



**MECANISMO DE ACCIÓN DE DERIVADOS
INDENOISOQUINOLÍNICOS FRENTE A LA
DNA TOPOISOMERASA IB DE *LEISHMANIA*
COMO DIANA TERAPÉUTICA**

Raquel Álvarez Velilla
Dpto. Ciencias Biomédicas
Área de Toxicología
León, Febrero de 2015

RESUMEN

Las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas parasitarias prevalentes en cuatro de los cinco Continentes. Este complejo de enfermedades son causadas por parásitos del género *Leishmania spp.* un tripanosomátido digenético transmitido por un díptero phlebotomino en países en vías de desarrollo. Aunque mayoritariamente es un problema de Salud Pública que podría enderezarse con medidas de higiene, el cambio climático, el hacinamiento en las grandes urbes y su presencia en animales de compañía que actúan como reservorios ha producido una propagación hacia regiones aparentemente exentas de riesgo. En la actualidad, el arsenal terapéutico en medicina humana está desprovisto de vacunas eficaces y la mayoría de los fármacos de primera línea están obsoletos, son tóxicos o lo que es peor, necesitan una administración es vital abrir nuevas vías de lucha frente a este parásito mediante la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el consiguiente diseño de inhibidores específicos.

A partir de la reunión celebrada en 2003 en Ginebra, se estableció el objetivo de desarrollar hasta 13 nuevos tratamientos frente a estas enfermedades en un periodo no mayor a 15 años. A esta iniciativa liderada por Organizaciones No Gubernamentales como Médicos Sin Fronteras con el apoyo de instituciones públicas de prestigio de Brasil, Francia, India, Malasia, Kenia y la OMS (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; TDR) se le conoce como Drug for Neglected Diseases initiative (DNDi) y se espera que en 2018 haya cubierto sus objetivos. Por su parte, la rama de investigación de Glaxo Smith Kline (GSK) en Madrid (Tres Cantos Open Lab) ha asumido el compromiso de poner sus librerías de cientos de miles de compuestos químicos a disposición de los investigadores académicos que aportan mano de obra cualificada y plataformas validadas de evaluación fenotípica de alguna de las enfermedades olvidadas para ser cribadas *in vitro* en sistemas robotizados de alto rendimiento (HTS). Para utilizar estas instalaciones, se están desarrollando plataformas de cribado de pequeñas

moléculas bajo las premisas de miniaturización, robustez, y reproducibilidad dependientes (Target-Based Screening) o independientes (Phenotypic-Based Screening).

Como continuación de trabajos anteriores en nuestro laboratorio, en la primera parte de esta Memoria hemos establecido una plataforma de cribado *ex vivo* en explantes de bazo de ratones BALB/c infectados por una cepa de *Leishmania infantum* (responsable de leishmaniasis visceral en el área Mediterránea) modificada genéticamente para que emita fluorescencia infrarroja en todas las etapas de su ciclo vital, con el que hemos cribado varias colecciones de moléculas pequeñas – 298 en total. Este método reduce el número de animales utilizados ya que con un solo bazo infectado se pueden sembrar hasta dieciséis placas de 384 pocillos, permitiendo así la evaluación de varias colecciones de pequeñas moléculas a dosis única.

Complementariamente, la segunda parte de la Memoria, ha consistido en hacer un estudio basado en la DNA-topoisomerasa IB recombinante de *Leishmania* como diana molecular de intervención terapéutica y sus consecuencias con varias series de compuestos – un total de 37 moléculas pequeñas – de estructura indenoisoquinolínica que habían destacado como potenciales leishmanicidas en los ensayos anteriores. Se estudió la capacidad de inhibición de la enzima del patógeno, comparada con la humana y la tendencia a formar complejos con el DNA. Finalmente, se demostró que estos compuestos producían roturas de doble cadena de DNA que eran detectados por la fosforilación de la histona γ H2A y daban lugar a cambios en el ciclo celular del patógeno.

ÍNDICE

1. – Revisión bibliográfica	1
1.1. – Leishmaniosis	3
1.1.2. – Manifestaciones clínicas	6
1.2. – El género <i>Leishmania</i>	9
1.2.1. – El ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	13
1.2.2. – Respuesta inmune del hospedador	16
1.3. – Tratamiento actual de la leishmaniosis	18
1.4. – Nuevas estrategias para el descubrimiento de fármacos antiparasitarios	20
1.4.1. – Cribados basados en Dianas (TBS)	22
1.4.2. – Cribados basados en Fenotipo (PBS)	23
1.4.3. – Cribados fenotípicos <i>ex vivo</i>	24
1.4.4. – Deconvolución de dianas	25
1.4.5. – Aplicación de patógenos modificados para el cribado fenotípico de fármacos	26
1.4.6. – Estrategias para la generación de patógenos modificados	28
1.4.7. – El uso de tripanosomátidos fluorescentes en HTS	29
1.4.8. – El uso de parásitos transgénicos para la evaluación preclínica de fármacos en tiempo real	32
1.5. – Dianas de intervención farmacológica en <i>Leishmania</i> spp.	35
1.6. – DNA Topoisomerasas: Estructura y función	37
1.6.1. – Topología del DNA	37

1.6.2. – Las DNA Topoisomerasas (Top)	41
1.7. – La TopIB humana	47
1.7.1. – Estructura	47
1.7.2. – Mecanismo de catálisis y relajación	50
1.8. – La TopIB de <i>Leishmania</i>	54
1.9. – Las TopIB como diana terapéutica	57
1.9.1. – La camptotecina (CPT)	57
1.9.2. – Derivados poliheterocíclicos no camptotecínicos	62
2. – Objetivos	65
3. – Materiales y Métodos	67
3.1. – Material Biológico	68
3.1.1. – Cepas bacterianas	68
3.1.2. – Cepas de levaduras	68
3.1.3. – Modelo murino BALB/c	69
3.2. – Vectores	69
3.2.1. – pBluescript SK (+/-)	69
3.2.2. – pESC-URA GAL	69
3.2.3. – YCpGAL1-hTOP1	69
3.2.4. – pLEXSY-hyg2	70
3.3. – Medios de cultivo	70
3.3.1. – Medio Luria-Bertani (LB)	70
3.3.2. – Medio YPD	70

3.3.3. – Medio S.C. ura-	70
3.3.4. – Medio SOC	71
3.3.5. – Medio M199	71
3.3.6. – Medio RPMI 1640	72
3.4. – Mantenimiento de Microorganismos	72
3.4.1. – Bacterias y levaduras	72
3.4.2. – Promastigotes de Leishmania	72
3.5. – Reactivos específicos de biología molecular	73
3.5.1. – Ácidos nucleicos	73
3.5.2. – Enzimas de restricción y “klenow”	73
3.5.3. – Antibióticos	73
3.5.4. – Isótopos radiactivos	73
3.6. – Manipulación del DNA	74
3.6.1. – Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E.coli</i>	74
3.6.2. – Preparación de proteínas recombinantes	74
3.6.3. – Secuenciación de DNA	75
3.6.4. – Purificación de DNA procedente de geles de agarosa	75
3.6.5. – Ligado de fragmentos de DNA con extremos cohesivos	76
3.6.6. – Generación del vector IRFP-pLEXY-3’Hsp70 II- BSD	76
3.6.7. – Electroforesis de DNA en geles de agarosa	77
3.7. – Transformación Celular	78

3.7.1. – Preparación de células competentes de <i>E.coli</i>	78
3.7.2. – Transformación de <i>E.coli</i>	78
3.7.3. – Transfección de promastigotes de <i>L.infantum</i>	79
3.7.4. – Transformación de levaduras	80
3.8. – Sobreexpresión y purificación de proteínas.	80
3.8.1. – Crecimiento e inducción de cultivos	80
3.8.2. – Obtención de extractos	81
3.8.3. – Purificación de proteínas recombinantes	81
3.9. – Electroforesis de proteínas	83
3.9.1. – Preparación del gel separador	83
3.9.2. – Preparación del gel concentrador	84
3.9.3. – Preparación de las muestras	84
3.9.4. – Electroforesis	85
3.9.5. – Medida de la concentración de proteínas	85
3.10. – Estudios actividad y sensibilidad TopIB <i>in vitro</i>	85
3.10.1. – Determinación de la actividad TopIB	85
3.10.2. – Inhibición de la actividad de relajación	86
3.10.3. – Detección de complejos covalentes de agarosa	87
3.11. – Estudios microscópicos	88
3.11.1. – Tinción con diamino-2-fenilindol (DAPI)	88
3.11.2. – Fijación con poli-L-lisina	88
3.12. – Viabilidad celular	89
3.12.1. – Determinación de la viabilidad en promastigotes de <i>L.infantum</i> -iRFP	89

3.12.2. – Plataforma fenotípica HTS de explantes murinos infectados con <i>L.infantum-iRFP</i>	89
3.12.3. – Citotoxicidad en esplenocitos murinos no infectados	91
3.13. – Fosforilación de la histona H2A	91
3.14. – Análisis del ciclo celular	92
3.15. – Estudio informático de la biodisponibilidad de los compuestos	92
4. – Resultados	94
4.1. – Generación de la cepa de <i>L.infantum-iRFP</i>	95
4.1.1. – Optimización de la construcción	97
4.1.2. – Caracterización del modelo murino de infección	100
4.1.3. – Establecimiento y optimización del modelo de esplenocitos infectados	102
4.1.4. – Identificación de “hits” con actividad leishmanicida en un sistema HTS de esplenocitos murinos	105
4.2. – Eficacia leishmanicida de las indenoisoquinolinas	108
4.3. – Expresión de LiTopIB en levaduras	117
4.3.1. – Obtención de TopIB recombinantes funcionales	117
4.3.2. – Expresión heteróloga de LiTopIB y purificación por cromatografía en columna	118
4.3.3. – Caracterización de la actividad LiTopIB	119

