron desmoralizadores y nos hicieron pensar que a diferencia de hTopIB, la enzima de *Leishmania* era insensible a CPT y que los mecanismos de citotoxicidad se producían por procesos alternativos en los que LdTopIB no se veía afectada. Una posibilidad que se barajó fue que la estabilidad del complejo enzima- ADN fuera muy baja y se deshiciera rápidamente en los primeros minutos, desapareciendo dicho complejo después de los 30 min de incubación. También pensamos que podría ser necesaria la preincubación de la enzima con CPT en frío antes de disparar la reacción con ADN y los demás componentes del ensayo a 37 °C.

Todas estas modificaciones fueron tenidas en cuenta en los siguientes ensayos para poder determinar efectivamente la capacidad inhibitoria de la CPT, sus análogos y las indenoisoquinolinas seleccionadas en el estudio.

1U de LdTopIB purificada se incubó con una concentración 100 μM de CPT a 4 °C durante 15 min antes de comenzar la reacción. Un volumen de 2 μL de esta mezcla se añadió entonces a 18 μL de tampón de ensayo que contenía 0,5 μg de RfI a 37 °C. En este momento se inició la reacción, tomando alícuotas temporales que eran detenidas por la adición de un tampón de parada que contenía 2,5% de SDS (p/v), 25% (p/v) de Ficoll, 0,03% (p/v) de azul de bromofenol, 0,03% (p/v) de xilenocianol y 25 mM de EDTA. Los tiempos analizados fueron 7, 15, 30 s y 1, 2, 4 y 8 min después de la incubación con el ADN, obteniéndose las fotografías de la Fig. 4.9.A. Como podemos observar en dicha figura, la CPT detiene la capacidad de la enzima para relajar el ADN superenrollado en topoisomeros de menor complejidad hasta los 30 s. A partir de este momento y de manera paulatina la relajación vuelve a tener lugar, apareciendo en el gel topoisomeros más relajados –que van ascediendo en el gel-. Esta inhibición transitoria a concentración elevada de principio activo sirvió para establecer el tiempo en el que realizaríamos los ensayos dosis/respuesta a diferentes concentraciones de CPT.

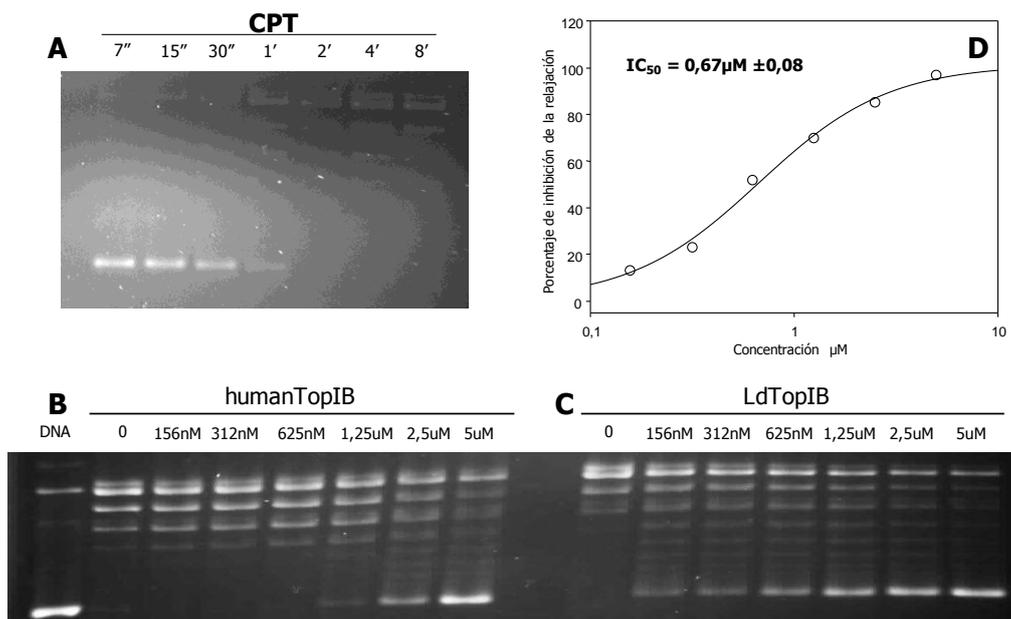


Fig. 4.9 Inhibición de la actividad de relajación por la CPT sobre la LdTopIB. A) Dependencia en el tiempo de la inhibición de la actividad de la relajación por CPT en LdTopib; B) Inhibición de la actividad de hTopIB por CPT; C) Inhibición de la actividad de LdTopIB por CPT; D) Relación dosis/respuesta de la actividad LdTopIB a las concentraciones de CPT del panel C. Los resultados son representativos de tres ensayos realizados independientemente.

Para determinar la IC₅₀ de la CPT en la actividad de relajación de LdTopIB, se preincubó 1U de enzima, determinada según los resultados anteriores, con diferentes concentraciones del fármaco (0,15 a 5 µM) en hielo durante 15 min y transcurrido ese tiempo, se añadieron a una mezcla precalentada a 37 °C que contenía 0,5 µg de RfI en el tampón de ensayo. Se mantuvieron durante 30 s en estas condiciones, momento en el que se interrumpió la reacción mediante la adición de SDS frío. En la Fig. 4.9.C se observa que la intensidad de la banda de ADN superenrollado iba aumentando a medida que crecía la concentración de CPT y simultáneamente, la banda de ADN relajado disminuía con dicha concentración. En el panel de la izquierda (Fig. 4.9.B), observamos la inhibición producida sobre la hTopIB usada como referencia, de manera que se puede comprobar la sensibilidad de ambas enzimas por la CPT en las mismas condiciones de ensayo. Finalmente en el panel D se presenta el valor

de IC_{50} de la CPT sobre la enzima mediante la representación y ajuste no lineal de las concentraciones de CPT frente al porcentaje de ADN superenrollado restante tras la acción enzimática. En este caso, se determinó una IC_{50} de $0,6 \mu\text{M}$, por debajo de la estimada para hTopIB que fue de $2 \mu\text{M}$.

Dado que el tiempo de estabilización del complejo enzima-ADN es clave para poder estudiar la inhibición de los demás análogos de la CPT, este parámetro se determinó previamente para todos los compuestos analizados. La fig. 4.10.A muestra el efecto del TPT a los mismos tiempos que los analizados con la CPT, 7, 15, 30 s y 1, 2, 4 y 8 min tras la adición de la enzima preincubada con una concentración de $100 \mu\text{M}$ de TPT. A diferencia de la CPT, el TPT tuvo un periodo mucho más largo de estabilización del complejo enzima-ADN – hasta 8 min – lo que se traduce en una acumulación de ADN superenrollado como consecuencia de la inhibición de LdTopIB (Fig. 4.10.A)-. Se eligió, sin embargo, el tiempo de 1 min para añadir diferentes concentraciones de TPT a 1U de enzima purificada a en las condiciones de ensayo. La fotografía de la Fig. 4.10.B muestra la inhibición del TPT sobre hTopIB, sin efecto aparente hasta la concentración $2,5 \mu\text{M}$, a diferencia de LdTopIB (Fig. 3.10.C) que fue extremadamente sensible al fármaco demostrando una IC_{50} , calculada sobre la curva dosis/respuesta representada en la Fig. 4.10.D, de $0,09 \mu\text{M}$, por debajo incluso de la presentada por la CPT.

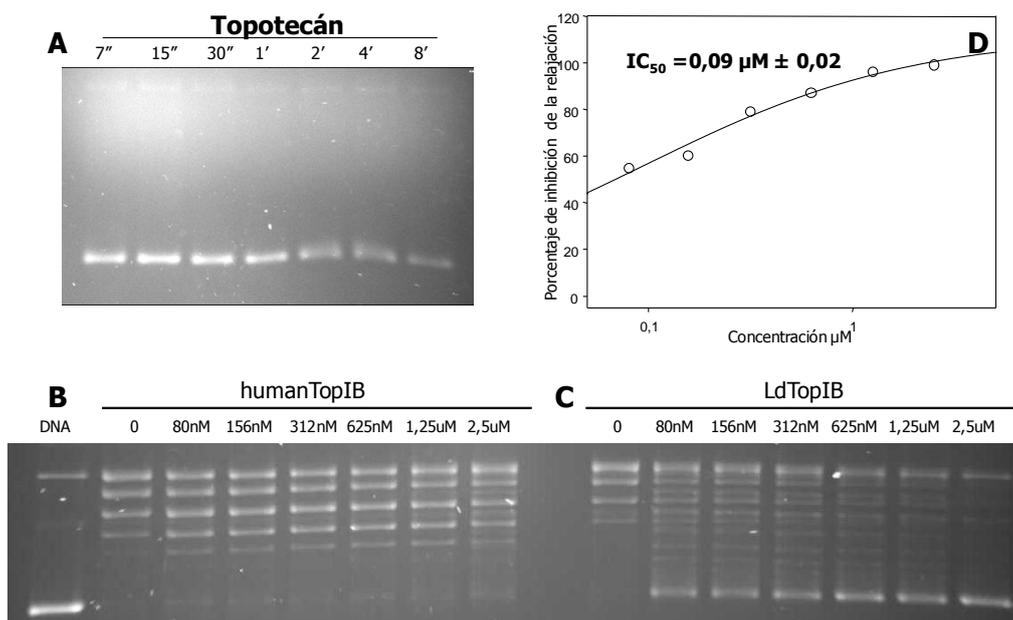


Fig. 4.10 Inhibición de la actividad de relajación por el TPT sobre la LdTopIB. A) Dependencia con el tiempo de la inhibición de la actividad de la relajación por TPT en LdTopIB; B) Inhibición de la actividad de hTopIB por TPT; C) Inhibición de la actividad de LdTopIB por TPT; D) Relación dosis/respuesta de la actividad LdTopIB a las concentraciones de TPT del panel C. Los resultados son representativos de tres ensayos realizados independientemente.

De la misma manera se realizó el ensayo con SN38. En este caso y por motivos de solubilidad, se eligió la concentración de 75 µM para realizar la titulación temporal. La fotografía de la Fig. 4.11.A muestra que el tiempo máximo de estabilización del complejo enzima-ADN era de apenas 1 min, revirtiéndose el efecto inhibitor a tiempos superiores. Fue precisamente este tiempo, semejante al utilizado para CPT pero muy inferior al encontrado anteriormente para el TPT, el elegido para los ensayos dosis/respuesta que aparecen reflejados en los paneles B y C de la Fig. 4.11 El valor de IC₅₀ para la inhibición de LdTopIB por el SN38, se calculó a partir de la curva dosis/respuesta representada en el panel D de la misma figura, siendo similar al encontrado para la CPT, aunque significativamente menor al de TPT.

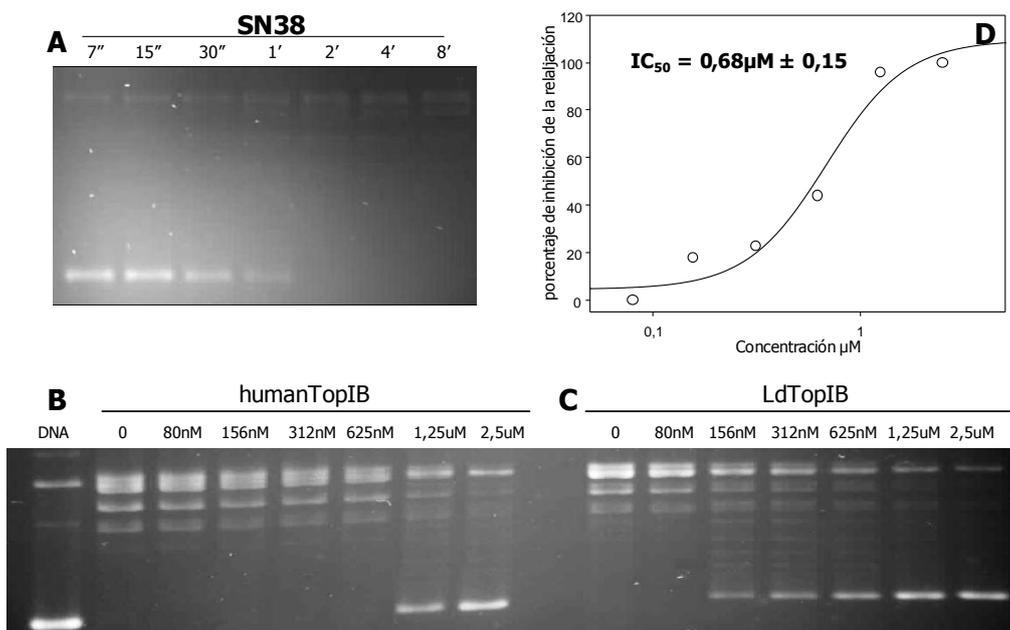


Fig. 4.11 Inhibición de la actividad de relajación por la SN38 sobre la LdTopIB. A) Dependencia con el tiempo de la inhibición de la actividad de la relajación por SN38 en LdTopIB; B) Inhibición de la actividad de hTopIB por SN38; C) Inhibición de la actividad de LdTopIB por SN38; D) Relación dosis/respuesta de la actividad LdTopIB a las concentraciones de SN38 del panel C. Los resultados son representativos de tres ensayos realizados independientemente.

Aunque no se muestran figuras de estos resultados, el irinotecán no tuvo ningún efecto inhibitor sobre la LdTopIB a una concentración de 100 μM en los tiempos ensayados. Este resultado era previsible debido a que el irinotecán es un pro-fármaco que tiene que ser metabolizado por el organismo para que libere SN38, que es el verdadero principio activo.

Para determinar la acción de las dos indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50 sobre la LdTopIB purificada de levaduras, se realizaron ensayos de la misma manera que los llevados a cabo con CPT y derivados, esto es, analizando el tiempo requerido para estabilizar el complejo enzima-ADN a una concentración elevada y posteriormente valorar la IC₅₀ de cada compuesto al tiempo establecido, variando la concentración de cada compuesto.