4.3.4. – Inhibición de la actividad de relajación y “cleavage”	120
4.4. – Inhibición de la LiTopIB por indenoisoquinolinas	122
4.4.1. – Serie 1: derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (–) diona	122
4.4.2. – Serie 2: 3-Nitro derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (–) diona	126
4.4.3. – Serie 3: 3-Nitro, 9-metoxi-derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (–) diona	129
4.4.4. – Serie 4: 3-Nitro-derivados de la piridino [1,2] isoquinolina – 5,11 (–) diona	133
4.4.5. – Serie 5: Derivados de 8,9-metilendioxi- indenoisoquinolina – 5,11 (–) diona	135
4.4.6. – Serie 6: Derivados 12H-5, 11a-diaza-dibenzo [b,h] fluoren 11-ona (aromatecinas)	140
4.4.7. – Serie 7: Derivados 2,3-etilendioxi-12H-5, 11a- diaza-dibenzo [b,h] fluoren 11-ona	143
4.5. – Ensayos de competición con CPT	145
4.6. – Estudios de fosforilación de la histona γ H2A	150
4.6.1. – Efecto de inhibidores de TopIB sobre la fosforilación de la histona γ H2A	150
4.6.2. – Efecto de las indenoisoquinolinas sobre la fosforilación de la histona γ H2A y el ciclo celular	152

5. – Discusión	159
5.1. – Dimensión del problema	160
5.2. – Un nuevo test fenotípico	163
5.3. – Compuestos con estructura indenoisoquinolínica	166
6. – Conclusiones	180
7. – Bibliografía	182

**MECANISMO DE ACCIÓN DE DERIVADOS
INDENOISOQUINOLÍNICOS FRENTE A LA
DNA TOPOISOMERASA IB DE *LEISHMANIA*
COMO DIANA TERAPÉUTICA**

Raquel Álvarez Velilla
Dpto. Ciencias Biomédicas
Área de Toxicología
León, Febrero de 2015

1. revisión bibliográfica

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis es un conjunto de enfermedades presentes en 4 continentes y 88 países, 22 de ellos del Nuevo Mundo y 66 del Viejo Mundo (Alvar, 2001). Cuenta con una prevalencia muy elevada (12 millones de casos) además de unos 350 millones de personas en potencial riesgo. Las cifras publicadas indican una incidencia estimada de 2 millones de casos nuevos al año, de los que 1,5 padecen leishmaniosis cutánea (LC) y 0,5 leishmaniosis visceral (LV) (OMS, 2010). Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la leishmaniosis como una de las enfermedades prioritarias dentro de su “Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases”.

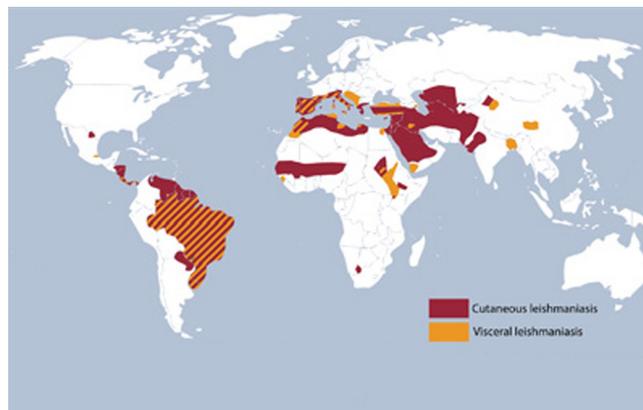


Figura 1.1. Distribución geográfica de la leishmaniosis visceral y cutánea en el Viejo y Nuevo Mundo. Modificado de Global Medicine. Leishmaniasis Datos adaptados desde OMS: www.who.int/leishmaniasis.

La más común de estas enfermedades es la LC que produce úlceras en la piel sin que haya invasión de los órganos internos, dejando cicatrices permanentes

y discapacidades graves. La mayor parte de los casos se da en América del Sur, Cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central, y son causados por las especies del complejo *L. mexicana* en el Nuevo Mundo (*L. amazonensis*, *L. mexicana*) y por el complejo *L. major* (*L. tropica*, *L. major*) y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo (Ashford, 2000). La leishmaniosis mucocutánea es más dañina, está causada por especies del complejo *braziliensis* y en algunos casos puede resultar mortal. Esta enfermedad produce la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. La mayoría de los casos se dan en Sudamérica. Por último, en India, Afganistán, China, Kenia, países Europeos Mediterráneos y Sudamérica, se presenta también la LV (*Kala azar*), causada por *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y por *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. Afecta a órganos internos tales como el hígado, el bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Es una enfermedad grave e incluso mortal si no se trata. Se estima una mortalidad anual de 59.000 personas (35.000 hombres y 24.000 mujeres), si bien es cierto que en algunas áreas, debido a las grandes diferencias sociales y de género, la mortalidad femenina puede ser hasta tres veces mayor (Berman, 2006). (Fig. 1.1)

No se dispone de datos fiables sobre la prevalencia y la incidencia que permitan llevar a cabo una evaluación exhaustiva del impacto de la leishmaniosis de forma global. La falta de disponibilidad de datos objetivos se debe a los siguientes factores: i) la transmisión de la enfermedad se produce en zonas rurales remotas; ii) muchos casos no se diagnostican debido a que no hay acceso o no se recibe atención médica y iii) sólo en 33 de los 88 países endémicos la leishmaniosis es una enfermedad de declaración obligatoria (OMS, 2007). Además, la incidencia de la leishmaniosis es geográficamente muy heterogénea, ya que aunque puedan comunicarse bajas tasas de infección en regiones concretas, pueden existir focos intensamente afectados (Bern, 2008). Desde 1993, lo que parecía una enfermedad de países pobres o en vías de desarrollo, se ha extendido a países del llamado "Primer Mundo" como Francia, Alemania, España, etc. El cambio climático también tiene su papel en la diseminación de estas enfermedades ya que puede facilitar la presencia de los vectores en zonas templadas en las que nunca antes habían sido detectados (Desjeux, 2001).

En nuestro país la leishmaniosis se presenta tanto en la forma cutánea como en la visceral, producidas en ambos casos por *L. infantum*. Esta enfermedad ha sido de declaración obligatoria hasta 1996, momento en el que cambió el sistema de vigilancia epidemiológica y la dependencia fue transferida a las Comunidades Autónomas. Se declaran entre 800 y 1.200 casos por año, lo que supone una incidencia anual de 0,3 casos/100.000 habitantes, que se concentran mayoritariamente en la Cuenca Mediterránea y la Meseta Central (López-Vélez y Molina-Moreno, 2005). Sin embargo, la declaración de la enfermedad es baja, especialmente en los procesos cutáneos de evolución benigna – entre el 25-40% de los casos de LV y de casi un 100% de los casos de LC – la incidencia real es desconocida y se calcula que como mínimo es dos veces superior si tenemos en cuenta los casos no declarados (Schönian y col., 2008). La LV mediterránea ha sido considerada como una enfermedad que afecta principalmente a la población infantil agravada por los casos de leishmaniasis canina. Un incidente digno de mención se produjo en Fuenlabrada (Madrid) en 2009, donde aumentó la prevalencia rápidamente de 3 casos/100.000 habitantes en 2010 a 55,7/100.000 habitantes en 2011. Lo interesante de este brote es que, tal y como ha sido demostrado, las liebres (*Lepus granatensis*) aparentemente sanas pero infectadas con *L. infantum* sirvieron como reservorio silvestre del parásito previo paso al mosquito vector (*P. perniciosus*) (Molina y col., 2012).

Otro aumento significativo en la prevalencia de la leishmaniasis es la coinfección VIH-Leishmania que fue reconocida como una infección emergente en el suroeste europeo, donde el 25-70% de los adultos con LV estaban coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Fig. 1.2) (De Gorgolas y Miles, 1994; Desjeux y Alvar, 2003). Ambos patógenos parecen ejercer un efecto potenciador sinérgico y recíproco sobre la infección del otro, lo que redundaría en una mayor inmunosupresión y una progresión más rápida de ambas enfermedades (Wolday y col., 1999). Sin embargo, es importante tener en cuenta que las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis van a depender en gran medida de la respuesta inmune del hospedador (Pintado y col., 2001). De esta forma, la difusión global del VIH ha jugado un importante papel en la infección por *Leishmania spp.* El estado de inmunosupresión inducido por el VIH aumenta entre 100 y 1000 veces la probabilidad de desarrollar LV. Esto ha supuesto un cambio en el tipo de población

afectada por esta enfermedad, pasando de ser principalmente niños a individuos adultos. Además, aquellos pacientes infectados de VIH que no son tratados con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), presentan una probabilidad cercana al 90%, de sufrir co-infección por *Leishmania spp.* así como graves recaídas post infección (Kubar y col., 1998).

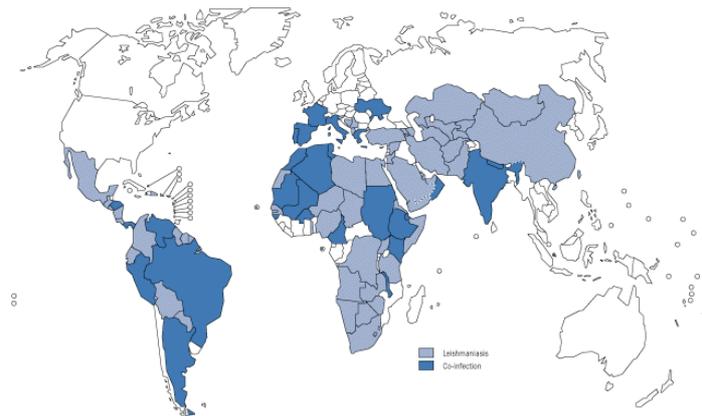


Figura 1.2. Mapa de la distribución geográfica de infección por leishmaniasis (azul claro); y de co-infección VIH-Leishmaniasis (azul oscuro).

La prevalencia de esta enfermedad oportunista se estima entre el 1,5 al 9% de los pacientes con SIDA. La mayoría de estos casos fueron declarados en Europa correspondieron a España, Francia, Italia y Portugal, siendo España el país con mayor número de casos de co-infección (835/1440; 58%) (Desjeux y Alvar, 2003).

1.1.2. Manifestaciones clínicas.

Como hemos dicho con anterioridad, se distinguen cuatro tipos de leishmaniasis, según el cuadro clínico, la localización de los síntomas (Alvar, 2001), y la especie implicada (Tabla 1.2): LC, LMC, LV y leishmaniasis dérmica post-kalazar (LDPK).

Una de las características de la LC es la correlación existente entre el número de lesiones y el número de picaduras que ha sufrido el paciente. Dichas picaduras tienden o bien a ulcerarse directamente o bien evolucionan a

formaciones nodulares que posteriormente se ulceran. Tras un periodo de incubación que puede durar entre 4 a 6 semanas o incluso años, las lesiones hacen aparición con una pequeña pápula que genera una costra bajo la cual emerge la ulceración (Fig.1.3). Debido a su remisión espontánea se puede considerar de tipo benigno. Sin embargo, existe una complicación en el caso de las infecciones con *L. tropica*, denominada leishmaniosis cutánea recidivante, que consiste en la aparición de microlesiones que se ulceran mientras la lesión principal está cicatrizando. Akilov y colaboradores propusieron una clasificación de los diferentes tipos de LC atendiendo a la patogénesis del proceso y al análisis histológico de las lesiones (Akilov y col., 2007), distinguiendo entre LC exógena (localizada y diseminada) y LC endógena (recurrente y LDPK), con varias subdivisiones en cada una. Aunque generalmente se observa la diseminación del parásito durante la LC en pacientes infectados por *L. major* y *L. tropica*, recientemente se ha descrito una forma multifocal de LC causada por *L. infantum* en los países mediterráneos (Maniscalco y col., 2007).

Tabla 1.1. Clasificación de las principales especies de *Leishmania* en función del cuadro clínico desarrollado en el paciente infectado.

Leishmaniosis	Organismo	Localización
Cutánea	<i>L. tropica</i>	Cuenca mediterránea, Afganistán
	<i>L. major</i>	Oriente Medio, O y N de Africa, Kenia
	<i>L. aethiopica</i>	Etiopía
	<i>L. mexicana</i>	América Central y cuenca del Amazonas
Visceral	<i>L. donovani</i>	China, India, Irán, Sudán, Kenia, Etiopía
	<i>L. infantum</i>	Cuenca mediterránea
	<i>L. chagasi</i>	Brasil, Colombia, Venezuela, Argentina
Mucocutánea	Complejo <i>L. braziliensis</i>	Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela

La manifestación más grave de LC en el Nuevo Mundo es la LMC que se caracteriza por una invasión de los tejidos blandos a partir de una lesión cutánea inicial. El síntoma clave es una elevada deformación morfológica, cursando con destrucción de la piel circundante, faringe, orofaringe y tráquea. En el año 2009 se mostró la alta prevalencia de leishmaniosis tegumentaria con presentaciones atípicas (53% de incidencia mucocutánea) o localizaciones inusuales (27% en áreas genitales) en pacientes sudamericanos positivos a VIH (Lindoso y col., 2009).

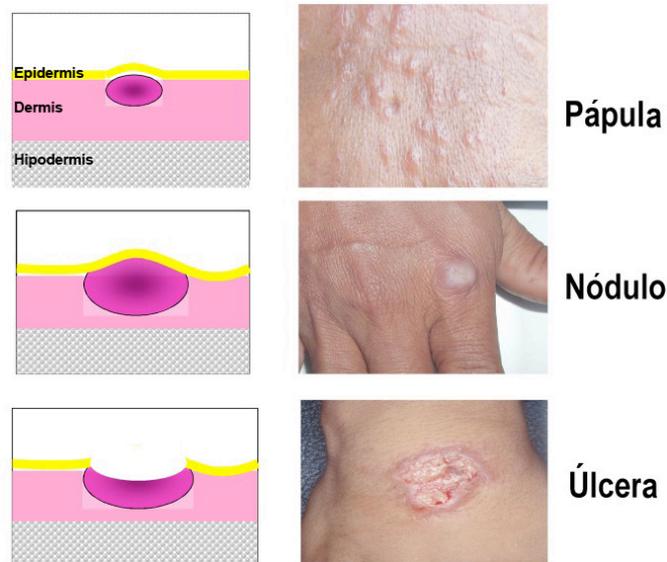


Figura 1.3. Morfología de lesión de LC. Pápula: lesión < 1 cm de diámetro, elevada por encima de la superficie de la piel y cubierta por epidermis. Nódulo: ampliación >1 cm una pápula, sólida y fácilmente palpable. Úlcera: Parte de la lesión no está cubierta por epidermis. Puede formarse por una capa de costra. Modificado de Olliaro y col., (2013).

La forma más grave de leishmaniosis es la LV, castiga principalmente al Viejo Mundo y buena parte de Sudamérica. A diferencia de la LC, la LV no presenta curaciones espontáneas, siendo por lo tanto necesario el tratamiento del paciente para evitar su muerte. Tras un periodo de incubación, que puede durar varios meses, los parásitos invaden los órganos diana; bazo, hígado, médula ósea, mucosa intestinal y glándulas suprarrenales, lo que puede desencadenar un fallo multiorgánico. Se diferencian tres síntomas característicos: fiebre, leucopenia y hepatoesplenomegalia.

Además de la transmisión clásica mediada por vector, recientemente ha sido descrita la infección de pacientes a los que se les había trasplantado un órgano, especialmente el riñón. Al igual que se observó en pacientes infectados por VIH, los individuos con trasplante renal sufrieron múltiples recaídas, y en muchos casos, presentaron formas atípicas de leishmaniosis, tanto mucosa como cutánea (Simon y col., 2011). En algunos casos, los pacientes que han presentado un cuadro de LV

pueden desarrollar LDPK debido, principalmente, a un tratamiento farmacológico insuficiente o inadecuado. Esta variedad de leishmaniosis, que se concentra principalmente en el subcontinente indio y Sudán, se caracteriza por la presencia de placas hipopigmentadas dispersas por la piel, junto con síntomas leproides. Los individuos afectados se comportan como reservorios del parásito en la fase antroponótica del ciclo. La mayoría de estos casos ocurren tras la infección con *L. donovani* y en menor medida con *L. infantum*. Sin embargo, la LDPK es extremadamente rara en pacientes infectados con *L. chagasi* (Singh y col., 2011). Además, la LDPK ha sido identificada como una manifestación de tipo síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (SRI) en pacientes VIH-positivos tras la administración de TARGA (Antinori y col., 2007). En el año 2008 se comunicó el primer caso de un paciente con SIDA afectado por LDPK debida a *L. chagasi* en forma de SRI (Sinha y col., 2008).

1.2. EL GÉNERO LEISHMANIA

Las especies del género *Leishmania* pertenecen a la familia Trypanosomatidae, del orden Kinetoplastida. Estos protozoos se caracterizan por la presencia de DNA extranuclear de aspecto enmarañado localizado en la base de la bolsa flagelar de su única mitocondria (kDNA). El kDNA está compuesto aproximadamente por más de 10.000 minicírculos y entre 20-50 maxicírculos, estos últimos, contienen genes que codifican proteínas involucradas en la producción de energía, además de RNA ribosomales (rRNA) y proteínas estructurales (Maslov y col., 1984) (Fig. 1.4).

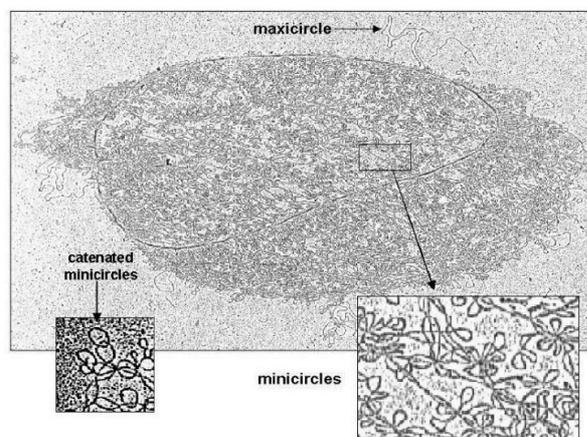


Figura 1.4. Imagen de microscopía electrónica del kDNA de *Leishmania* spp.

Las especies del Género *Leishmania* son parásitos digenéticos con un flagelo único, además de una red de microtúbulos que conforma la mayor parte de su citoesqueleto (Ashford, 2000). Su ciclo biológico consiste en dos estados bien diferenciados; la forma móvil y flagelada se denomina promastigote y reside en las hembras de dípteros de los géneros *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo). Esta forma libre cuenta con la capacidad de penetrar e invadir las células del sistema monocito-fagocitario del hospedador vertebrado diferenciándose en una forma intracelular redondeada y sin flagelo denominada amastigote. En la Fig. 1.5 se muestra de manera esquemática los distintos orgánulos del parásito tanto en la forma promastigote (A) como amastigote (B).

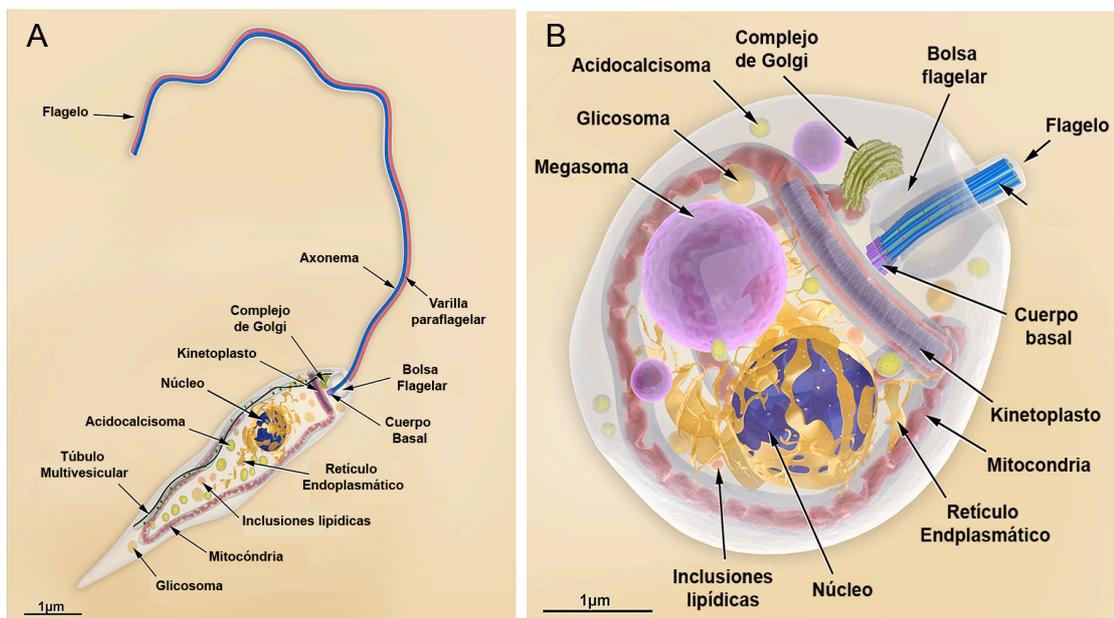


Figura 1.5. Infografía que muestra los distintos estadios de *Leishmania* y la distribución de los orgánulos en su interior. Modificado de Teixeira y col. (2013).