De la misma manera que para el SN38, se utilizó una concentración de 75 μM de AM1355 y MNR 2-50 (ya que son compuestos muy insolubles) en DMSO a los tiempos establecidos de 7, 15 y 30 s; 1, 2, 4 y 8 min para observar, en el caso de AM1355, que a un tiempo tan corto como 30 s se desestabilizaba el complejo enzima-ADN, comenzando la relajación a partir de 1 min después de la adición de ADN. La Fig. 4.13 muestra el mismo experimento con MNR 2-50, que no pudo estabilizar el complejo enzima-ADN más allá de 1 min. Estos resultados se asemejan a los obtenidos con el SN38 y la CPT y sirvieron para elegir tiempos de 30 s y 1 min para ensayar diferentes concentraciones del compuesto sobre la enzima. 1U de la misma se incubó con las diferentes concentraciones de fármaco en hielo durante 15 min y después se añadieron a una mezcla que contenía 0,5 μg de ADN RfI en el tampón de reacción, incubándose durante 30 s y 1 min para AM1355 y MNR 2-50, respectivamente. Las curvas dosis/respuesta de las Fig. 4.12.D y 4.13.D arrojan valores de IC_{50} de 0,29 μM y 0,71 μM para AM1355 y MNR 2-50 respectivamente, dentro del orden de los otros compuestos estudiados.

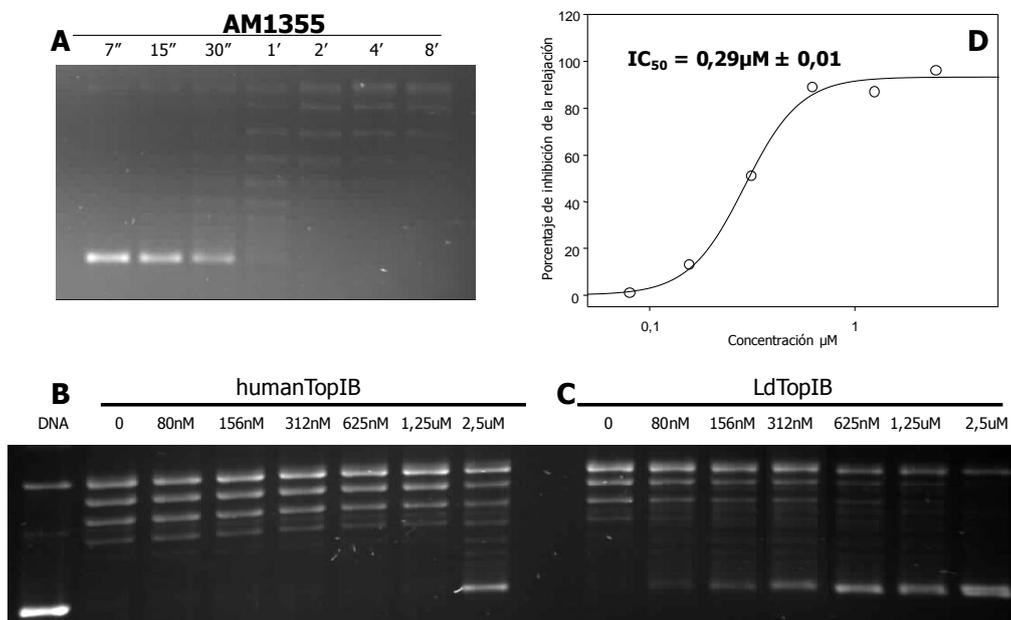


Fig. 4.12 Inhibición de la actividad de relajación por la AM1355 sobre la LdTopIB. A) Dependencia con el tiempo de la inhibición de la actividad de la relajación por AM1355 en LdTopIB; B) Inhibición de la actividad de hTopIB por la AM1355; C) Inhibición de la actividad de LdTopIB por la AM1355; D) Relación dosis/respuesta de la actividad LdTopIB a las concentraciones de

AM1355 del panel C. Los resultados son representativos de tres ensayos realizados independientemente.

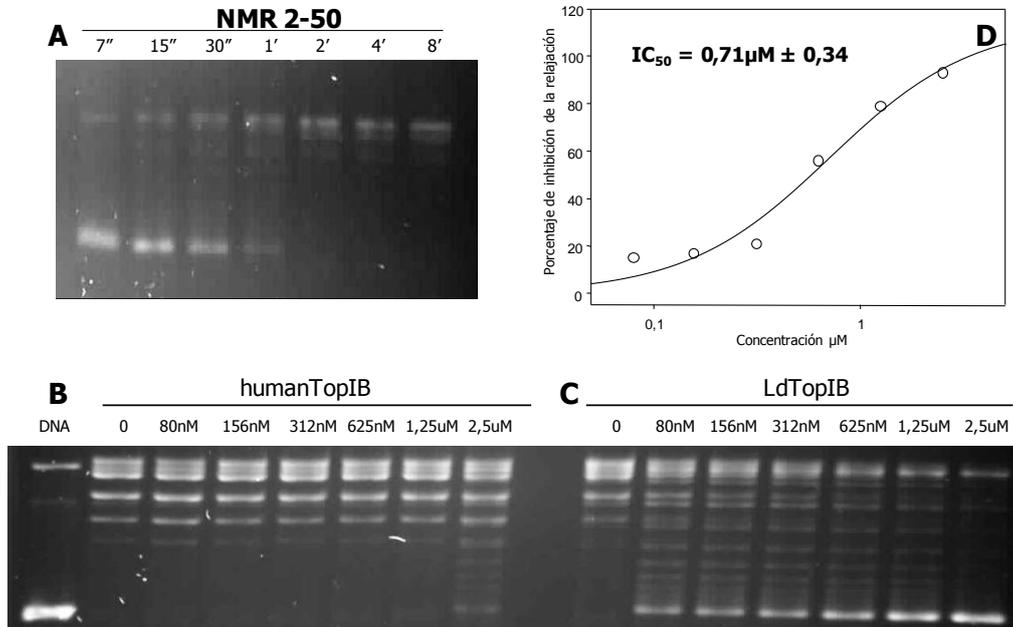


Fig. 4.13 Inhibición de la actividad de relajación por la MNR 2-50 sobre la LdTopIB. A) Dependencia con el tiempo de la inhibición de la actividad de la relajación por MNR 2-50 en LdTopIB; B) Inhibición de la actividad de hTopIB por la MNR2-50; C) Inhibición de la actividad de LdTopIB por la MNR2-50; D) Relación dosis/respuesta de la actividad LdTopIB a las concentraciones de MNR2-50 del panel C. Los resultados son representativos de tres ensayos realizados independientemente.

4.4. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS ENZIMA-ADN FORMADOS *IN VIVO*

Para determinar los complejos enzima-ADN formados *in vivo* en promastigotes de *Leishmania* que habían sido expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados, se utilizó el método de precipitación con SDS en presencia de KCl frío.

El método se basa en la capacidad del SDS de unirse selectivamente a las proteínas pero no al ADN. La adición de KCl a las células lisadas con SDS, produce la formación de un precipitado insoluble que incluye todas las

proteínas y los complejos de proteínas unidas covalentemente al ADN. La cantidad de ADN precipitado por este método se corresponde al que ha establecido dicha unión con una proteína de forma irreversible. Este método se ha utilizado para valorar compuestos que estabilizan el complejo enzima-ADN como son los inhibidores de tipo I de las TopIB y los inhibidores de las TopII. Uno de los inconvenientes que pueden asociarse a este método es no distinguir entre un inhibidor de ambas Top, ya que el resultado sería semejante.

Los promastigotes de *L. major*, que habían sido crecidos en presencia de 0,04 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ timidina durante 48 h para marcar homogéneamente su ADN, fueron expuestos a concentraciones crecientes de los inhibidores de TopIB seleccionados en la memoria durante 30 min. A continuación, las células se lisaron con 10% de SDS y se agitaron vigorosamente durante 10 s. Posteriormente, se filtraron a través de filtros de profundidad de fibra de vidrio para separar el ADN marcado total de aquel que específicamente se había unido a las proteínas de forma covalente e irreversible. El ADN unido a proteínas se comparó con el total, determinando el porcentaje del primero generado con las distintas concentraciones del compuesto que actuaba como estabilizador de los complejos. La CPT fue utilizada como compuesto de referencia de formación de complejos enzima-ADN de TopIB sobre el ADN de *Leishmania*.

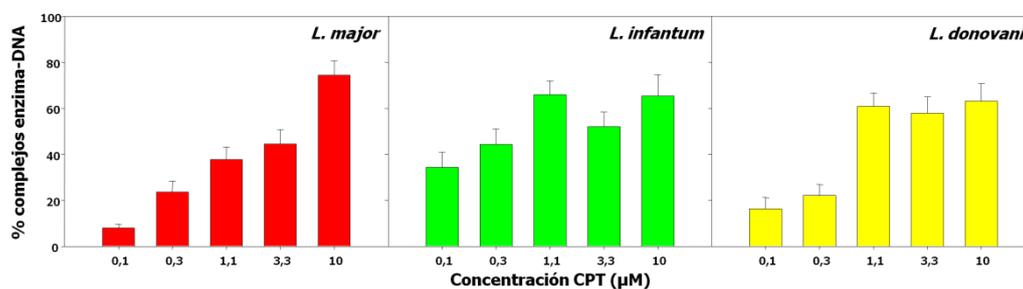


Fig. 4.14 Formación de complejos enzima-ADN a diferentes concentraciones de CPT en cultivos de promastigotes de las tres especies, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

La Fig. 4.14 muestra que hubo una relación entre la proporción de complejo enzima-ADN y la concentración de CPT ya desde concentraciones submicromolares (0,1 μM), hasta la concentración máxima utilizada de 10 μM (más del 80% de complejos enzima-ADN formados en *L. major*). La CPT fue el compuesto más efectivo en la formación de complejos enzima-ADN de los utilizados en la memoria y se correspondía con la inhibición de la enzima *in vitro*.

El TPT, análogo hidrosoluble de la CPT, se incubó a un rango de concentraciones de 0,3 a 90 μM con cultivos de promastigotes de las tres especies de *Leishmania* estudiadas tal como se observa en la Fig. 4.15. En este caso el porcentaje de complejos enzima-ADN formados como consecuencia de la presencia del inhibidor, fue proporcional a su concentración desde niveles cercanos a 1 μM . A partir de estas concentraciones el porcentaje de complejos aumentó significativamente, aunque nunca se alcanzaron los niveles de la CPT. El TPT a una concentración de 90 μM produjo un porcentaje de ruptura de ADN del 50%, significativamente menor al de la CPT. A 10 μM , el TPT apenas produjo un 10% de complejos enzima-ADN. Estos resultados se correlacionaron bien con la menor capacidad citotóxica del TPT respecto a la CPT, aunque no con la capacidad de inhibición *in vitro* de la LdTopIB. Podemos pensar que la menor citotoxicidad del TPT se debe más a un problema de absorción por parte de las células diana, que a su efecto sobre la enzima purificada.

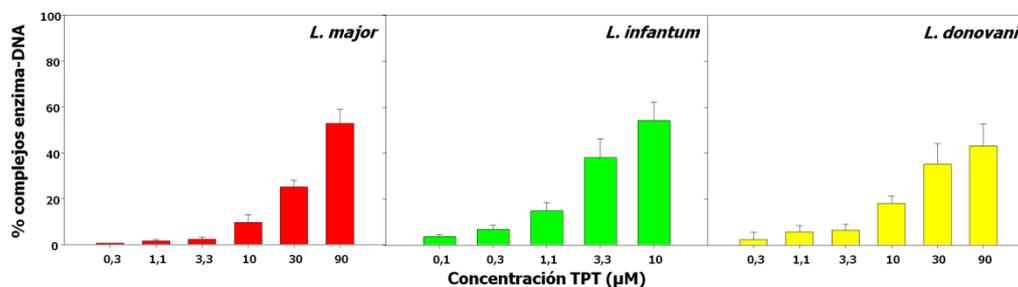


Fig. 4.15 Formación de complejos enzima-ADN a diferentes concentraciones de TPT en cultivos de promastigotes de las tres especies, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

Los resultados obtenidos con SN38 y su pro-fármaco irinotecán sobre la formación de complejos enzima-ADN en *Leishmania* spp. se muestra en las Fig. 4.16 y 4.17. Como era de esperar el irinotecán no indujo la formación de complejos enzima-ADN en ninguna de las tres especies de *Leishmania*. Esto indica en primera instancia que este pro-fármaco no tiene capacidad por sí solo de estabilizar el paso de ruptura de la TopIB con el ADN y en segunda instancia, que los promastigotes de *Leishmania* son incapaces de procesarlo a su metabolito activo SN38.

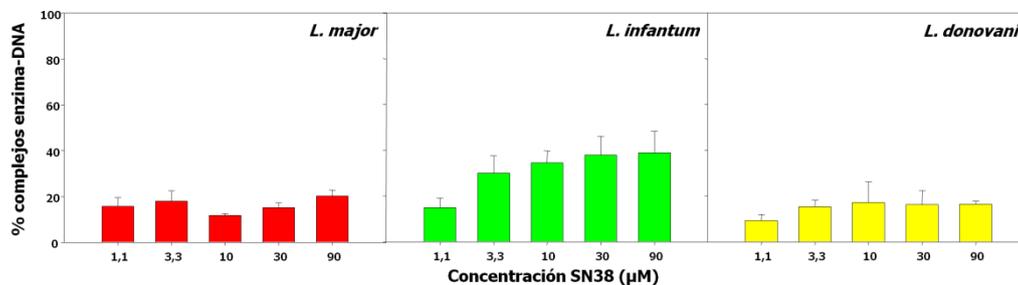


Fig. 4.16 Formación de complejos enzima-ADN a diferentes concentraciones de SN38 en cultivos de promastigotes de las tres especies, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

El SN38, la forma activa del irinotecán, pierde su carácter hidrosoluble original y sí es capaz de estabilizar los complejos enzima-ADN irreversiblemente. Las gráficas de la Fig. 4.16 demuestran este efecto en las tres especies de *Leishmania*, con una mayor relevancia en *L. infantum* observándose sin embargo, una relación dosis/respuesta difícilmente explicable en *L. major* y *L. donovani*. No obstante, a diferencia del TPT, el porcentaje de complejos enzima-ADN a concentración 1 μM fue en las tres especies próximo al 15% aumentando hasta el 40% en *L. infantum* y apenas superando el 20% en *L. major* y *L. donovani*. Esta saturación del efecto de ruptura independiente de la concentración es difícil de explicar, ya que SN38 fue eficaz inhibiendo la capacidad de relajación *in vitro* y presentaba valores de citotoxicidad cercanos a la CPT en términos de IC₅₀. Tampoco parece lógico atribuir esta pérdida de efecto a una menor absorción del compuesto por los promastigotes de

Leishmania, ya que éste se hace más liposoluble cuando es procesado como metabolito del irinotecán.