Otra característica de *Leishmania* sp. es que la superficie celular está recubierta por una capa de lipofosfoglicanos heterogéneos (LPG). El LPG se ancla a la membrana a través de una molécula de glicosilfosfatidil inositol (GPI), y tiene un cuerpo central formado por heptasacáridos fosforilados con una galactofurano exclusiva de esta molécula. Finalmente, la parte externa consta de azúcares fosforilados y azúcares terminales, esta zona es variable de unas especies a otras

en contenido y en longitud. Esta estructura se encuentra tanto en la forma promastigote como amastigote, y está implicada en la infectividad y en la supervivencia del promastigote, tanto en el vector como en los macrófagos de mamífero al inicio de la infección (McConville y col., 1992)

El número de cromosomas varía entre las especies de *Leishmania* siendo de 34 ó 35 para las del Nuevo Mundo y de 36 para las del Viejo Mundo. Su tamaño es menor que el de los metazoos pero presentan un mayor empaquetamiento génico al carecer de intrones, una característica única dentro de los eucariotas. Los genes dan lugar a la formación de transcritos policistronicos a partir de promotores no definidos, y el mRNA se procesa mediante “trans-splicing” de dos transcritos primarios distintos, formando así un RNA híbrido (Kazemi, 2011). Se ha secuenciado el genoma de tres especies (*L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*), en el que se han identificado al menos 3.800 genes codificantes, de los cuales casi el 40% se clasifican dentro de 662 familias formadas por entre 2 y 500 miembros. Los genes grandes suelen estar por todo el genoma dispuestos en tándem, mientras que los pequeños forman grupos de uno a tres genes (Myler y Fasel, 2008).

La clasificación de las distintas especies de *Leishmania* se ha basado históricamente en las manifestaciones clínicas, distribución geográfica, tropismo o especie del vector (Pratt y David, 1981; Lainson y Shaw, 1987). Aunque se han utilizado numerosos métodos moleculares para definir la taxonomía de *Leishmania*, aún sigue siendo objeto de debate. En 2010, Fraga y col. propusieron una nueva nomenclatura basándose en la secuencia del gen que codifica la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*). Analizaron 17 especies de diferentes zonas geográficas dando como resultado solo 8 grupos monofiléticos y quedando la clasificación tal y como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Nueva propuesta de nomenclatura de *Leishmania spp.* basada en la secuencia del gen *hsp70*. Modificado de Antinori y col. (2012).

Genero	Complejo	Especie	Distribución geográfica	Especies <i>hsp70</i>
L. (<i>Leishmania</i>)	L. donovani	L. donovani	China, subcontinente indio, Etiopía, Sudán, Kenia, Irán, Arabia Saudí, Yemen	L. donovani
		L. infantum	Albania, Argelia, Francia, España, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal, Siria, Túnez, Turquía, Yemen	
		L. chagasi	Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Guayana holandesa Honduras, Martinica, México, Nicaragua, Paraguay, Venezuela	
		L. archibaldi	India, Sudán, Etiopía, Líbano, Israel	
	L. tropica	L. tropica	Afganistán, Argelia, Azerbaiyán, Grecia, Irán, Irak, Israel, Marruecos, Túnez, Turquía, Yemen	L. tropica
		L. aethiopica	Etiopía, Kenia	
		L. major	Afganistán, Argelia, Chad, Irán, Irak, Israel, Libia, Mauritania, Marruecos, Siria, Sudán	L. major
	L. mexicana	L. mexicana	Belice, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Venezuela	L. mexicana
		L. amazonensis	Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana francesa, Panamá, Perú, Venezuela	
		L. garnhami	Venezuela	
L. (<i>Viannia</i>)	L. guyanensis	L. guyanensis	Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Perú, Guayana holandesa, Venezuela	L. guyanensis
		L. panamensis	Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Venezuela	
		L. naiffi	Brasil, Guayana francesa, Ecuador, Perú	L. naiffi
	L. braziliensis	L. braziliensis	Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua	L. braziliensis
		L. peruviana	Perú	

1.2.1. El ciclo biológico de *Leishmania spp.*

El ciclo biológico de *Leishmania* consta de dos fases bien diferenciadas; una en el intestino del vector y otra en el hospedador (Fig. 1.6). Comenzando por el vector infectado, su saliva contiene compuestos peptídicos bioactivos con características vasodilatadoras que son esenciales para que pueda alimentarse. Durante la ingesta de sangre los promastigotes metacíclicos que se encuentran en la probóscide son introducidos en la piel del hospedador (Valenzuela y col., 2004). Estos promastigotes están parcialmente protegidos por los agentes inmunomoduladores presentes en la saliva del insecto, inhibiendo de manera parcial las funciones de las células T y los macrófagos (Gillespie y col., 2000).

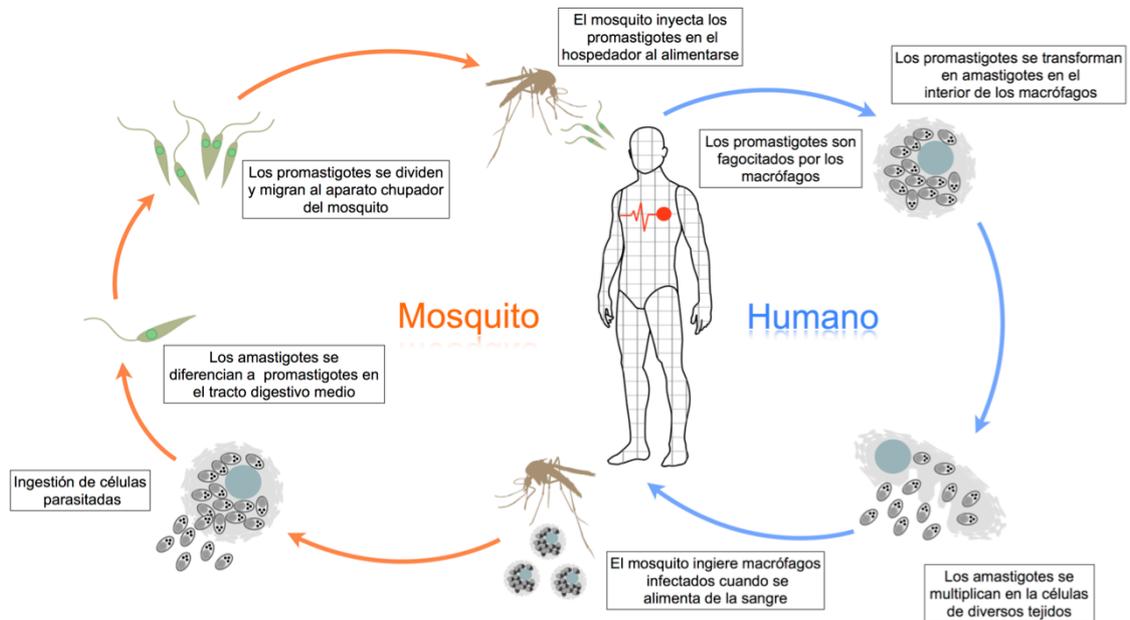


Figura 1.6. Ciclo vital del parásito *Leishmania spp.* A la izquierda se muestra el desarrollo dentro del vector y a la izquierda está representada la parte del ciclo que corresponde al hospedador vertebrado, en este caso, el hombre.

La alta densidad de promastigotes que se alcanza produce el taponamiento de la faringe de la mosca, por lo que para poder llevar a cabo la succión de la sangre, es necesario que regurgite este "tapón" infeccioso. Estudios de imagen *in vivo* demostraron que la picadura del vector induce una rápida infiltración de neutrófilos y un reclutamiento sustancial de macrófagos en la piel,

independientemente de la presencia o no de parásitos, demostrando que este reclutamiento es producto del daño tisular asociado a la picadura (Peters y col., 2008). La picadura de una mosca portadora transmite una media de 1.000 promastigotes metacíclicos (Rogers y col., 2004), aunque existen estudios en los que el número de los parásitos puede llegar a 100.000. Sin embargo, los animales infectados con un menor número de promastigotes tienen un proceso patológico limitado pero son reservorios infectivos más duraderos (Kimblin y col., 2008).

Los leucocitos polimorfonucleares son las primeras células efectoras en las reacciones inflamatorias inducidas por la infección y juegan un papel fundamental en la fagocitosis de los parásitos, dando lugar a la eliminación de una gran parte de ellos. Esto es debido a la activación del complemento por rutas dependientes e independientes de opsonina (Ofek y col., 1995; Uthaisangsook y col., 2002). Sin embargo, no se ha podido demostrar que los promastigotes metacíclicos se diferencien en amastigotes o que se produzca proliferación dentro de neutrófilos (Laufs y col., 2002)

El LPG, presente en la membrana celular del parásito que, tiene cadenas peptídicas de mayor longitud en las formas metacíclicas y es capaz de prevenir la unión de las C5b y C9 del complemento, mientras que la glicoproteína de superficie gp63 es capaz de convertir la proteína C3b en su forma inactiva C3bi, que se une a la superficie del protozoo evitando así el ataque de la proteína C5 del complemento (Sacks y col., 1995). Además, las proteínas C3b y C3bi favorecen la opsonización, atrayendo a los macrófagos hacia los promastigotes, que se unen a los receptores CR1 y CR3 de los macrófagos de los tejidos locales para ser fagocitados, formando una vacuola parasitófora y fusionándose con los lisosomas (Späth y col., 2003). Una vez que están dentro de la célula hospedadora, los promastigotes metacíclicos quedan encerrados en el interior de los fagosomas, rodeados por la membrana originaria a partir de la célula hospedadora. Seguidamente, el fagosoma madura mediante la fusión a endosomas tardíos y lisosomas con moléculas asociadas, tales como las proteínas asociadas a lisosomas (LAMP) 1 y 2 y las catepsinas B, D, H y L (Lang y col., 1994).