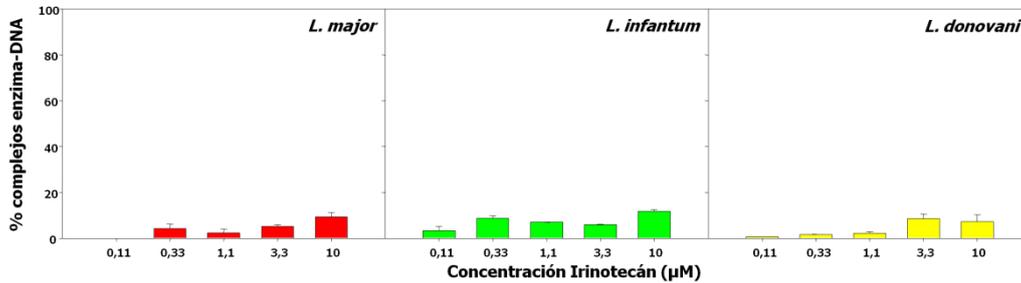


Fig. 4.17 Formación de complejos enzima-ADN a diferentes concentraciones de Irinotecán en cultivos de promastigotes de las tres especies, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

Una explicación alternativa referente a la accesibilidad al núcleo o a la capacidad de reversión del complejo enzima-ADN por parte de los mecanismos de regeneración, podría en parte explicar porqué a concentraciones semejantes, el SN38 produce un efecto más limitado sobre el ADN de los promastigotes que sus análogos CPT y TPT.

Podríamos plantear una explicación semejante para comprender lo ocurrido con las dos indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50 (Fig. 4.18 y Fig. 4.19). Ambos compuestos tuvieron efectos citotóxicos muy pronunciados sobre los cultivos de promastigotes de las tres especies (orden submicromolar) y una elevada liposolubilidad que garantiza una penetrabilidad en las células por mecanismos de difusión simple independientes de transportadores.

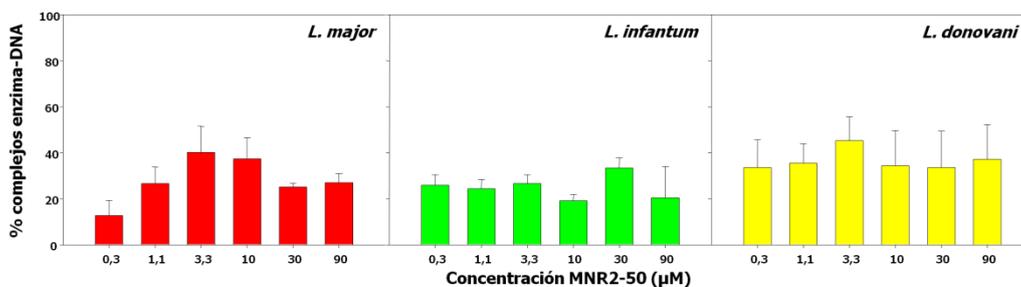


Fig. 4.18 Formación de complejos enzima-ADN a diferentes concentraciones

de MNR 2-50 en cultivos de promastigotes de las tres especies, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

MNR 2-50 fue especialmente eficaz a concentraciones submicromolares, en las que el porcentaje de enzima-ADN precipitado en SDS/K era cercano al 20% en *L. infantum* y *L. major* y de más del 35% en *L. donovani*. Sin embargo, con excepción de *L. major*, no existieron buenas relaciones con la dosis, sino que el porcentaje de ADN precipitable se mantuvo prácticamente constante, como si la cantidad de ADN mellado y reparado por la célula estuviera en una situación de estado estacionario. Los ensayos de relajación *in vitro* mostraban que la estabilidad del complejo enzima-ADN era menor en el tiempo que con el TPT, pero semejante al SN38 y la CPT. Sin embargo, es con este último compuesto con el que se produce mayor porcentaje de complejos enzima-ADN a las concentraciones de apenas 10 μM .

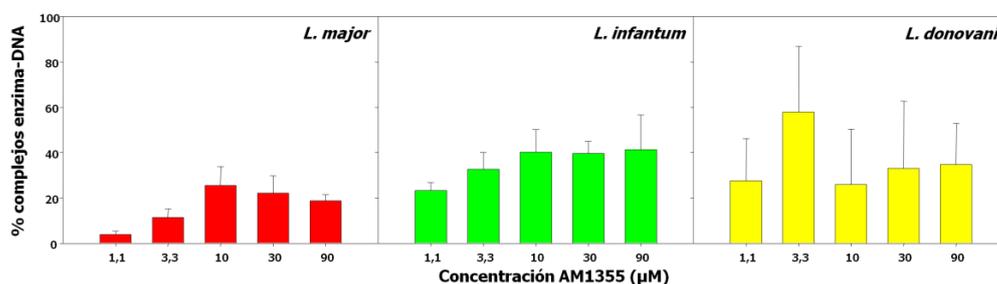


Fig. 4.19 Formación de complejos enzima-ADN a diferentes concentraciones de AM1355 en cultivos de promastigotes de las tres especies, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*.

4.5. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS INHIBIDORES DE TOPOISOMERASA EN PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA* TRANSFECTADOS

La detección fluorescente de proteínas reporteras *in vivo* ha surgido como una herramienta poderosa para estudios de procesos patológicos y de eficiencia de fármacos. Este hecho es aún más cierto cuando el proceso patológico implicado es de tipo proliferativo pudiéndose evaluar en tiempo real la

invasión de tejidos que muchas veces podría pasar desapercibida a los ojos del clínico. Los marcadores fluorescentes en procesos tumorales e infecciones, incluidas las parasitarias, se presentan como una alternativa real a los métodos clásicos por su rapidez y sensibilidad, siempre y cuando las modificaciones genéticas introducidas en el agente etiológico, ya sea una célula cancerosa o un patógeno, no afecten a su virulencia, tanto aumentándola como disminuyéndola (Hutchens, M. & Luker, GD., 2007).

Entre los muchos instrumentos de imagen que se han desarrollado, los reporteros emisores de luz fluorescente, están a la vanguardia de las tecnologías utilizadas en los últimos años, ya que permiten cuantificar la carga infecciosa y valorar la respuesta inmune del hospedador a tiempo real, sin necesidad de sacrificar al donante. También tienen la ventaja de poder ser estudiados en el mismo animal en el curso de horas, días o semanas, evitando las limitaciones de los ensayos convencionales (Mehta S. y col., 2008). Además de la fluorescencia, se han evaluado proteínas bioluminiscentes, con señal más vigorosa, pero menos estable en el tiempo y que necesitarían un sustrato emisor que debe ser administrado al animal antes de poder recibir la señal luminosa.

Los reporteros fluorescentes del tipo de la proteína verde fluorescente (GFP) o sus modificaciones, emiten a longitudes de onda que en ocasiones pueden ser extinguidas por el color de los tejidos de ciertos órganos como el hígado y el bazo (Ha, DS. y col., 1996). Sin embargo, para los trabajos *in vitro*, pueden servir de alternativa a los recuentos celulares o a las tinciones vitales del tipo azul alamar, rojo neutro y/o MTT, reduciendo el tiempo de análisis a la simple obtención de datos por el lector de microplacas. Otra ventaja adicional es que las células fluorescentes pueden servir para realizar infecciones experimentales en macrófagos, sustituyendo a métodos convencionales mucho más tediosos como es la fijación, tinte y recuento microscópico con Giemsa. En el caso de este trabajo, nuestro grupo de investigación ha conseguido dos cepas transgénicas, una de *L. infantum* portadora de forma estable del gen codificante de la proteína mCherry y otra de *L. major* portadora del gen codificante de citrina (una variedad procedente de la GFP), cuyo potencial como dianas de fármacos antiparasitarios aún no ha sido evaluado.

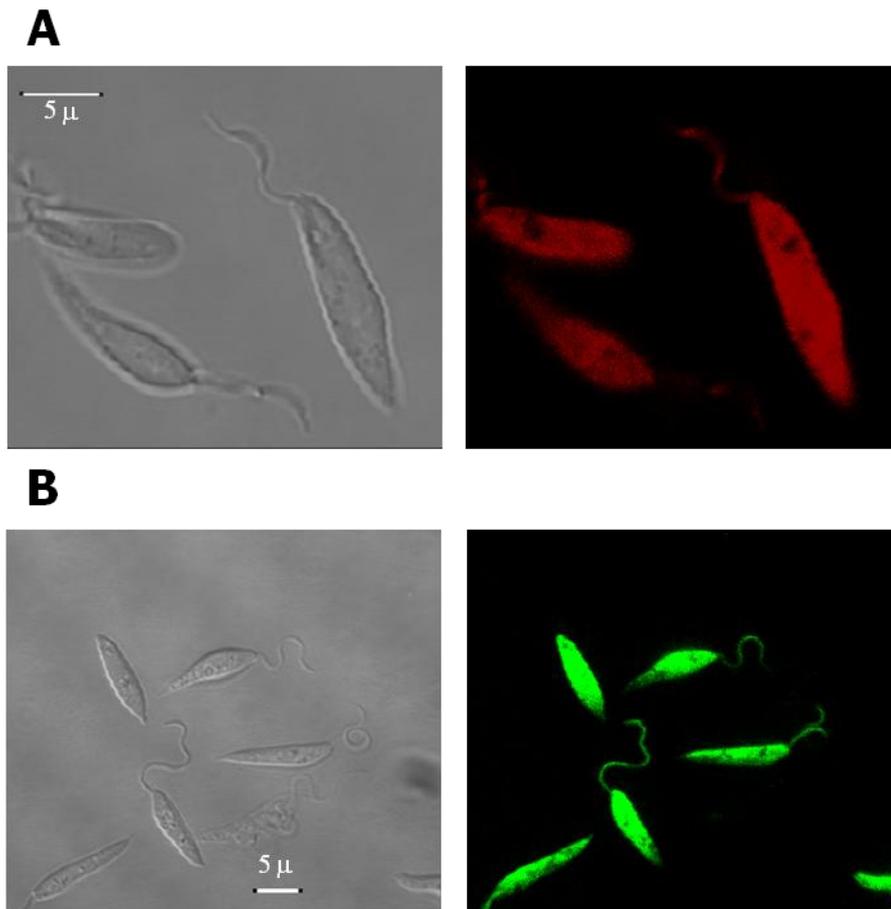


Fig. 4.20 Imagen confocal de promastigotes de *Leishmania*. A) Promastigotes de *L. infantum* JPC transfectados con el gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry.; B) Promastigotes de *L. major* transfectados con el gen que codifica para la proteína fluorescente citrina.

Los estudios previos mediante microscopía de fluorescencia muestran que ambas cepas son capaces de emitir como resultado de la excitación con láseres de longitud de onda de 516 nm/529 nm y 585 nm/610 nm para la citrina y mCherry respectivamente (Fig. 4.20) (Calvo y col, 2010). Estas cepas han sido utilizadas en la presente memoria para comprobar su validez frente a los compuestos seleccionados como inhibidores de TopIB, así como de los dos fármacos leishmanicidas utilizados como controles en los estudios preclínicos *in vitro* de los capítulos anteriores y sobre todo para comprobar si las cepas modificadas responden de la misma manera a los fármacos que las salvajes

sin modificar y así ser una alternativa válida para los estudios de cribado de compuestos químicos en sistemas de alto rendimiento.

Los resultados de la Fig. 4.21 muestran las curvas dosis-respuesta de los compuestos inhibidores de la TopIB 48 h después de su adición al medio de cultivo con promastigotes de *L. major* modificados que expresan la proteína reportera fluorescente citrina. Uno de los primeros resultados que se pueden observar a simple vista es que no fue posible detectar el efecto citotóxico del TPT. Cuando se hicieron las curvas dosis-respuesta con este análogo hidrosoluble de la CPT, se observó una fluorescencia elevada que no respondía a la concentración del fármaco. La explicación radica en las características físico-químicas del TPT que era capaz de emitir a una longitud de onda parecida a citrina y por lo tanto interfería la emisión propia de las células, sobre todo con las concentraciones más altas del tóxico.

En segundo lugar, las determinaciones se realizaron en el periodo de 48 h. Los ensayos llevados a cabo a tiempos más largos (72 y 96 h) apenas permitieron detectar diferencias entre los promastigotes controles y los tratados. La razón de esta paradoja se debe a la forma de expresión de citrina durante su permanencia en el cultivo. Los resultados de Calvo y col. (2010) presentados al XXIII Congreso de la SEEBM, muestran cómo citrina se expresa mayoritariamente en los estadios de crecimiento logarítmico temprano y medio, pero no en fases posteriores en las que la emisión de fluorescencia disminuye drásticamente.

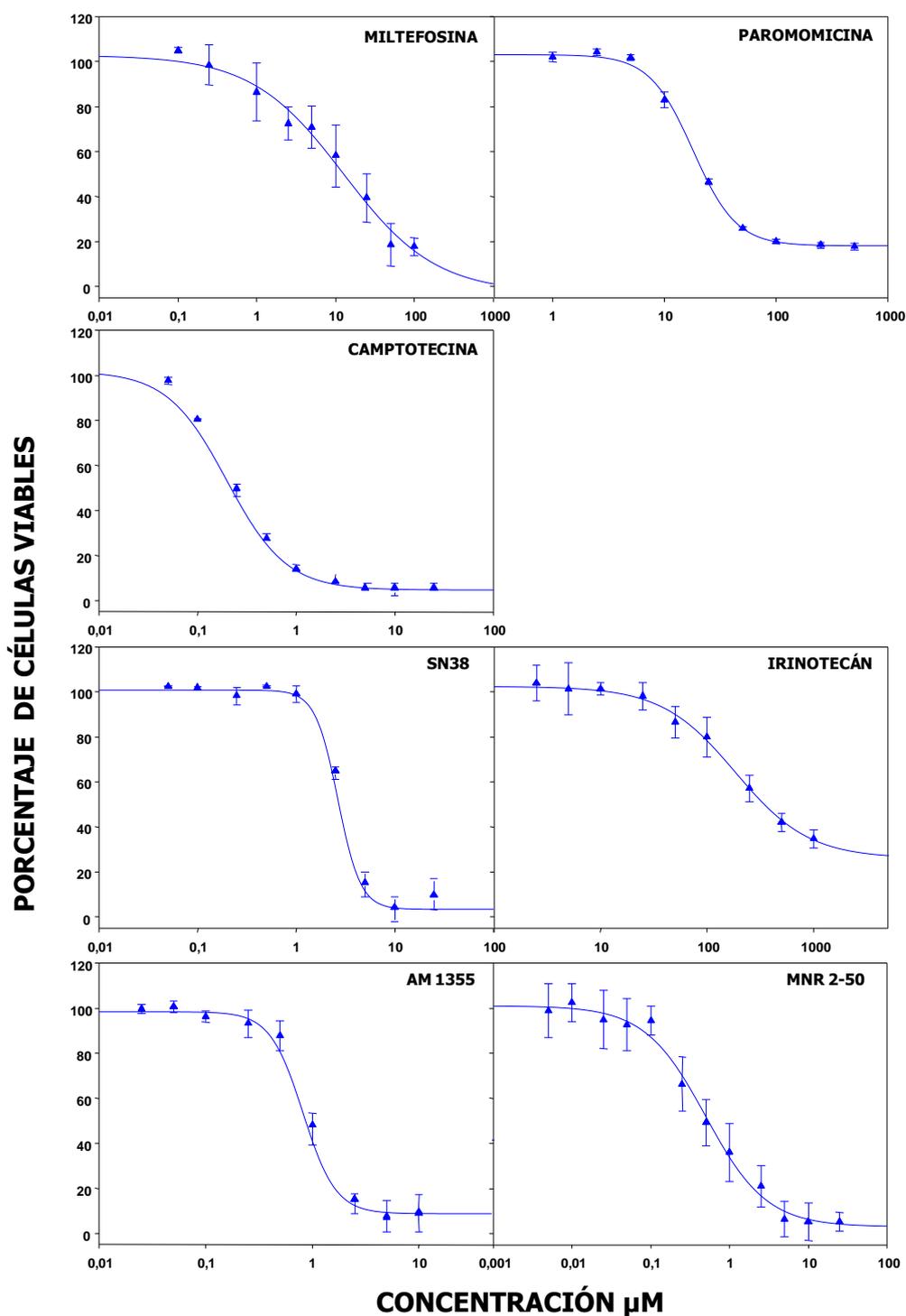


Fig. 4.21 Citotoxicidad de los inhibidores de la TopIB en promastigotes de *L. major* que sobreexpresan citrina. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a 48 h de exposición. Cada curva corresponde a los valores medios con sus correspondientes errores estándar obtenidos de tres determinaciones independientes.

Teniendo en cuenta estas dos limitaciones, los resultados de la Fig. 4.21 recogidos en términos de IC_{50} a 48 h en la Tabla 4.7 demuestran sensibilidades muy parecidas entre los promastigotes no transfectados y los transfectados para todos los compuestos analizados a las 48 h. La posibilidad de hacer réplicas múltiples de cada concentración en la misma placa de microtitulación y la amplia gama de concentraciones ensayadas, originó curvas con coeficientes de regresión mucho mejores que las obtenidas mediante recuento en Coulter, lo que representa una ventaja metodológica importante a la hora de validar los resultados experimentales.

De la misma manera que para *L. major* sin modificar, los compuestos más activos fueron las dos indenoisoquinolinas y la CPT con valores de IC_{50} 48 h inferiores a 1 μ M. Por su parte, el irinotecán fue efectivo con una IC_{50} de 183,86 μ M mientras que su metabolito, el SN38, arrojó un valor de IC_{50} 48 h de 2,65 μ M. Los dos compuestos usados como controles positivos, miltefosina y paromomicina, fueron efectivos a concentraciones de IC_{50} a 48 h de 12,61 μ M y 18,02 μ M respectivamente.

Sin embargo, ninguno de los dos inconvenientes indicados al comienzo se observaron con los promastigotes de *L. infantum* JPC transformados de forma estable con el gen que codifica para la proteína fluorescente roja mCherry (Fig. 4.22).

Por un lado, la fluorescencia intrínseca del TPT no interfirió con la emitida por las células transformadas, por lo que este compuesto y todos los demás pudieron ser evaluados sin interferir con la longitud de onda de emisión de la proteína del parásito. En segundo lugar, la expresión de mCherry durante el cultivo de promastigotes de *L. infantum* perduró durante un periodo mayor, de manera que pudieron realizarse ensayos a 72 y 96 h post- exposición.

Las gráficas de la Fig. 4.22 muestran los resultados obtenidos con los 6 inhibidores de TopIB y los dos compuestos utilizados como controles positivos. Reiteradamente, las dos indenoisoquinolinas y más concretamente MNR 2-50, fueron los compuestos más activos con valores de IC_{50} a 48 h por debajo de 1 μ M. En este caso, la CPT mostró igualmente valores de IC_{50} muy bajos y en el mismo rango que la indenoisoquinolina más potente. En segunda instancia, AM1355 y SN38 tuvieron IC_{50} próximos a 1 μ M y finalmente el TPT con una

IC₅₀ entre 13,12 y 30,08 μM fue el compuesto con menor actividad citotóxica analizado, con excepción del pro-fármaco irinotecán. En este caso las IC₅₀ obtenidos para los dos compuestos de referencia, paromomicina y miltefosina, fueron muy parecidas a las obtenidas en promastigotes sin modificar (IC₅₀ a 48 h de paromomicina=34,79 μM e IC₅₀ a 48 h de miltefosina=21,39 μM).

Tabla 4.7 Cálculo de las IC₅₀ a las 48 h de los compuestos seleccionados en promastigotes de *L. major* modificados con el gen que codifica para la proteína reportera fluorescente citrina y de las IC₅₀ a las 48, 72 y 96 h de los compuestos seleccionados en promastigotes de *L. infantum* JPC modificados con el gen que codifica para la proteína reportera fluorescente mCherry. Los valores de IC₅₀ se han calculado a partir de las curvas de la Fig. 4.21 y 4.22 respectivamente, realizadas por triplicado en experimentos independientes después de realizar un ajuste no lineal con el programa SigmaPlot®.

	<i>L. major</i> citrine	<i>L. infantum</i> mCherry		
	IC ₅₀ 48 h	IC ₅₀ 48 h	IC ₅₀ 72 h	IC ₅₀ 96 h
MILTEFOSINA	12,60 μM± 2,97	21,39 μM± 2,28	13,04 μM± 1,80	13,88 μM± 2,49
PAROMOMICINA	18,01 μM± 0,91	34,79 μM± 1,84	33,80 μM± 3,52	69,10 μM± 9,92
CAMPTOTECINA	0,19 μM± 0,01	0,17 μM± 0,08	0,22 μM± 0,07	0,33 μM± 0,04
TOPOTECÁN		13,12 μM± 0,68	16,17 μM± 1,13	30,08 μM± 8,46
SN38	2,65 μM± 0,28	1,70 μM± 0,35	1,38 μM± 0,44	1,09 μM± 0,26
IRINOTECÁN	183,86 μM±27,36	>200 μM	>200 μM	>200 μM
AM1355	0,82 μM± 0,05	1,09 μM± 0,24	0,89 μM± 0,10	1,55 μM± 0,17
MNR 2-50	0,49 μM± 0,05	0,09 μM± 0,01	0,13 μM± 0,01	0,25 μM± 0,03

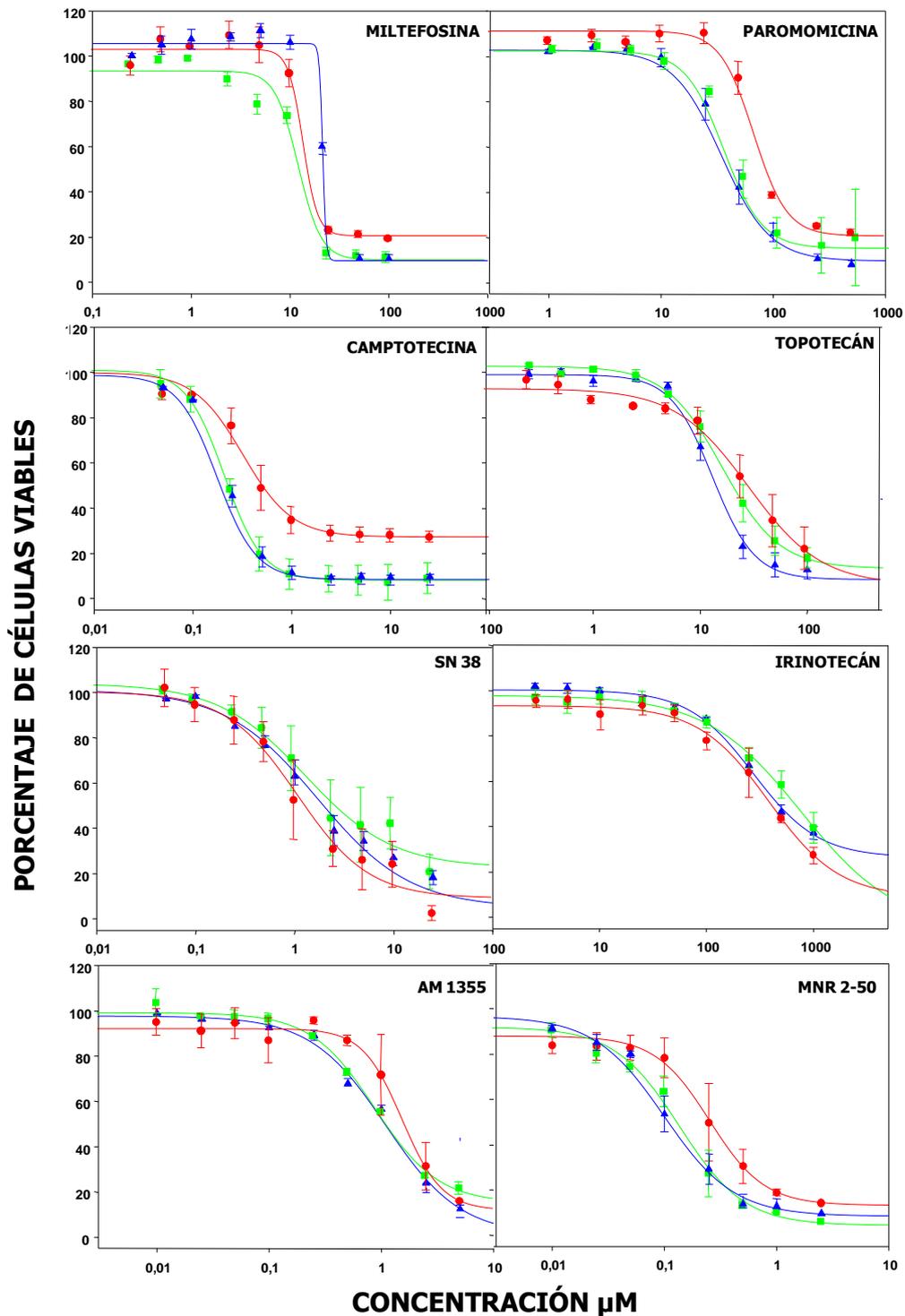


Fig. 4.22 Citotoxicidad de los inhibidores de la TopIB en promastigotes de *L. infantum* que sobreexpresan mCherry. Ensayos de relación dosis-respuesta con los compuestos seleccionados a \blacktriangle 48, \blacksquare 72 y \bullet 96 h de exposición. Cada curva corresponde a los valores medios con sus correspondientes errores estándar obtenidos de tres determinaciones independientes.

Tabla 4.8 Cálculo de los IT a las 48 h para *L. major* transfectada con la proteína fluorescente citrina y los dos tipos de células de mamíferos utilizadas en los ensayos (macrófagos RAW 264,7 y macrófagos peritoneales de ratón) de los compuestos seleccionados. Cálculo de los IT para *L. infantum* transfectada con la proteína fluorescente mCherry a las 48 h con macrófagos de RAW 264,7 y 48 y 96 h con macrófagos peritoneales de ratón respectivamente, para los compuestos seleccionados. Los valores de IT son resultado del cociente entre el valor de la IC₅₀ del cultivo de las células de mamífero y el valor de IC₅₀ del cultivo de promastigotes

	<i>L. major</i> citrina		<i>L. infantum</i> mCherry		
	IT _{48h} vs RAW 264,7	IT _{48h} vs BalB/C	IT _{48h} vs RAW 264,7	IT _{48h} vs BalB/C	IT _{96h} vs BalB/C
MILTEFOSINA	0,07	5,13	0,04	3,02	4,17
PAROMOMICINA	278,01	874,51	143,92	452,71	265,89
CAMPTOTECINA	2,163	3,28	2,41	3,67	3,94
TOPOTECÁN			0,84	0,37	0,07
SN38	4,46	0,20	6,96	0,32	0,48
IRINOTECÁN	0,19	1,03	0,18	0,95	1
AM1355	9,91	58,99	7,45	44,38	25,01
MNR2-50	0,37	116,65	2,06	635,11	109,77

4.6. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LdTopIB EN INFECCIONES DE MACRÓFAGOS CON AMASTIGOTES AXÉNICOS

Se comprobó el efecto terapéutico de los inhibidores de las TopIB en infecciones de macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes axénicos de *L. pifanoi*, antes de considerar la posibilidad de que estos compuestos pudieran tener capacidad terapéutica en leishmaniosis experimentales. En un principio, llevamos a cabo intentos previos de infectar macrófagos RAW 264,7 con dichos amastigotes axénicos, pero los bajos valores de IT que mostraban compuestos como la miltefosina y las

indenoisoquinolinas con esta línea celular, nos alentaron a cambiar la diana de la infección, utilizando macrófagos peritoneales extraídos de ratón, que al ser células quiescentes no tumorales, mostraban IT superiores para los compuestos citados.