La visualización de la transferencia de parásitos libres desde neutrófilos apoptóticos a macrófagos (Peters y col., 2008) sugiere que la teoría propuesta por van Zandbergen en 2004 del caballo de Troya podría no ser correcta. De hecho, cada vez cobra más fuerza el modelo del "conejo troyano" que postula la incorporación simultánea de parásitos provenientes tanto de neutrófilos apoptóticos como de origen externo (Ritter y col., 2009). Existe un segundo tipo de células involucradas en la infección y migración de *Leishmania*, las células dendríticas dérmicas. Estas células se infectan en el sitio de inoculación en la piel y son capaces de migrar a los ganglios linfáticos próximos a la región afectada (Ng y col., 2008).

En el interior de los macrófagos del hospedador el promastigote sufre una fuerte reordenación ultraestructural dando lugar a la forma amastigote (Akiyama y McQuillen, 1972), lo que conlleva además, la pérdida del flagelo y un cambio en la composición de su LPG (Moody y col., 1993). Este cambio responde a una estrategia inmunoevasiva en *Leishmania*. Estudios realizados mediante análisis por imagen sugieren que el LPG inhibe la redistribución de la actina-F inducida por la fagocitosis, retrasando de esta forma el reclutamiento de la proteína quinasa C α , y por lo tanto, aplazando la fusión fagosoma-lisosoma (Scianimanico y col., 1999; Dermine y col., 2000). Esta inhibición de la fusión fagolisosomal es un factor limitante para que se pueda producir la diferenciación del amastigote, ya que de esta forma existe tiempo suficiente para que se complete el proceso (Holm y col., 2001). Sin embargo, recientes estudios de imagen en tiempo real han demostrado que no existen diferencias entre las cinéticas de reclutamiento de proteínas de membrana LAMP de fagosomas conteniendo una cepa salvaje de *L. donovani* y los que albergan una cepa deficiente en LPG (Forestier y col., 2011). Los amastigotes dentro del macrófago se dividen de forma binaria, pueden llegar a ser desde decenas hasta cientos dentro de un mismo macrófago. Este estado replicativo hace que los amastigotes se liberen periódicamente por un mecanismo poco definido y reinfectar rápidamente otros fagocitos (macrófagos o células dendríticas) y algunos tipos de células no fagocíticas como los fibroblastos (McConville y col., 2007).

Una vez dentro del vector, el parásito sufre una serie de transformaciones complejas en el intestino medio del insecto, liberándose los amastigotes del interior

de las células hospedadoras. La disminución de la temperatura corporal promueve la diferenciación de los amastigotes a promastigotes procíclicos, que tienen morfología fusiforme y flagelo, replicándose en la sangre ingerida encapsulados dentro de una matriz peritrófica secretada por el epitelio intestinal. Tras unos días, los promastigotes procíclicos retrasan su replicación para diferenciarse en promastigotes nectomona, de unos 15-20 μm de longitud y móviles, que se acumulan en la parte anterior de la matriz provocando su ruptura. Los parásitos libres se encaminan en su mayoría hacia el intestino anterior hasta alcanzar el límite con el epigastrio del insecto, donde se unen al epitelio del intestino mediante el LPG. Una vez han alcanzado la válvula estomoidal, los promastigotes nectomona evolucionan a promastigotes leptomona, algo más cortos que aquellos. Cuando los parásitos alcanzan la faringe del insecto se unen a su superficie mediante una estructura derivada del extremo libre del flagelo llamado hemidesmosoma. Finalmente, los promastigotes se diferencian a su forma metacíclica, plenamente infectiva, listos para ser nuevamente inoculados (Kamhawi, 2006).

1.2.2. Respuesta inmune del hospedador

Una vez que el parásito se encuentra dentro del hospedador, los macrófagos son las células diana donde se establece la infección y tiene lugar la replicación. Estas células pertenecen al sistema inmune y son las encargadas de presentar los antígenos parasitarios a través de las moléculas de las clases I y II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad a los linfocitos. Es decir, son las encargadas de iniciar la respuesta inmune específica. La resistencia del hospedador va a estar determinada por una respuesta de tipo Th1, mediada principalmente por el componente celular, y la respuesta Th2 que se caracteriza por la producción de anticuerpos (Kemp, 2000; Spellberg y Edwards, 2001).

El destino de los amastigotes en el interior de los macrófagos va a depender de su estado de activación (Alexander y Bryson, 2005). Los linfocitos que participan en la respuesta protectora producen de forma predominante citoquinas pro-inflamatorias Th-1 (productoras de IFN- γ). Los macrófagos activados por la ruta clásica (M1) secretan IL-12 con lo que inducen la producción de IFN- γ en las células *natural killer* (Park y col., 2000). El IFN- γ interacciona con los macrófagos lo

que desencadena la liberación de TNF- α . IFN- γ y TNF- α tienen una acción sinérgica que produce la activación de la óxido-nitrico-sintasa (NOS2), generando NO a partir de L-arginina (Muñoz-Fernández y col., 1992). Los macrófagos activados por linfocitos Th2 promueven una ruta alternativa (M2) mediada por citoquinas entre las que se incluyen TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, lo que hace que la célula inmune se vuelva permisiva al desarrollo del parásito debido a la activación de la síntesis de poliaminas a partir de la L-arginina. La IL-10 evita que las células Th1 sinteticen citoquinas, especialmente el IFN- γ (Wu y col., 1993). Por su parte, el papel de la IL-13 no está del todo claro, sin embargo, se ha visto que esta citoquina podría estar involucrada en la regulación de la liberación de IFN- γ en macrófagos estimulados (Murray y col., 2006).

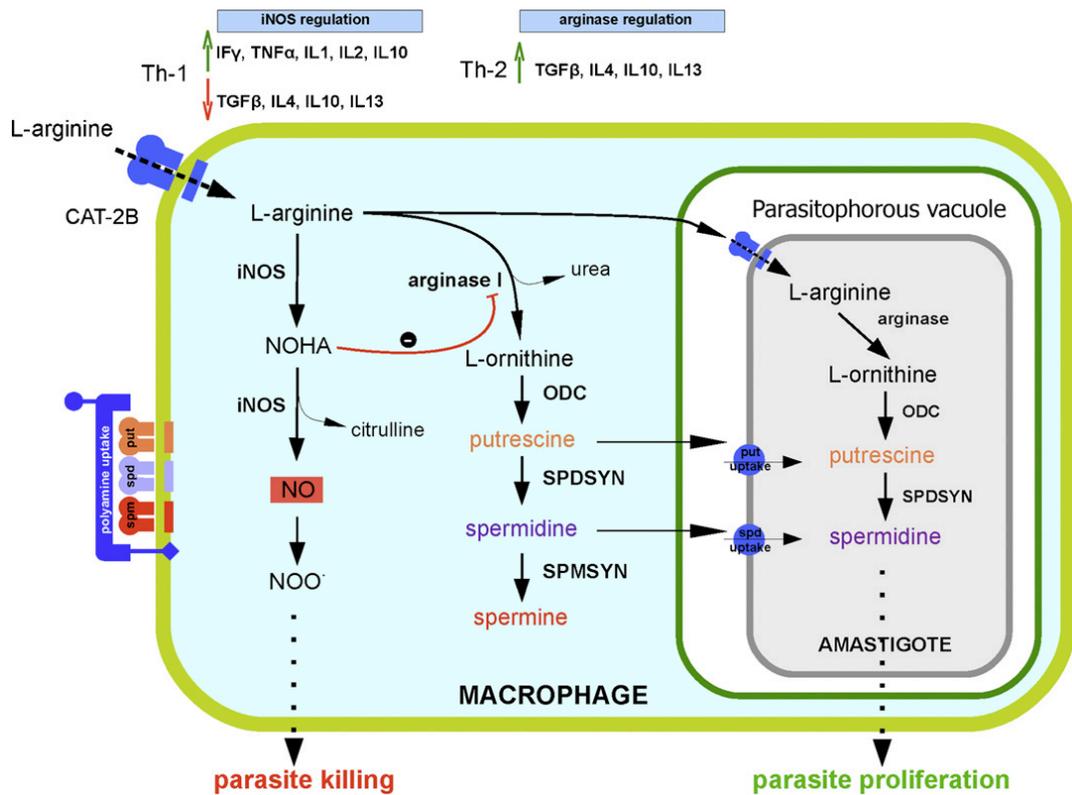


Figura 1.7. Representación esquemática de las rutas metabólicas de la L-arginina en el hospedador y en el parásito. Extraído de Balaña-Fouce y col. (2012a).

El metabolismo de la arginina (Fig. 1.7.) juega un papel muy importante en la activación del macrófago así como en la supervivencia del parásito durante la infección. La activación M1 induce la actividad NOS2 en los macrófagos que producen NO y citrulina. La producción de NO inducirá la síntesis de otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNOS) (Wanasen y Soong, 2008). Además de la regulación transcripcional que llevan a cabo las citoquinas y las interleuquinas sobre el sistema NOS2/arginasa, existe una regulación metabólica a nivel de intermediarios entre ambas enzimas. La N- ω -hidroxi-L-arginina (NOHA) es un intermediario de la degradación de la L-arginina a NO y citrulina, e inhibe de forma competitiva la arginasa, previniendo directamente la formación de ornitina y, como consecuencia, de putrescina (Iniesta y col., 2002). Como resultado final de esta activación Th1 se produce la muerte del parásito, el fin de la infección y el comienzo del proceso de auto curación.

Por el contrario, la activación de los macrófagos por linfocitos Th2 causa un aumento de la actividad de la arginasa I del hospedador, dando lugar a la formación de ornitina, uno de los aminoácidos precursores de la síntesis de poliaminas del parásito. Las poliaminas sintetizadas, tanto por el parásito como por el hospedador, son utilizadas por los amastigotes para proliferar dentro de las vacuolas parasitóforas, lo que resulta en la progresión de la infección y en la muerte del hospedador (Muleme y col., 2009).

1.3. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA LEISHMANIOSIS

En el año 1945 comienzan a utilizarse los atimoniales pentavalentes (Sb^V) para el tratamiento de la LV. La eficacia de estos fármacos – Pentostam[®] y Glucantime[®] – se ha visto reducida debido a la aparición de cepas resistentes y por su alta toxicidad. Como alternativa, existen otros fármacos como la pentamidina y el alopurinol que llevan también asociados estos problemas aunque de manera más reducida (Alvar, 2001; Balaña-Fouce y col., 1998), pero requieren de largos tratamientos de administración parenteral (Amato y col., 2008). Actualmente, la anfotericina B liposomal (L-AMB) es utilizada como droga de elección para el tratamiento de la LV en países desarrollados. Sin embargo, su introducción en los

países de menos recursos se está retrasando debido a la prolongada pauta posológica de administración y a su elevado coste. Recientemente, con el fin de facilitar la introducción de estos fármacos en estos países, ciertas empresas farmacéuticas por mediación de la OMS, han concertado bajar los precios, y elevar las dosis para así reducir la duración del tratamiento (Sundar y col., 2003; Sundar y col., 2010).