El diseño experimental descrito en la sección material y métodos consistió en la infección de 50.000 macrófagos por pocillo de LabTeck® 24 h después de su aislamiento, con una relación de 5 amastigotes axénicos por macrófago. Transcurridas 4 h de incubación a 32 °C se lavaron los pocillos para retirar los parásitos que no habían internalizado y las placas de incubaron en las mismas condiciones durante 48 h y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos analizados, para permitir el desarrollo de la infección. Finalmente, los LabTeck® fueron teñidos con una solución de Giemsa y contados con ayuda de un microscopio.

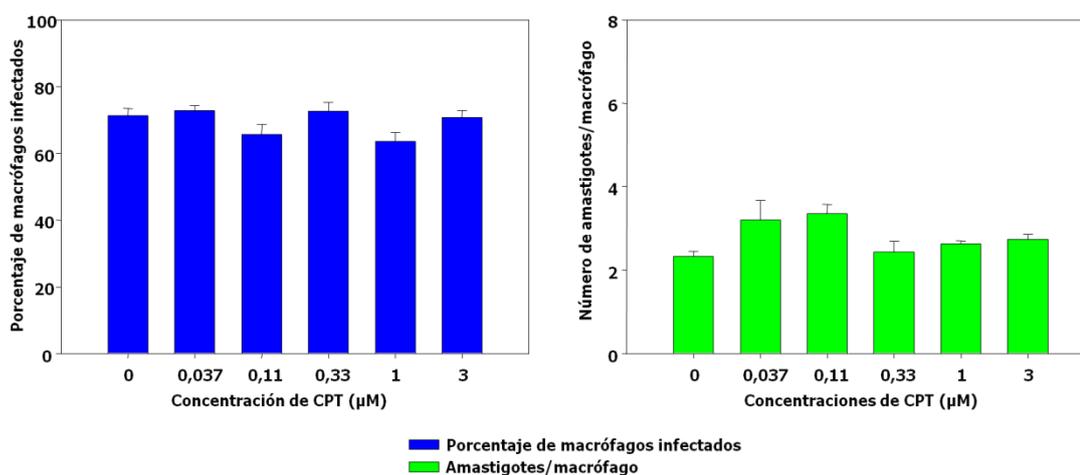


Fig. 4.23 Efecto de la CPT sobre infecciones *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes de *L. pifanoi*. A) Efecto de la CPT sobre el porcentaje de macrófagos infectados.; B) Efecto de la CPT sobre el número de amastigotes por macrófago infectado.

Se determinó en cada pocillo el porcentaje de macrófagos infectados y el número de amastigotes por macrófago, en función de las concentraciones de fármaco utilizadas en cada ensayo. En la Fig. 4.23 se observa el efecto de la CPT en infecciones experimentales de *L. pifanoi* 48 h después de la adición del fármaco. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de

macrófagos parasitados (que ascendió a casi el 80%), ni en el número de amastigotes por macrófago infectado (que llegó a $3,34 \pm 0,22$) entre las distintas concentraciones de CPT.

Los resultados para el TPT y el SN38 fueron igualmente desalentadores. El TPT no pudo evitar que el porcentaje de macrófagos infectados disminuyera, ni se observó un consistente efecto antiproliferativo dentro de los macrófagos infectados, ya que a pesar de que, globalmente el número parecía disminuir, los resultados a la concentración 0,33 μM contradecían este efecto (Fig. 4.24).

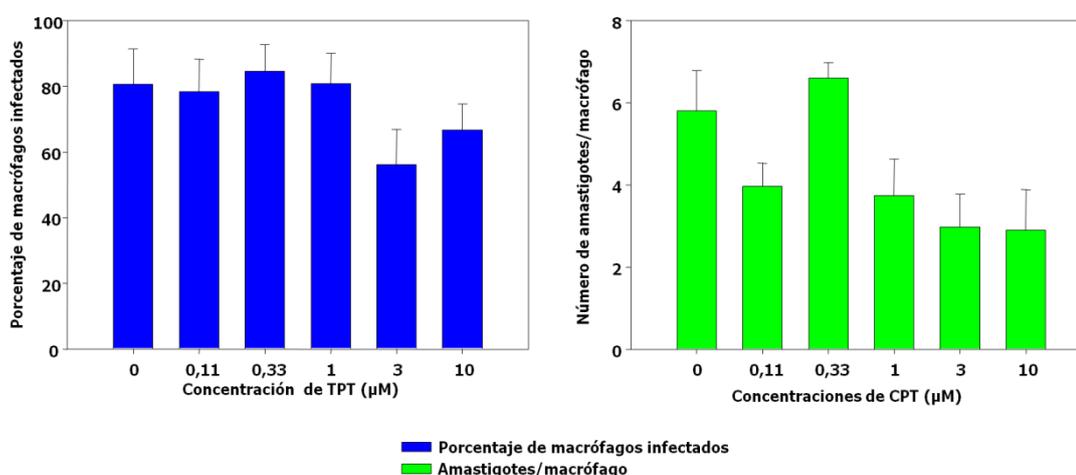


Fig. 4.24 Efecto de la TPT sobre infecciones *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes de *L. pifaoi*. A) Efecto de la TPT sobre el porcentaje de macrófagos infectados.; B) Efecto de la TPT sobre el número de amastigotes por macrófago infectado.

El SN38, metabolito del irinotecán produjo una pequeña reducción del porcentaje de macrófagos infectados apenas del 15%, así como una disminución en el número de amastigotes por macrófago de aproximadamente el 60% a una concentración de 3 μM , como se observa en la Fig. 4.25. Este fue el único inhibidor de la LdTopIB que evitó con cierta eficacia la multiplicación de los amastigotes en el interior de los macrófagos a las 48 h de exposición, ya que ninguna de las indenoisoquinolinas estudiadas, AM1355 (Fig. 4.26) y MNR 2-50 (Fig. 4.27), pareció alterar alguno de los dos parámetros medidos en el estudio.

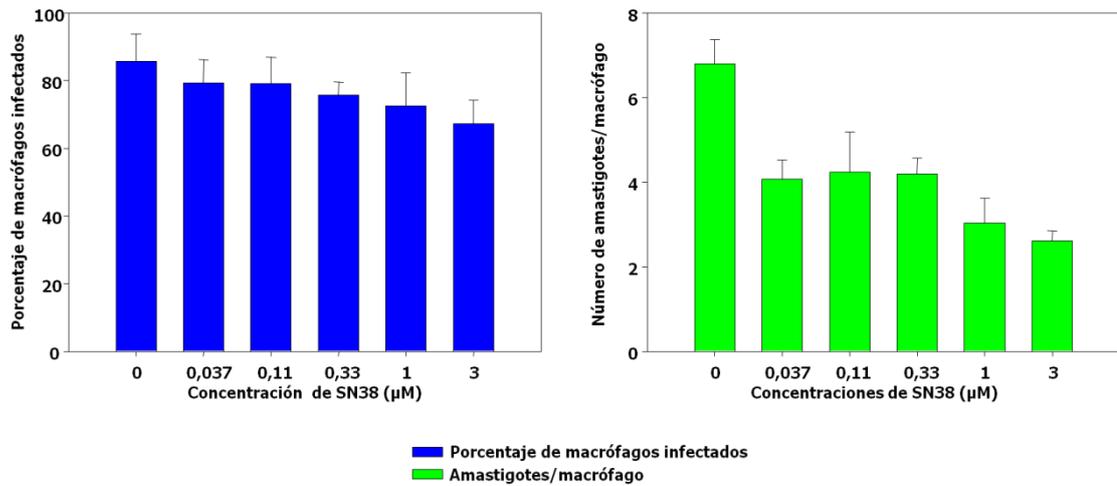


Fig. 4.25 Efecto de la SN38 sobre infecciones *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes de *L. pifaoi*. A) Efecto de la SN38 sobre el porcentaje de macrófagos infectados.; B) Efecto de la SN38 sobre el número de amastigotes por macrófago infectado.

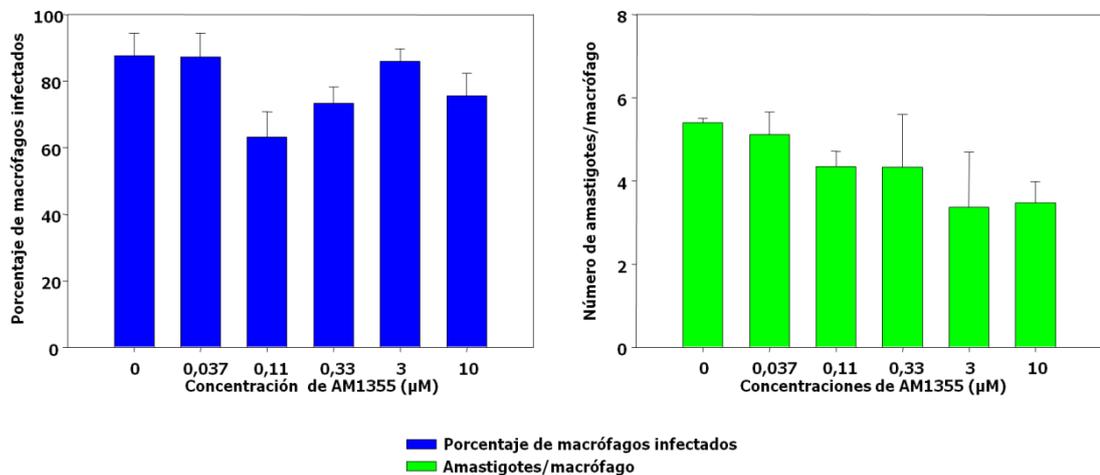


Fig. 4.26 Efecto de la AM1355 sobre infecciones *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes de *L. pifaoi*. A) Efecto de la AM1355 sobre el porcentaje de macrófagos infectados.; B) Efecto de la AM1355 sobre el número de amastigotes por macrófago infectado.

Como control positivo de la acción leishmanicida en macrófagos infectados *in vitro*, utilizamos la miltefosina a las concentraciones señaladas en la Fig. 4.28. Tanto el porcentaje de macrófagos infectados como el número de amastigotes por macrófago se redujeron cuantitativamente tal y como se observa en la fotografía de la Fig. 4.29 que muestra un campo con macrófagos infectados en ausencia de tratamiento (Panel A) y otro con macrófagos infectados y tratados con miltefosina a la concentración de 10 μM . Las gráficas de la Fig. 4.28 demuestran que el porcentaje de macrófagos parasitados se redujo en una relación dosis/respuesta hasta menos del 20% a una concentración de 30 μM de miltefosina. Por su parte, el número de amastigotes por macrófago disminuyó más del 50% a esa misma concentración.

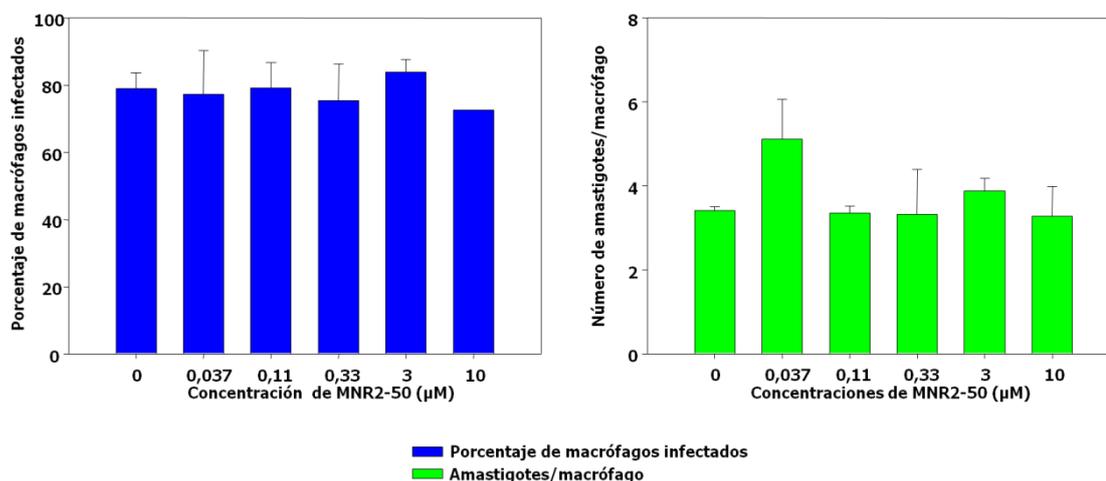


Fig. 4.27 Efecto de la MNR 2-50 sobre infecciones *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes de *L. pifaoi*. A) Efecto de la MNR 2-50 sobre el porcentaje de macrófagos infectados.; B) Efecto de la MNR 2-50 sobre el número de amastigotes por macrófago infectado.

Se pueden hacer varias reflexiones al respecto sobre los resultados obtenidos en estos experimentos. La primera es que los derivados de la CPT presentaban bajos valores de IT por lo que permiten un rango muy estrecho para su utilización sobre infecciones *in vitro*, sin generar daño a los macrófagos peritoneales. De hecho, las concentraciones utilizadas en los ensayos fueron menores a 10 μM , concentración que, con excepción de las

indenoisoquinolinas, estaba en el compromiso de la toxicidad calculada en los experimentos anteriores.