En cuanto a la LC, no existe un consenso en torno a cuál es la mejor aproximación terapéutica. Esto se debe a que existen importantes deficiencias en: i) la identificación de las especies causantes, ii) establecer un criterio de curación correcto, iii) el tiempo de seguimiento médico necesario para este proceso infectivo (González y col., 2010). En el año 2007, Amato y col. (2007) realizaron un exhaustivo estudio de los casos de LMC en la literatura científica, incluyendo tanto los tratamientos aplicados como las tasas de curación observadas. Los datos mostraron que el tratamiento con Glucantime[®] curaba al 88 % de los pacientes, mientras que el Pentostam[®] sólo alcanzaba un porcentaje de curación de apenas el 51 %. Por ello, los autores establecieron que el Glucantime[®] podría ser la droga de elección en el tratamiento de la LMC, ya que además, cuando se comparaban las tasas de curación con las de la L-AMB o de la pentamidina, los valores resultantes eran muy similares. En la Tabla 1.3 se recogen los precios de la principales drogas leishmanicidas en uso con fecha de julio de 2011 presentados por den Boer y col. (2011).

Tabla 1.3. Precio de los actuales fármacos de uso leishmanicida (julio 2011)

Compuesto	Nombre y Fabricante	Precio estimado
Anfotericina B deoxicolato Anfotericina B liposomal	AmBisome [®] Gilead (EEUU)*	Variable, precio medio 7,5 US\$/vial de 50 mg Precio negociado OMS 18 US\$/vial de 50 mg
Miltefosina	Impavido [®] Paladin (Canadá)*	Adultos: 45-54 € por 56 cápsulas (50 mg) Niños: 35-39 € por 56 cápsulas (10 mg)
Paromomicina	Paromomycin GlandPharma (India)*	Precio aprox. 15 US\$ adultos (21 días)
Estibogluconato de sodio	Pentostam GSK (UK)	66 €/vial (100 mL), 100 mg/mL
Antimoniato de Meglumina	Glucantime Aventis (India)*	Precio negociado OMS 1,2 US\$ vial (5 mL)

(*) fabricante único

Una alternativa de reciente aparición a estos fármacos son los quimioterápicos orales, como los derivados de la alquilfosfolina (miltefosina y edelfosina), la paromomicina y los compuestos azólicos. La miltefosina se desarrolló originalmente como agente antineoplásico, y ha resultado ser un gran avance en la terapia frente a la leishmaniosis visceral al ser el primer compuesto de administración oral con unos niveles de curación del 94% en estudios de fase III incluyendo casos de resistencia a antimoniales pentavalentes. La seguridad de este medicamento es muy prometedora, ya que los efectos secundarios se limitan a molestias gastrointestinales y al aumento de creatinina sérica. En la India se han realizando estudios en fase IV de experimentación clínica después de haber sido aprobada por sus Autoridades Sanitarias con el nombre de Impavido®. La miltefosina oral ha sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como fármaco "huérfano" en junio de 2002, y se comercializa en Alemania bajo el nombre de Impavido®, tras demostrar sus efectos en 39 pacientes europeos con leishmaniosis visceral (van Griensven y col., 2010) y en pacientes con leishmaniosis post kala-azar. En España se comercializa con el nombre de Miltex® pero como tratamiento tópico de recidivas cutáneas de cáncer de mama. A principios de 2007 se ha comenzado a vender para uso veterinario en el tratamiento de la leishmaniosis canina bajo el nombre de Milteforan®.

1.4. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

Como se ha dicho a lo largo de esta Memoria, los miembros de la Familia Trypanosomatidae son responsables de enfermedades graves que afectan a las capas menos favorecidas de los países en desarrollo. Aunque la patogenia de estas enfermedades es el resultado de una desregulación del sistema inmune del hospedador y a pesar de que los individuos que las han padecido y sobrevivido a ellas han desarrollado una inmunidad adquirida para el resto de su vida, no existe en el mercado una vacuna eficaz para ninguna de estas enfermedades. Por otro lado, los tratamientos farmacológicos actuales son tóxicos, requieren la administración intravenosa, y se ha abusado de ellos hasta el punto de originar cepas resistentes. Cabe mencionar aquí el hecho de que las personas afectadas tengan escasos recursos económicos y que pertenezcan a países con poca o nula

cobertura sanitaria, hace que las grandes empresas farmacéuticas carezcan de interés en invertir en I+D para erradicar estas enfermedades.

Sin embargo, a partir de la reunión celebrada en 2003 en Ginebra, se estableció el objetivo de desarrollar hasta 13 nuevos tratamientos frente a estas enfermedades en un periodo no mayor a 15 años. Esta iniciativa liderada por Organizaciones No Gubernamentales (ONGs) como Médicos Sin Fronteras (MSF) con el apoyo de instituciones públicas de prestigio de Brasil, Francia, India, Malasia y Kenia y la OMS (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; TDR) recibe el nombre de Drug for Neglected Diseases initiative (DNDi) y se espera que en 2018 haya cubierto sus objetivos. Por su parte, la rama de investigación de Glaxo Smith Kline (GSK) en Madrid (Tres Cantos Open Lab) ha asumido el compromiso de poner sus librerías de cientos de miles de compuestos químicos del repositorio de GSK a disposición de los investigadores académicos que aportan mano de obra cualificada y plataformas validadas de evaluación fenotípica de alguna de las enfermedades olvidadas para ser testadas *in vitro* en sus instalaciones.

Con objeto de utilizar estas instalaciones, se están desarrollando nuevas plataformas de cribado de pequeñas moléculas bajo las premisas de miniaturización, robustez, reproducibilidad y alto rendimiento en formatos de microplaca de 96 y 384 pocillos (High Throughput Screening: HTS) ya sean dependientes (Target-Based Screening TBS) o independientes de diana (Phenotypic-Based Screening PBS) basadas en la estrategia “from hit to lead”, una aproximación holística de I + D utilizada por las empresas farmacéuticas.

Una aproximación muy interesante de HTS son los cribados de alto contenido (High Content Screening: HCS) cuyas lecturas están basadas en el tratamiento múltiple de imágenes de microscopía confocal con un software adecuado (Sistemas Opera[®], Operetta[®] PerkinElmer y similares). Alternativamente se ha considerado una alternativa válida el uso de parásitos transgénicos que expresan marcadores fenotípicos (fluorescentes o luminiscentes) fácilmente detectables *in vitro*. Los parásitos luminiscentes tienen la ventaja adicional de poder

ser utilizados *in vivo* en ensayos preclínicos usando modelos murinos que infectan órganos internos por medio de dispositivos de bioimagen.

1.4.1. Cribados basados en Dianas (TBS)

El objetivo de los TBS se basa en interrumpir proteínas específicas del patógeno que: i) sean esenciales para su supervivencia; ii) estén ausentes o sean estructuralmente diferentes a las del hospedador y iii) que a pesar de no ser únicas, se expresen mayoritariamente en el parásito. La disponibilidad de bases de datos genómicas de los tritryps y otros parásitos englobados dentro de las NTDs ha permitido la evaluación de distintas dianas farmacológicas obtenidas mediante expresión heteróloga de las proteínas codificadas a partir de la información de sus genes codificantes ortólogos (Ivens y col., 2005). Los estudios predictivos de interacción *in silico* entre librerías de compuestos y sus dianas modeladas 3D – a partir de los estudios de difracción de rayos X de sus cristales – constituyen un primer paso para la selección de aquellas moléculas con mejores constantes de afinidad.

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

No obstante, los TBS no están exentos de inconvenientes a la hora de validar un “hit”: i) el amastigote se localiza en el interior de la vacuola parasitófora de los macrófagos, donde el compuesto debe entrar y permanecer activo. En consecuencia, con el fin de retener su eficacia, el “hit” debe ser suficientemente permeable como para poder atravesar varias membranas, y permanecer estable en un medio ácido; ii) el “hit” no debería ser degradado por las enzimas oxidativas de xenobióticos – tanto del anfitrión como del parásito; iii) en numerosas ocasiones el “hit” no es suficientemente selectivo frente al patógeno, lo que ocasiona la muerte de las células del hospedador. Estos hechos demuestran que la potencia mostrada por el “hit” en los TBS es una condición necesaria pero no suficiente para su validación. Por esta razón se necesita complementar los resultados del TBS con cribados PBS como fase previa a los ensayos preclínicos en animales.

1.4.2. Cribados basados en Fenotipo (PBS)

Los modelos de cribado PBS utilizan el patógeno completo como diana independientemente del modo de acción de las moléculas utilizadas. Para su validación, estas plataformas deben imitar lo más posible el entorno real en el que se produce la interacción con el hospedador definitivo. Los parásitos monoxenos, tales como las formas hemáticas procíclicas de *T. brucei*, modificadas o no para expresar reporteros, puede servir por sí mismas como modelos para la detección de “hits” bajo condiciones HTS *in vitro*. Por otro lado, los PBS diseñados para parásitos heteroxenos como *T. cruzi* y *Leishmania* spp. deben utilizar la forma parasitaria responsable de la infección en el hospedador definitivo, ya que se han demostrado variaciones de sensibilidad a fármacos dependientes de estadio. De esta manera, los estudios preliminares utilizando promastigotes de *Leishmania* demostraron que apenas el 4% de los “hits” identificados tenían algún efecto sobre las formas amastigotes intracelulares (Freitas-Junior y col., 2012). Estos resultados refuerzan el criterio de que el cribado fenotípico de parásitos intracelulares debe basarse en la forma amastigote. De acuerdo con esta premisa se han realizado cribados de miles de compuestos frente a amastigotes axénicos de *Leishmania* spp. y *T. cruzi* en ausencia de las células hospedadoras (Bustamante y col., 2011). Sin embargo, una crítica a este modelo de estudio es que el perfil de expresión génica de los amastigotes axénicos presenta marcadas diferencias con el de los

amastigotes derivados de lesión (Holzer y col., 2006). Además, o como consecuencia de lo anterior, la vacuola parasitófora donde habita el patógeno está sometida a condiciones de pH y temperatura extremas, que podrían ser responsables de la degradación de muchos fármacos. Para solucionar estos problemas y poder mimetizar al máximo el ambiente en el que el compuesto químico va a interactuar con el patógeno, los HTS basados en el fenotipo de parásitos intracelulares, deben llevarse a cabo preferentemente en amastigotes intracelulares. En este contexto, el uso de líneas celulares monocíticas parece ser una alternativa interesante aunque técnicamente compleja. Con este sistema se han cribado más de 300.000 moléculas pequeñas procedentes de diferentes librerías de compuestos en *L. donovani* que infectaban cultivos de leucemia monocítica humana (THP-1) mediante un sistema de detección múltiple de imágenes de microscopía confocal de alto contenido (HCS) (Siqueira-Neto y col., 2012).

1.4.3. Cribados fenotípicos *ex vivo*

Recientemente se ha abierto un nuevo campo de investigación que está a medio camino entre las infecciones *in vitro* con células THP-1 humanas y las infecciones experimentales en ratones. Este nuevo enfoque consiste en la utilización de explantes de órganos infectados por *Leishmania* en ensayos fenotípicos HTS. En estos modelos, los roedores (ratones o cricetos) están infectados experimentalmente con cepas de *Leishmania* transgénicas cuyos órganos diana – ganglios, hígado o bazo – se van a recoger una vez establecida la infección para desarrollar el explante. Los ratones BALB/c reproducen VL y CL aguda por *L. infantum* y *L. major*, respectivamente, debido al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa de tipo Th2. Por su parte, el hámster es el animal preferido para desarrollar un modelo de infección crónica de VL por *L. donovani*. Los explantes infectados de ganglios linfáticos y de bazo muestran ventajas sobre los modelos de infección *in vitro*, ya que incluyen a toda la población celular implicada en la interacción parásito/hospedador: macrófagos, células CD3+ y CD4+, linfocitos B y granulocitos; lo que podría afectar al efecto terapéutico del compuesto ensayado. Además, el número de animales utilizados en estos ensayos puede ser drásticamente reducido, ya que con un solo bazo infectado se pueden

sembrar cuatro placas de 96 o dieciséis placas de 384 pocillos, permitiendo así la evaluación de varias colecciones de pequeñas moléculas a dosis única.

Un HTS fenotípico de 4035 compuestos basado en explantes de bazo de hámster ha sido validado por el grupo del Dr. Melby en la Universidad de Texas Medical Branch en Galveston (TX, EE.UU.). Para ello utilizaron los bazos de cricetos infectados con una cepa de *L. donovani* (luc) cultivados en un formato de placa de 96 pocillos (Osorio y col., 2011). Recientemente, este grupo ha publicado la validación de un HTS fenotípico de explante de ganglio linfático murino utilizando en este caso, una cepa de *L. major* (luc) (Peniche y col., 2014).

1.4.4. Deconvolución de dianas

Los métodos HTS basados en fenotipo miden la respuesta integral de un sistema celular a una librería de compuestos químicos independientemente de la interacción de éste con aquel. Sin embargo, cualquiera que sea el modelo fenotípico utilizado, es importante la identificación de las dianas moleculares que subyacen a las respuestas fenotípicas observadas: i) para comprender el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad; ii) para ayudar al diseño racional de fármacos al permitir estudios eficientes de Relación Estructura-Actividad (SAR); iii) para predecir los aspectos relacionados con la toxicidad y los efectos secundarios de las moléculas. Recientemente, se perfila una estrategia retrospectiva de identificar el mecanismo de acción de moléculas seleccionadas en un cribado fenotípico: la deconvolución de dianas.

El objetivo final de la deconvolución de dianas es la identificación de las moléculas biológicas que interactúan directamente con el "hit" seleccionado. Con este fin se han descrito multitud de tecnologías diferentes basadas en la afinidad por los componentes celulares del patógeno, bajo la premisa de que la interacción física es el requisito previo para definir los efectos funcionales. Sin embargo, no existe un procedimiento operativo estándar y las metodologías para la identificación de dianas tendrán que ser decididas caso por caso. La forma directa de identificar dianas dentro del patógeno es la cromatografía de afinidad y posterior caracterización mediante espectrometría de masas de las proteínas retenidas por el

compuesto inmovilizado en una matriz. Este método tiene una ventaja importante y es que las proteínas identificadas mantienen su estructura terciaria intacta y pueden ser analizadas mediante difracción de rayos X tras su cristalización. Sin embargo, la inmovilización y/o etiquetado del fármaco, es un problema a tener en cuenta ya que puede alterar los parámetros de interacción con la diana. Esto significa que puede ser necesario un estudio previo con el fin de identificar una posición en la que la molécula puede ser modificada con el fin de evitar que pierda su actividad biológica.

Algunos de los métodos utilizados de deconvolución de dianas pueden ser apoyados indirectamente por tecnologías basadas en microarrays de DNA y análisis proteómico. La aplicación de estas tecnologías, que no necesitan la modificación del fármaco, puede también conducir a la identificación de dianas moleculares. Por ejemplo, la investigación de los cambios globales de expresión génica de un organismo inducida por un fármaco potencial y el análisis de un determinado perfil transcriptómico y o proteómico puede ayudar a comprender el mecanismo de acción de la molécula mediante "mapas de conectividad". El último paso para caracterizar el mecanismo de acción de una molécula es la confirmación de las dianas identificadas asociadas con los efectos funcionales detectables en el cribado fenotípico. Si estuvieran disponibles las estructuras tridimensionales de la proteína identificada, se deberían realizar análisis estructurales *in silico* de la interacción proteína-compuesto. Ya que estos análisis generan únicamente predicciones, es necesario realizar ensayos directos de interacción fármaco-proteína y sus consecuencias funcionales. La resonancia de plasmón superficial para estudiar el análisis de interacciones y los cambios fenotípicos asociados mediante estudios genéticos funcionales como el ARN interferencia, o la sobreexpresión de genes, son métodos de elección para la confirmación de dianas.

1.4.5. Aplicación de patógenos modificados para el cribado fenotípico de fármacos

El uso de parásitos vivos modificados genéticamente para el cribado masivo de drogas tiene evidentes ventajas sobre los métodos clásicos de tinción y recuento, que son muy laboriosos y lentos. Los parásitos modificados – fluorescentes o luminiscentes – que no hayan perdido la virulencia como

consecuencia de la manipulación genética, constituyen una alternativa ventajosa para ser usados en condiciones de HTS. En este sentido, la bioluminiscencia tiene ciertos inconvenientes con respecto a la fluorescencia: i) las proteínas bioluminiscentes necesitan la adición de un sustrato emisor de luz específico, caro y con una pobre penetración en las células diana; ii) las placas o tejidos deben fijarse con el fin de grabar la señal, que junto con su corta vida media hace que sea inservible para obtener mediciones repetidas de la misma muestra. Por su parte la fluorescencia cubre la totalidad del espectro de luz visible – incluido el infrarrojo cercano – lo que nos permiten seleccionar la longitud de onda que mejor se ajusta a nuestro modelo experimental. Además, los marcadores fluorescentes permiten usar varias proteínas simultáneamente sin interferencia entre ellas, por lo que se hace factible el estudio de diferentes interacciones moleculares y/o celulares *in vitro*. Sin embargo, la fluorescencia no está desprovista de inconvenientes: i) la exposición de las células a ciertas longitudes de onda de excitación puede perturbar las funciones celulares normales; ii) la baja penetrabilidad de la emisión fluorescente la hace inapropiada, al día de hoy, para los estudios *in vivo* con patógenos que colonicen órganos internos del animal (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Proteínas fluorescentes usadas en estudios fenotípicos HTS

Proteína	color	λ_{ex}	λ_{em}	Referencias
GFP	verde	395 nm	504nm	(T sien, 1998)
EGFP	verde	488 nm	507nm	(T sien, 1998)
YFP	amarillo	514 nm	527 nm	(Ormö y col., 1996)
Citrina	verde	516 nm	519 nm	(Griesbeck y col., 2001)
DsRed	rojo	558 nm	583 nm	(Matz y col., 2009)
mCherry	rojo	587 nm	610 nm	(Shaner y col., 2004)
tdTomato	rojo	554 nm	581 nm	(Shaner y col., 2004)
iF1.4	infrarrojo	683 nm	708 nm	(Shu y col., 2009)
iFRP	infrarrojo	690 nm	713 nm	(Filonov y col., 2012)

Precisamente es el uso de los parásitos transgénicos en los estudios preclínicos *in vivo* el que genera mayores controversias sobre su adecuación. Lo primero, como ya se ha comentado antes, la cepa manipulada genéticamente debe conservar intacta su virulencia respecto a la original. Este punto está perfectamente solventado como se verá más adelante. En segundo lugar, el modelo animal de la enfermedad que se quiera estudiar. Para las infecciones que afectan a órganos internos, las proteínas bioluminiscentes son instrumentos más sensibles y precisos que las proteínas fluorescentes ya que permiten distinguir entre los procesos inflamatorios asociados con una infección y la carga parasitaria. Multitud de estudios han demostrado que la emisión de luz de la luciferasa tiene una penetración más profunda en los tejidos que la fluorescencia. Los parámetros principales para formación de imágenes *in vivo* son la fotoestabilidad, la penetración de la luz, el brillo y la relación señal-ruido. A pesar de que la bioluminiscencia tiene mejor contraste que la fluorescencia, la emisión fluorescente es más brillante, lo que permite tiempos de adquisición menores (200-300 ms para las proteínas fluorescentes vs. 5-10 min para las luminiscentes), reduciendo drásticamente la cantidad de ruido adquirida. Sin embargo, a pesar de esta superioridad de la bioluminiscencia en la detección cuantitativa de patógenos en órganos internos, no se debe olvidar la administración obligada del sustrato emisor de luz que es caro, requiere de administración endovenosa y tiene una vida media de emisión de luz corta. Estos problemas no ocurren con las infecciones cutáneas de estas enfermedades. La superficialidad de las mismas – almohadilla plantar de las patas traseras o el dorso de la oreja de ratones – permite el seguimiento de la emisión de diferentes proteínas fluorescentes. Esto proporciona un considerable ahorro de material, así como contribuye a una reducción significativa de la manipulación traumática de los animales.