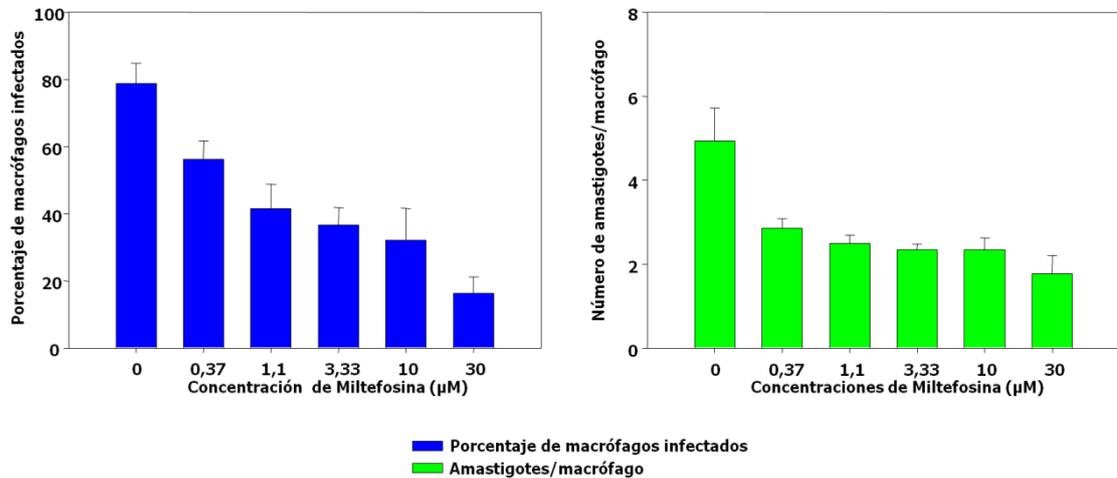


Fig. 4.28 Efecto de la Miltefosina sobre infecciones *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con amastigotes de *L. pifanoi*. A) Efecto de la Miltefosina sobre el porcentaje de macrófagos infectados.; B) Efecto de la Miltefosina sobre el número de amastigotes por macrófago infectado.

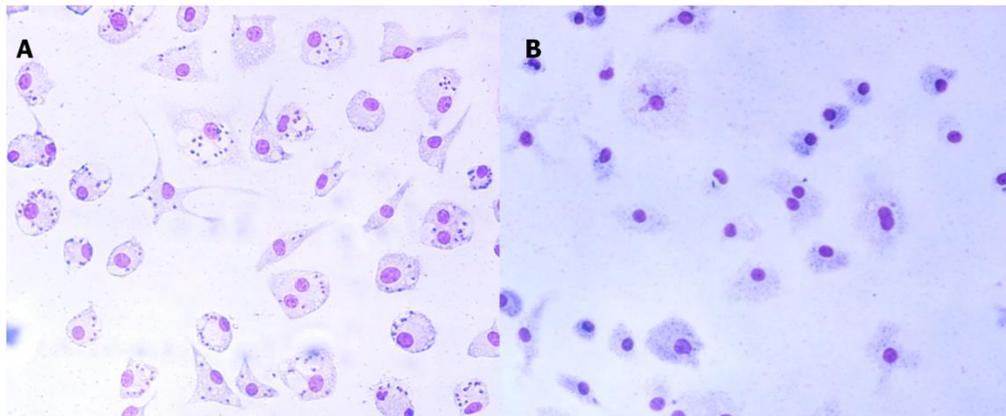


Fig. 4.29 Tinción Giemsa de infección *in vitro* de macrófagos peritoneales con amastigotes axénicos de *L. pifanoi*. A) Macrófagos infectados tratados con el vehículo en el que se presenta la miltefosina (control).; B) Macrófagos infectados tratados con 10 µM de miltefosina durante 48 h.

Una segunda reflexión es que los compuestos, al añadirse cuando la infección ya ha tenido lugar, difícilmente van a destruir las células parasitarias. Esto se ve reflejado en el porcentaje de macrófagos infectados que apenas varía por la adición del fármaco con excepción de la miltefosina demostrando que aquellos macrófagos en los que se ha establecido la infección no van a ser destruidos por la presencia del compuesto químico.

Dado que estos compuestos tienen un carácter antiproliferativo, pensamos que el parámetro ideal para ser evaluado correspondería al número de amastigotes por macrófago, por encima del porcentaje de células infectadas. Sin embargo, con excepción del SN38, que previno significativamente el crecimiento de los parásitos dentro de las células, el resto se mostró incapaz de modificar su desarrollo de una manera eficaz. Estos resultados, a pesar de no ser alentadores, no impidieron que realizásemos un último ensayo *in vivo* en infecciones experimentales murinos.

4.6. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE TopIB SOBRE INFECCIONES EXPERIMENTALES *IN VIVO*

Dado los buenos resultados obtenidos *in vitro* con las dos indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50 en promastigotes de las tres especies de *Leishmania* y sus buenos índices terapéuticos con macrófagos peritoneales murinos (aunque no con macrófagos tumorales RAW 264,7), decidimos realizar un ensayo en un modelo de LV con *L. infantum*, el agente patógeno presente en nuestro país. Los ensayos fueron llevados a cabo por miembros del equipo del Dr José M^a Requena en el animalario P2 del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBSO) de Madrid. Para ello, se utilizaron promastigotes de *L. infantum* estacionarios (transcurridos 7 días después de iniciar el subcultivo) que se inocularon por vía intravenosa en la vena central de la cola del ratón, en una cantidad de 10^7 células. Se infectaron cinco ratones que sirvieron como control positivo, a los que sólo se trató con el vehículo del fármaco, esto es, una disolución de DMSO. A los grupos de animales tratados con las indenoisoquinolinas se les administró el fármaco a partir del día 14 de la infección según el protocolo que aparece en la sección de materiales y métodos.

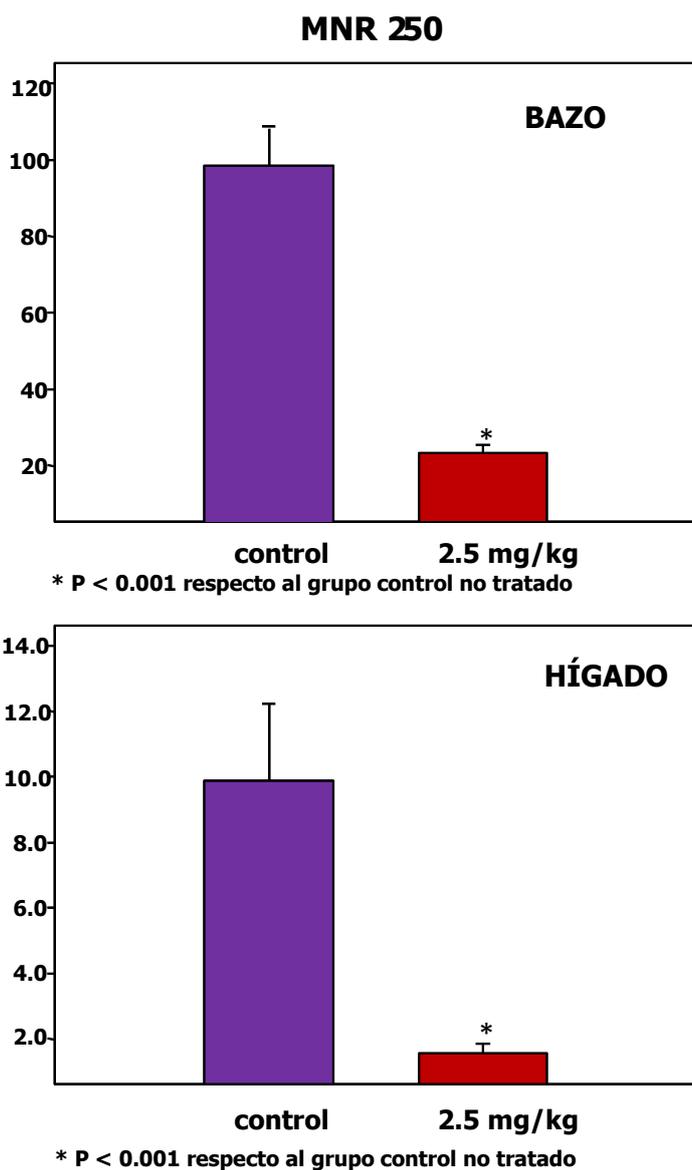


Fig. 4.30 Carga parasitaria calculada mediante el método de la dilución límite a partir de los órganos extraídos de ratones, infectados con promastigotes estacionarios de *L. infantum* tratados con el vehículo en el que se presenta el fármaco (control) y una dosis de 2,5 mg/Kg de peso de la indenoisoquinolina MNR 2-50.

La indenoisoquinolina MNR 2-50 se administró a una dosis de 2,5 mg/Kg de peso vivo en 500 µL de solución DMSO/H₂O a partir del día establecido durante dos semanas consecutivas, aplicándose 7 dosis totales en días alternos (según material y métodos). El componente AM1355 no mostró tan

buenos resultados y por eso se hizo un segundo ensayo a una dosis doble de 5 mg/Kg de peso vivo con la misma posología que el anterior, tal y como veremos más adelante.

Cinco días después de las dos semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados eutanásicamente y se procedió a la extracción de los bazo e hígados para determinar su carga parasitaria.

Las cargas parasitarias se determinaron mediante el método de la dilución límite (Buffet y col., 1995; Carrión y col., 2006), evaluando el número de promastigotes viables desarrollados en la máxima dilución, crecidos diez días después de la extracción del órgano y su cultivo en el medio adecuado respecto al peso en gramos de hígado o bazo. Los resultados de la Fig. 4.30 muestran la carga parasitaria de los ratones tratados con MNR 2-50 después de ser infectados con 10^7 promastigotes de *L. infantum* durante dos semanas a una dosis de 2,5 mg/Kg de peso. Se puede observar una reducción significativa ($p < 0,001$) de más del 80% en el bazo y más del 90% en el hígado con respecto al control, tratado únicamente con el vehículo del fármaco. Esta reducción tan significativa supera las obtenidas para otros fármacos experimentales como la CPT (Proulx y col., 2003), pentamidinas, (Escobar y col., 2001) y la paromomicina (Aguiar y col., 2010).

Se realizó el mismo tipo de ensayo con la indenoisoquinolina AM1355 utilizando la misma dosis (2,5 mg/Kg de peso) y una dosis doble (5 mg/Kg de peso). La posología no se modificó. Dos semanas después de la infección se administraron 7 dosis totales en días alternos por vía IP, obteniéndose las gráficas de la Fig. 4.31. En ellas se observa una remisión importante en el bazo (más del 30%) pero no en el hígado (apenas un 20%) con la dosis de 2,5 mg/Kg.

Estos resultados en principio, pueden aconsejarnos que una vehiculización más apropiada del fármaco encapsulado en liposomas u otras nanopartículas podría mejorar el perfil terapéutico en tanto en cuanto no alteren la toxicidad del mismo. Hay que indicar que los animales tratados no mostraron síntomas de intoxicación patogénica, lo cual es consecuente con la poca toxicidad mostrada en los ensayos *in vitro*. Los estudios *in vivo*, podrían demostrar la viabilidad de estas moléculas u otras semejantes, en el tratamiento de la

leishmaniosis, tanto visceral como cutánea, validando la inhibición de la TopIB como una prometedora diana terapéutica para estos procesos proliferativos.

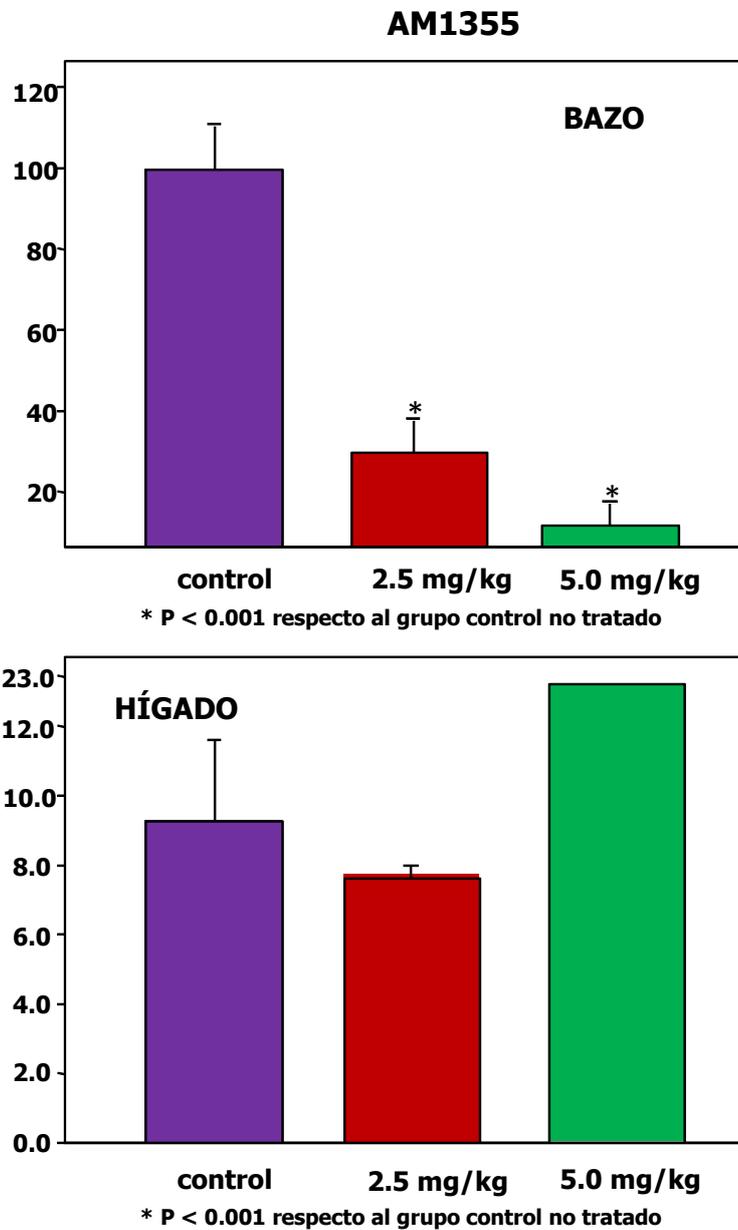


Fig. 4.31 Carga parasitaria calculada mediante el método de la dilución límite a partir de los órganos extraídos de ratones, infectados con promastigotes estacionarios de *L. infantum*, tratados con el vehículo en el que se presenta el fármaco (control), una dosis de 2,5 mg/Kg y otra segunda dosis de 5 mg/Kg de peso vivo de la indenoisoquinolina AM1355.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Los inhibidores de las TopIB han demostrado tener un buen efecto citotóxico frente a promastigotes de *Leishmania*. La CPT, SN38 y las dos indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50, fueron capaces de prevenir el crecimiento de los parásitos a concentraciones inferiores a 1 μM , muy por debajo de los dos leishmanicidas de uso en clínica, miltefosina y paromomicina. Sin embargo, los índices terapéuticos de la CPT, TPT y SN38 fueron menores que 1 a diferencia de las indenoisoquinolinas que presentaron elevados índices terapéuticos.
2. Todos los compuestos utilizados demostraron una gran capacidad para inhibir la LdTopIB *in vitro* y de crear complejos enzima-ADN *in vivo*. Los cinco compuestos analizados fueron capaces de inhibir selectivamente la LdTopIB de *Leishmania* a concentraciones submicromolares con una mayor potencia que la humana. Además, todos ellos produjeron una cantidad significativa de complejos precipitables en SDS/K, lo que los identifica como inhibidores de tipo I de TopIB.
3. Las dos indenoisoquinolinas AM1355 y MNR 2-50 utilizadas en infecciones experimentales *in vivo* de LV en ratones Balb/C presentaron unos resultados que demostraron una reducción de la carga parasitaria de bazo e hígado muy significativa para el MNR 2-50 y una disminución esplénica pero no hepática en el caso de AM1355, lo que indica un buen potencial quimioterápico de estos dos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Achterberg V, Gercken G. (1987) *Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on Leishmania donovani promastigotes*. Mol. Biochem. Parasitol. 23:117-122.

Aguiar M.G., Pereira A.M., Fernandes A.P., Ferreira L.A. (2010) *Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 4699-4704

Aguiar M.G., Silva D.L., Nunan F.A., Nunan E.A., Fernandes A.P., Ferreira L.A. (2009) *Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with Leishmania (Leishmania) major leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burden*. J. Antimicrob. Chemother. 64: 1234-1240.

Alessandri M., Beretta G.L., Ferretti E., Mancina A., Khobta A., Capranico G. (2004) *Enhanced CPT sensitivity of yeast cells and selective relaxation of Ga14 motif-containing DNA by novel Gal4-topoisomerase I fusion proteins*. J. Mol. Biol. 337(2): 295-305.

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*. J. Immunol. 161:6794-6801.

Alvar J. (2001) *Las Leishmaniasis De la Biología al Control Laboratorios*. Intervet S.A, 200pp.

Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Den Boer M., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Ter Horst R., López-Vélez R., Moreno J. (2008) *The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years*. Clin. Microbiol. Rev. 21:334-359.

Antoine J.C., Prina E., Lang T., Courret N. (1998) *The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages*. Trends Microbiol. 6:392-401.

- Antony S., Agama K.K., Miao Z.H., Hollingshead M., Holbeck S.L., Wright M.H., Varticovski L., Nagarajan M., Morrel A., Cushman M., Pommier Y. (2006) *Bisindenoisoquinoline bis-1,3-{(5,6-dihydro-5,11-diketo-11H-indeno[1,2-c]isoquinoline)-6-propylamino}propane bis(trifluoroacetate) (NSC 727357), a DNA intercalator and topoisomerase inhibitor with antitumor activity.* Mol. Pharmacol. 70:1109-1120.
- Bakshi R.P., Shapiro T.A. 2004 *RNA interference of Trypanosoma brucei topoisomerase IB: both subunits are essential.* Mol. Biochem. Parasitol. 136: 249-255.
- Bakshi R.P., Sang D., Morrell A., Cushman M., Shapiro T.A. (2009) *Activity of indenoisoquinolines against African trypanosomes.* Antimicrob. Agents Chemother. 53: 123-128.
- Balaña-Fouce R., García-Estrada C., Pérez-Pertejo Y., Reguera R.M. (2008) *Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate Leishmania major.* BMC Microbiol. 8: 113.
- Balaña-Fouce R., Ordóñez D., Alunda J.M. (1989) *Putrescine transport system in Leishmania infantum promastigotes.* Mol. Biochem. Parasitol. 35:43-50.
- Balaña-Fouce R., Redondo C.M., Pérez-Pertejo Y., Díaz González R., Reguera R.M. (2006) *Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I.* Drug Discov. Today 11:733-740.
- Balaña-Fouce R., Reguera R.M., Cubría J.C., Ordóñez D. (1998) *The pharmacology of leishmaniasis.* Gen Pharmacol. 30: 435-443.
- Bandyopadhyay P., Ghosh D.K., De A., Ghosh K.N., Chaudhuri P.P., Das P., et al. (1991) *Metacyclogenesis of Leishmania spp.: species-specific in vitro transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles.* Parasitology 77:411-416.
- Basselin M., Robert-Gero M. (1998) *Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant Leishmania.* Parasitol Res. 84:78-83.
- Berman J. (2003) *Current treatment approaches to leishmaniasis.* Curr. Opin. Infect. Dis. 16:397-401.

- Bernier R., Barbeau B., Tremblay M.J., Olivier M. (1998) *The lipophosphoglycan of Leishmania donovani up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements*. J. Immunol. 160:2881-2888.
- Beverley S., Clayton C.E. (1993) *Transfection of Leishmania and Trypanosoma brucei by electroporation*. Meth. Mol. Biol. 21: 333-348.
- Bjornsti M., Fertala J. (1999) *Overexpression and purification of DNA topoisomerase I from yeast*. Meth. Mol. Biol. 94: 179-186.
- Bodley A.L., Shapiro, T.A. (1995) *Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3726-3730.
- Bodley A., Chakraborty A.K., Xie S., Burri C., Shapiro T.A. (2003) *An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 7539-7544.
- Bodley A., Wani M.C., Wall M.E., Shapiro T.A. (1995) *Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. Structure-activity correlations*. Biochem. Pharmacol. 50: 937-942.
- Broccoli S., Marquis J.F., Papadopoulou B., Olivier M., Drolet, M. (1999) *Characterization of a Leishmania donovani gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase*. Nucleic Acids Res. 27: 2745-2752.
- Carballeira N.M., Cartagena M.M., Fernández Prada C., Fernández-Rubio C., Balaña-Fouce R. (2009b) *Total synthesis and antileishmanial activity of the natural occurring acetylenic fatty acids 6-heptadecynoic acid and icosynoic acid*. Lipids 44: 953-956.
- Carballeira N.M., Montano N., Balaña-Fouce R., Fernández-Prada C. (2009a) *First total synthesis and antiprotozoal activity of (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge Polymastia penicillus*. Chem. Phys. Lipids 161: 38-43.
- 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: 747-757.

- Chakraborty A., Majumder H.K. (1988) *Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of Leishmania donovani*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 152: 605-611.
- Champoux J.J. (2000) *Structure-based analysis of the effects of camptothecin on the activities of human topoisomerase I*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 922: 56-64.
- Champoux J.J. (2001) *DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism*. Annu. Rev. Biochem. 70: 369-413.
- Chares H., Matlashewski G. (1994) *Developmental gene expression in Leishmania donovani: differential cloning and analysis of an amastigote-stage gene*. Mol. Cell. Biol. 14:2975-2984.
- Cheesman S., McAleese S., Goman M., Johnson D., Horrocks P., Ridley R.G., Kilbey B.J. (1994) *The gene encoding topoisomerase II from Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Res. 22: 2547-2551.
- Chen A., Yu C., Gatto B., Liu L.F. (1993) *DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8131-8135.
- Chirac P., Torreele E. (2006) *Global framework on essential health R&D*. Lancet 367:1560-1561.
- Chowdhury A., 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*. Mol. Med. 9: 26-36.
- Christensen M.O., Barthelmes H.U., Boege F., Mielke C. (2003) *Residues 190-210 of human topoisomerase I are required for enzyme activity in vivo but not in vitro*. Nucleic Acids Res. 31:7255-7263.
- Clemons K.V., Stevens D.A. (1998) *Comparison of fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42:899-902.

- Cohen S., Chang A.C., Hsu L. (1972) *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114.
- Corbett K.D., Berger J.M. (2004) *Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33: 95-118.
- Coulson R.M., Smith D.F.(1990) *Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of Leishmania major*.Mol.Biochem. Parasitol. 40:63-75.
- Croft S.L., Yardley V. (2002) *Chemotherapy of leishmaniasis*. Curr. Pharm. Des. 8:319-342.
- Croft S.L., Barrett M.P., Urbina J.A. (2005) *Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis*. Trends Parasitol. 21:508-512.
- Croft S.L., Neal R.A., Pendergast W., Chan J.H. (1987) *The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani*. Biochem. Pharmacol. 36:2633-2636.
- Croft S.L., Sundar S., Fairlamb A.H. (2006) *Drug resistance in leishmaniasis*. Clin. Microbiol. Rev. 19: 111-126.
- D'Arpa P., Liu L.F. (1989) *Topoisomerase-targeting antitumor drugs*. Biochim. Biophys. Acta 989: 163-177.
- Dantas-Torres F. (2006) *Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine*. Vet. Parasitol. 141:1-8.
- Das A., Dasgupta A., Sengupta T., Majumder H.K. (2004) *Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets*. Trends Parasitol. 20: 381-387.
- Das A., Dasgupta A., Sharma S., Ghosh M., Sengupta T., Bandopadhyay S., Majumder H.K. (2001) *Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from Leishmania donovani: a key molecular target in antileishmanial therapy*. Nucleic Acids Res. 29:1844-1851.

Descoteaux A., Turco S.J. (1999) *Glycoconjugates in Leishmania infectivity*. Biochim. Biophys. Acta. 1455:341-352.

Deterding A., Dungey F.A., Thompson K.A., Steverding D. (2005) *Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors*. Acta Trop. 93: 311-316.

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*. Biochem. Pharmacol. 70: 1125-1136.

Díaz González R., Pérez Pertejo Y., Ordóñez D., Balaña-Fouce R., Reguera R.M. (2007) *Deletion study of DNA topoisomerase IB from Leishmania donovani: searching for a minimal functional heterodimer*. PLoS One 2: e1177.

Díaz-González R., Pérez-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*. Biochem. Pharmacol. 76:608-619.

Díaz-González R., Pérez-Pertejo Y., Prada C. F., Fernández-Rubio C., Balaña-Fouce R., Reguera R.M. (2009) *Novel findings on trypanosomatid chemotherapy using DNA topoisomerase inhibitors*. Mini. Rev. Med. Chem. 9:674-686.

Eibl H., Unger C. (1990) *Hexadecylphosphocoline: a new and selective antitumor drug*. Cancer Treat. Rev. 17: 233-242.

Escobar P., Yarley V., Croft S.L. (2001) *Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome and sodium stibogluconate (Pentostam) in Leishmania donovani immunodeficient SCID mice*. Antimicrob. Agents Cheother. 45: 1872-1875.

Folgueira C., Martínez-Bonet M., Requena J.M. (2010) *The Leishmania infantum PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis*. BMC Res. Notes 3:13.

Forterre P., Gribaldo S., Gadelle D., Serre M.C. (2007) *Origin and evolution of DNA topoisomerases*. Biochimie 89:427-446.

- Fragoso S.P., Goldenberg S. (1992) *Cloning and characterization of the gene encoding Trypanosoma cruzi DNA topoisomerase II*. Mol. Biochem. Parasitol. 55: 127-134.
- García-Estrada C., Prada C.F., Fernández-Rubio C., Rojo-Vázquez F., Balaña-Fouce R. (2010) *DNA topoisomerases in apicomplexan parasites: promising targets for drug discovery*. Proc R. Soc. B 277: 1777-1787.
- Guha-Niyogi A., Sullivan D.R., Turco S.J. (2001) *Glycoconjugate structures of parasitic protozoa*. Glycobiology 11:45R-59R.
- Ha D.S., Swarcz J., Turco S., Beverley S. (1996) *Use of green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 77: 57-64.
- Hammond D.J., Gutteridge W.E. (1984) *Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae*. Mol. Biochem. Parasitol. 13:243-261.
- Hanahan D. (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Handman E. (1999) *Cell biology of Leishmania*. Adv. Parasitol. 44: 1-39.
- Handman E. (2001) *Leishmaniasis: current status of vaccine development*. Clin. Microbiol. Rev. 14:229-243.
- Hanke T., Ramiro M.J., Trigueros S., Roca J., Larraga V. (2003) *Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from Leishmania infantum. A new potential target for anti-parasite drugs*. Nucleic Acids Res. 31: 4917-4928.
- Hazra B., Saha A.K., Ray R., Roy D.K., Sur P., Banerjee A. (1987) *Antiprotozoal activity of diospyrin towards Leishmania donovani promastigotes in vitro*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 738-741.
- Heby O., Persson L., Rentala M. (2007). *Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas disease and Leishmaniasis*. Amino Acids. 33:359-366.
- Hutchens M., Luker G.D. (2007) *Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases*. Cell Microbiol. 9: 2315-2322.

- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. (1983) *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations*. J. Bacteriol. 153: 163-168.
- 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*. Exp. Parasitol. 112: 21-30.
- Johnson R., Cubría J.C., Reguera R.M., Balaña-Fouce R. Ordóñez D. (1998) *Interaction of cationic diamidines with Leishmania infantum DNA*. Biol. Chem. 379: 925-930.
- Khamesipour A., Rafati S., Davoudi N., Maboudi F., Modabber F. (2006) *Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview*. Indian J. Med. Res. 123:423-438.
- Klowden M.J., Lea A.O. (1978) *Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by Aedes aegypti (L.)*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:827-831.
- Kohn K.W., Shao R.G., Pommier Y. (2000) *How do drugs-induced topoisomerase I-DNA lesions signal to the molecular interaction network that regulates cell cycle checkpoints, DNA replication, and DNA repair?*. Cell Biochem. Biophys. 33(2): 175-180.
- Kollmannsberger C., Mross K., Jakob A., Kanz L., Bokemeyer C. (1999) *Topotecan - a novel topoisomerase I inhibitor: pharmacology and clinical experience*. Oncology 56: 1-12.
- Kubar J., Marty P., Lelièvre A., Quaranta J.F., Staccini P., Caroli-Bosc C., Le Fichoux Y. (1998) *Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts*. AIDS. 12:2147-2153.
- Kulikowicz T., Shapiro T.A. (2006) *Distinct genes encode type II Topoisomerases for the nucleus and mitochondrion in the protozoan parasite Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. 281:3048-3056.
- Lainson R., Shaw J.J., Silveira F.T. (1987) *Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81:702-703.

- Langford C.K., Burchmore R.J., Hart D.T., Wagner W., Landfear S.M. (1994) *Biochemistry and molecular genetics of Leishmania glucose transporters*. Parasitology 108:73-83
- Li C.J., Averboukh L., Pardee A.B. (1993) *b-Lapachone, a novel DNA-topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin*. J. Biol. Chem. 268: 22463-22468.
- Li J., Sutterwala S., Farrell J.P. (1997) *Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production*. Infect. Immun. 65:3225-3230.
- Lisby M., Olesen J.R., Skouboe C., Krogh B.O., Straub T., Boege F., Velmurugan S., Martensen P.M., Andersen A.H., Jayaram M., Westergaard O., Knudsen B.R. (2001) *Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation*. J. Biol. Chem. 276: 20220–20227.
- Liu L.F., Desai S.D., Li T.K., Mao Y., Sun M., Sim S.P. (2000) *Mechanism of action of camptothecin*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 922: 1-10.
- Lodge R., Descoteaux A. (2008) *Leishmania invasion and phagosome biogenesis*. Subcell. Biochem. 47: 174-181.
- Lucumi A., Robledo S., Gama V., Saravia N.G. (1998) *Sensitivity of Leishmania viannia panamensis to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA protein complexes*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1990-1995.
- Luque-Ortega J.R., Rivas L. (2007) *Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:1327-1332.
- Marquins JF., Hardy I., Oliver M. (2005). *Topoisomerase I amino acid substitutions. Gly185 Arg and Asp325 Glu, confer camptothecin resistance in Leishmania donovani*. Antimicrob. Agents. Chemoter. 48:1441-1446.
- Marr J.J., Berens R.L. (1983) *Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic trypanosomatidae*. Mol. Biochem. Parasitol. 7: 339-356.

- Martin S., McCoubrey W.K. Jr., McConaughy B.L., Young L.S., Been M.D., Brewer B.J., Champoux J.J. (1983) *Multiple forms of rat liver type I topoisomerase*. Meth. Enzymol. 100: 137-144.
- Mehta S., Huang R., Yang M., Zhang X., Kolli B., Chang K., Hoffman R.M., Goto Y., Badaro R., Schooley R. (2008) *Real-time in vivo green fluorescent protein imaging of murine leishmaniasis model as a new tool for Leishmania vaccine and drug discovery*. Clin. Vaccine Immunol. 15: 1764-1770.
- Meng L.H., Liao Z.Y., Pommier Y. (2003) *Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy*. Curr. Top. Med Chem. 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 Med. 67: 623-627.
- Miró G., Cardoso L., Pennisi M.G., Oliva G., Baneth G. (2008) *Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two*. Trends Parasitol. 24:371-377.
- Mo Y.Y., Yu Y., Shen Z, Beck W.T. (2002) *Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with SUMOylation of the protein*. J. Biol. Chem. 277: 2958-2964.
- Moody S.F. (1993) *Molecular variation in Leishmania*. Acta Trop. 53:185-204.
- Morales M.A., Cruz I., Rubio J.M., Chicharro C., Cañavate C., Laguna F., Alvar J. (2002) *Relapses versus reinfections in patients coinfecting with Leishmania infantum and human immunodeficiency virus type 1*. J Infect Dis. 185:1533-1537.
- Murray H.W. (2000) *Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) a decade of progress and future approaches*. Int. J. Infect. Dis. 4: 158-177.
- Murray H.W. (2001) *Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis*. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2185-2197.
- Muskus C., Segura I., Oddone R., Turco S.J., Leiby D.A., Toro L., Robledo S., Saravia N.G. (1997) *Carbohydrate and LPG expression in Leishmania viannia subgenus*. J. Parasitol. 83:671-678.

- Nadim A., Javadian E., Tahvildar-Bidruni G., Ghorbani M. (1983) *Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis*. Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales 76: 377-383.
- Neal R.A., Croft S.L. (1984) *An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of Leishmania donovani*. J. Antimicrob. Chemother. 14:463-475.
- Ouellette M., Drummelsmith J., Papadopoulou B. (2004) *Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments*. Drug Resist. Updat. 7:257-266.
- Palatnik-de-Sousa C.B. (2008) *Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years*. Vaccine 26:1709-1724.
- Pérez-Victoria F.J., Gamarro F., Ouellette M., Castanys S. (2003) *Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from Leishmania involved in drug resistance*. J. Biol. Chem. 278:49965-49971.
- Pérez-Victoria F.J., Sánchez-Cañete M.P., Seifert K., Croft S.L., Sundar S., Castanys S., Gamarro F. (2006) *Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use*. Drug Resist Updat. 9:26-39.
- Pineda-Vergara J.A., Macías-Sánchez J., García-García J.A. (2003) *Leishmaniasis e infección por el HIV*. Cap. 25 pp. 289-301
- Pommier Y. (2006) *Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond*. Nat. Rev. Cancer 6: 789-802.
- Pommier Y., Pourquier Ph., Fan Y., Strumberg D. (1998) *Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme*. Biochim. Biophys. Acta 1400: 83-106.
- Ponte-Sucre A., Vicik R., Schultheis M., Schirmeister T., Moll H. (2006) *Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity*. Antimicrob. Agents Chemother. 50:2439-2447.
- Potmesil M. (1994) *Camptothecins: from bench research to hospital wards*. Cancer Res. 54: 1431-1439.

- Proulx M., Desormeaux A., Marquis J.F., Olivier M., Bergeron M.G. (2001) *Treatment of visceral leishmaniasis with sterically stabilized liposomes containing camptothecin*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2623-2627.
- Prudhomme M. (2003) *Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents*. Eur. J. Med. Chem. 38: 123-140.
- Rakotomanga M., Blanc S., Gaudin K., Chaminade P., Loiseau P.M. (2007) *Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 1425-1430.
- Ramos H., Saint-Pierre-Chazalet M., Bolard J., Cohen B.E. (1994) *Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on Leishmania mexicana promastigotes*. Antimicrob. Agents Chemother. 38:1079-1084.
- Ramos H., Valdivieso E., Gamargo M., Dagger F., Cohen B.E. (1996) *Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions*. J. Membr. Biol. 152:65-75.
- Ray S., Hazra B., Mitra B., Das A., Majumder H.K. (1998) *Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of Leishmania donovani*. Mol. Pharmacol. 54: 994-999.
- 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: 1504-1513.
- Reguera R.M., Díaz-González R., Pérez-Pertejo Y., Balaña-Fouce R. (2008) *Characterizing the bi-subunit type IB DNA topoisomerase of Leishmania parasites; a novel scenario for drug intervention in trypanosomatids*. Curr. Drug Targets 9: 966-978.
- Reguera R.M., Redondo C.M., Gutiérrez de Prado R., Perez-Pertejo Y., Balaña-Fouce R. (2006) *DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy*. Biochim. Biophys. Acta 1759:117-131.
- Reguera R.M., Tekwani B.L., Balaña-Fouce R. (2005) *Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development*. Comp. Biochem. Physiol. C 140: 151-164

Roberts C.W., McLeod R., Rice D.W., Ginger M., Chance M.L., Goad L.J. (2003) *Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa*. Mol. Biochem. Parasitol. 126: 129-142.

Roberts C.W., McLeod R., Rice D.W., Ginger M., Chance M.L., Goad L.J. (2003) *Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa*. Mol. Biochem. Parasitol. 126:129-142.

Russo D.M., Chakrabarti P., Higging A. Y. (1990) *Leishmania: Native Human T Cells Sensitive with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8⁺ cytotoxic effectors*. Experimental Parasitology. 93: 160-170.

Sacks D.L. (1989) *Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes*. Exp. Parasitol. 69:100-103.

Sacks D.L., Perkin P.V. (1985) *Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sandflies*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:456-459.

Sacks D.L., Perkins P.V. (1984) *Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes*. Science 223: 1417-1419.

Sacks D.L., Kenney R.T., Krentzer R.D., Juffe C.L., Gupta A.K., Sharma M.C., Sinha S.P., Neva F.A., Saram R. (1995) *Indian kala-azar caused by Leishmania tropica*. Lancet. 15: 959-961.

Sen N., Das B.B., Ganguly A., Mukherjee T., Bandyopadhyay S., Majumder H.K. (2004) *Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate Leishmania donovani*. J. Biol Chem. 279:52366-52375.

Sharma A., Hanai R., Mondragón, A. (1994) *Crystal structure of the amino-terminal fragment of vaccinia virus DNA topoisomerase I at 1.6 Å resolution*. Structure 2: 767-777.

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*. Med. Microbiol. Immunol. 193: 173-180.

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 364:735-737.

Sparreboom A., de Jonge M.J., de Bruijn P., Brouwer E., Nooter K., Loos W.J., van Alphen R.J., Mathijssen R.H., Stoter G., Verweij J. (1998) Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients. Clin. Cancer Res. 4:2747-2754.

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*. J. Med. Chem. 48:2336-2345.

Staker B.L., Hjerrild K., Feese M.D., Behnke C.A., Burgin A.B. Jr., Stewart L. (2002) *The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15387-15392.

Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ. (1999) A functional linker in human topoisomerase I is required for maximum sensitivity to camptothecin in a DNA relaxation assay. J Biol Chem. 1999 Nov 12;274(46):32950-60.

Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. (1996) *The domain organization of DNA topoisomerase I*. J. Biol. Chem. 271: 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: 1534-1541.

Strauss P.R., Wang J.C. (1990) *The TOP2 gene of Trypanosoma brucei: a single-copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes encoding eukaryotic DNA topoisomerase II*. Mol. Biochem. Parasitol. 38: 141-150.

Sudhandiran G., Shaha C. (2003) *Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular Leishmania donovani amastigotes*. J. Biol. Chem. 278:25120-25132.

Sundar S., Jha T.K., Thakur C.P., Sinha P.K., Bhattacharya S.K. (2007) *Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India*. N. Engl. J. Med. 356:2571-2581.

- Sundar S., Rosenkaimer F., Lesser M.L., Murray H.W. (1995) *Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis*. J. Infect. Dis. 171:992-996.
- 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*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10267-10271.
- Vennerstrom, J.; Lovelace, J.K.; Waits, V.B.; Hanson, W.L.; Klayman, D.L. (1990) *Berberine derivatives as antileishmanial drugs*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 918-921.
- Vercesi A.E., Docampo R. (1992) *Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized Leishmania donovani. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ*. Biochem. J. 284:463-467.
- Verma N.K., Singh G., Dey C.S. (2007) *Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant Leishmania donovani promastigotes through mitochondrial dysfunction*. Exp. Parasitol. 116:1-13.
- Viard T., de la Tour C.B. (2007) *Type IA topoisomerases: a simple puzzle?* Biochimie 89:456-467.
- Vilanova J. (1943) *Fundamentos, técnica y resultados obtenidos en el tratamiento intralesional del botón de Oriente con un nuevo preparado de antimonio a alta concentración*. Rev. Clin. Esp. 8: 21-28.
- Villa H., Otero-Marcos A.R., Reguera R.M., Balaña-Fouce R., Balaña-Fouce R., García-Estrada C., Pérez-Pertejo Y., Tekwani B.L., Myler P.J., Stuart K.D., Bjornsti M.A., Ordóñez D. (2003) *A novel active DNA topoisomerase I in Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. 278: 3521-3526.
- Vinograd J., Lebowitz J., Radloff R., Watson R., Laipis P. (1965) *The twisted circular form of polyoma viral DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 53:1104-1111.
- Walker J., Saravia N.G. (2004) *Inhibition of Leishmania donovani promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents*. J. Parasitol. 90:1155-1162.

- Wall M., Wani M.C., Cook C.E., Palmer K.H., Mc Pail A.T., Sim G.A. (1966) *Plant antitumour agents: the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminate*. J. Am. Chem. Soc. 88: 3888-3890.
- Wang J.C. (1996) *DNA topoisomerases*. Annu. Rev. Biochem. 65: 635-692.
- Wang J.C. (2002) *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3: 430-440.
- Wilson W.D., Tanious F.A., Mathis A., Tevis D., Hall J.E., Boykin D.W. (2008) *Antiparasitic compounds that target DNA*. Biochimie 90: 999-1014.
- Witz G., Stasiak A. (2010) *DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting*. Nucleic Acids Res. 38:2119-2133
- Woerly V., Maynard L., Sanquer A., Eun H.M. (2009) *Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis*. Parasitol. Res. 105: 463-469.
- Woo M.H., Vance J.R., Marcos A.R., Bailly C, Bjornsti MA. (2002) *Active site mutations in DNA topoisomerase I distinguish the cytotoxic activities of camptothecin and the indolocarbazole, rebeccamycin*. J. Biol. Chem. 277:3813-3822.
- Wyllie S., Cunningham M.L., Fairlamb A.H. (2004) *Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. 279:39925-39932.
- Yao C. (2010) *Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all?* Infect Immun 78: 22-31.
- Yi T., Pathak M.K., Lindner D.J., Ketterer M.E., Farver C., Borden E.C. (2002) *Anticancer activity of sodium stibogluconate in synergy with IFNs*. J. Immunol. 169:5978-5985.
- Zhang H., Meng L.H., Pommier Y. (2007) *Mitochondrial topoisomerases and alternative splicing of the human TOP1mt gene*. Biochimie 89:474-481.
- 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*. J. Biol. Chem. 279: 37445-37451.