1.4.6. Estrategias para la generación de patógenos modificados

Para ser totalmente funcionales los genes reporteros deben expresarse durante el ciclo de vida completo del parásito. Para este fin, es muy recomendable la transformación del parásito con vectores integrativos. Si bien es cierto que los vectores episomales tienen una tasa de replicación superior, necesitan presión antibiótica para evitar la pérdida del gen reportero lo que limita su uso cuando se

llevan a cabo infecciones *in vivo*. Además, las estrategias integradoras evitan la expresión desigual de los genes reporteros como consecuencia de la amplia variación en el número de copias del plásmido. Por esta razón, la integración de los genes reporteros en los loci 18s rRNA se ha convertido en el lugar más utilizado para crear cepas transgénicas estables en el ciclo vital completo del parásito. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la tasa de expresión en las formas intracelulares (amastigotes) procedentes de lesión son mucho menos brillantes que las de los promastigotes procíclicos y metacíclicos que sirvieron para infectar los animales. Esta expresión desigual de genes reporteros en las formas intracelulares se ha atribuido a varios factores: i) metabolismo más lento del amastigote; ii) diferencias en la composición del medio de cultivo; iii) pH más bajo y iv) inactivación por proteasas específicas de la fase amastigote, entre otras. Con el fin de paliar este inconveniente, se ha planteado la hipótesis de insertar 3'UTRs de genes específicos de la forma amastigote por debajo del gen reportero con el fin de que proporcionasen las señales de procesamiento requeridas para mejorar las tasas de expresión de estos genes. Mißlitz y colaboradores (2000) mostraron que los niveles de expresión de la GFP en *Leishmania* fueron 2-10 veces superiores en amastigotes que en promastigotes, cuando el gen reportero se colocó corriente abajo de la región intergénica del gen *LmCPB2.8* (específico de amastigotes de la cisteína proteasa B). Por esta razón, el futuro desarrollo de nuevos vectores de expresión debe incluir fragmentos que contengan estas secuencias intergénicas responsables de las tasas elevadas de transcripción en la fase amastigote.

1.4.7. El uso de tripanosomátidos fluorescentes en HTS

Los patógenos modificados genéticamente con reporteros fluorescentes se han convertido en una herramienta útil y versátil en el descubrimiento de nuevas moléculas en HTS fenotípicos. Como dijimos anteriormente, la selección de la plataforma HTS tiene como objetivo dirigirse específicamente a la etapa intracelular de estos parásitos que es la realmente lesiva para el hospedador. A pesar de esto, y probablemente debido a las dificultades encontradas en el manejo de estas formas intracelulares en su forma axénica, los investigadores se han centrado en estudiar la etapa de promastigote. La alternativa más interesante a las dos anteriores son las infecciones experimentales ya sea realizadas *in vitro* en una línea celular o ya sea *ex vivo* a partir de explantes cultivados procedentes de un órgano

infectado de forma natural. Hay muchos factores que deben tenerse en cuenta al diseñar un HTS de patógenos intracelulares: i) la tasa de infección disminuye gradualmente con el tiempo como resultado de la replicación del parásito en los fagolisosomas de los macrófagos; ii) los fármacos deben mantenerse en el medio de cultivo el tiempo suficiente para asegurar su eficacia; iii) la posibilidad de monitorear el estado del cultivo a diferentes tiempos sin perturbar su crecimiento. Todos estos puntos los satisfacen los patógenos modificados con proteínas fluorescentes ya que pueden obtenerse imágenes de los mismos a diferentes tiempos sin la necesidad de proceder a su fijación – proceso irreversible que acaba con la viabilidad del cultivo. La Tabla 1 muestra diferentes estudios en los que se han utilizado parásitos fluorescentes y luminiscentes para cribar moléculas pequeñas.

Los primeros resultados obtenidos comparando amastigotes axénicos con intracelulares fueron obtenidos por el grupo Canadiense del Centre for Host-Parasite Interactions (CHPI) de la Universidad de Laval, Quebec (Canadá). En estos trabajos pioneros se evaluó la actividad leishmanicida de dos agentes antimicrobianos de uso clínico – Pentamidina[®] y Glucantime[®] – en una cepa transfectada de *Leishmania* spp. con la luciferasa de luciérnaga (luc). Papadopoulou y colaboradores llegaron a la conclusión de que los amastigotes intramacrofágicos eran más sensibles a los dos fármacos que los axénicos. Por su lado Lang y colaboradores demostraron resultados semejantes cuando se evaluaron varios derivados quinolónicos en amastigotes de *L. amazonensis* (luc) que infectaban macrófagos murinos de médula ósea. Un estudio realizado con posterioridad con aislados clínicos de *L. donovani* resistentes a antimoniales se transfectaron con GFP y sirvieron para infectar macrófagos murinos J744A.1. Los amastigotes resultantes mostraron sensibilidad a miltefosina, pentamidina, paromomicina y anfotericina B, pero conservaron la resistencia a los antimoniales después de la manipulación genética. Resultados incluidos en la presente Memoria demuestran la idoneidad de una cepa transgénica de *L. infantum* (mCherry) como plataforma de cribado de fármacos en amastigotes intracelulares. Esta cepa ha demostrado una sensibilidad semejante a la salvaje con fármacos de uso clínico frente a VL como la anfotericina B, paromomicina y miltefosina.

Tabla 1.5. Estudios realizados usando trityps fluorescentes o luminiscentes

Especie	Forma	gen	Expresión	Aplicación	Referencias
<i>Leishmania</i>					
<i>L. donovani</i>	Promast.	<i>gfp</i>	Integrativo Episomal	HTS	(Singh y col., 2003)
	Promast.	<i>luc</i>	Episomal	HTS	(Luque-Ortega y col., 2009)
	Promast.	<i>luc</i>	Episomal	HTS	(Ashutosh y col., 2005)
	Promast.	<i>luc</i>	Integrativo Episomal	Infección in vivo	(Roy y col., 2000)
<i>L. major</i>	Promast.	<i>luc</i>	Integrativo Episomal	Infección in vivo	(Roy y col., 2000)
	Amast.	<i>gfp</i>	Integrativo	Infección in vivo	(Misblitz y col., 2000)
	Promast.	<i>mcherry</i>	Integrativo	Vacuna	(Calvo-Álvarez y col., 2012)
	Amast.	<i>ifp1.4</i>	Integrativo	HTS	(Balaña-Fouce y col., 2012b)
<i>L. mexicana</i>	Amast.	<i>gfp</i>	Integrativo	Infección in vivo	(Misblitz y col., 2000)
<i>L. amazonensis</i>	Amast.	<i>luc</i>	Integrativo	Cribado	(Sereno y col., 2001)
	Promast.	<i>gfp</i>	Episomal	Cribado	(Chan y col., 2003)
	Promast.	<i>gfp/rfp</i>	Integrativo	Cribado	(Rocha y col., 2013)
<i>Trypanosoma</i>					
<i>T. brucei</i>	Trypomast.	<i>egfp</i> <i>ecfp</i> <i>eyfp</i> <i>mrfp1</i>	Integrativo	Parasitemia	(Balmer y Tostado, 2006)
	Trypomast.	<i>egfp/rfp</i>	Integrativo	Insectos	(Peacock y col., 2007)
	Trypomast.	<i>gfp</i> <i>mrfp1</i>	Integrativo	Intercambio génico	(Gibson y col., 2008)
<i>T. cruzi</i>	Epimast.	<i>gfp/DsRed</i>	Integrativo Episomal	Ciclo	(Guevara y col., 2005)
	Epimast.	<i>gfp/rfp</i>	Integrativo	Parásito/ hospedador	(Pires y col., 2008)

Una crítica frecuente al uso de infecciones *in vitro* es la escasa semejanza en el modo en que estas llegan a ser infectadas comparado con el proceso natural. Los sistemas HTS deben imitar al máximo esas condiciones o sino tomarlas prestadas de la misma naturaleza. Los cultivos de explantes orgánicos procedentes

de roedores infectados experimentalmente con patógenos fluorescentes o luminiscentes se presenta como una interesante alternativa. Este método tiene además la ventaja de incluir el repertorio completo de células del sistema inmunitario que cohabitan en el sitio de la infección. Esta metodología ha sido validada con una biblioteca de varios miles de compuestos frente a VL en explantes de bazo procedentes de hamsters infectados con una cepa de *L. donovani* (luc). Por otra parte, Prada y colaboradores usaron un enfoque similar con el fin de estudiar el efecto leishmanicida de varios inhibidores de TopIB en explantes esplénicos murinos infectados con *L. infantum*-iRF1.4 que expresa constitutivamente una proteína fluorescente en el infrarrojo cercano. Este modelo ha sido también usado con éxito en explantes de ganglios linfáticos procedentes de ratones BALB/c infectados con *L. major* (luc) como modelo de CL.

1.4.8. El uso de parásitos transgénicos para la evaluación preclínica de fármacos en tiempo real

Las infecciones experimentales circunscritas al sitio de inyección en roedores guardan un estrecho paralelismo a las descritas naturalmente en los seres humanos. Por esta razón, las imágenes *in vivo* puede convertirse en una plataforma preclínica idónea para la selección de compuestos candidatos antes de hacer el salto a los ensayos clínicos en humanos (Calvo-Álvarez y col., 2015). Para estos estudios los patógenos fluorescentes o luminiscentes constituyen un nuevo tipo de herramienta para explorar las interacciones parásito hospedador *in vivo*. Además, tiene unas importantes connotaciones bioéticas al requerirse menos animales por grupo experimental para obtener resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, estas técnicas no están libres de pros y contras que limitan su uso en ensayos pre-clínicos. La bioluminiscencia es el método de elección para la evaluación de la carga parasitaria en los órganos internos, pero proporciona sólo imágenes de dos dimensiones con una resolución relativamente baja. Además, la imagen bioluminiscente precisa de la administración endovenosa de un sustrato que llegue hasta la vacuola parasitófora de las células infectadas. Por su parte, el uso de proteínas fluorescentes se limita, hasta el momento, a los modelos *in vivo* de CL debido a su pobre penetración en los tejidos y órganos internos y a la autofluorescencia de los mismos (Tabla 1.6).

Table 1.6. Estudios con tripanosomatidos fluorescentes y luminiscentes realizados *in vivo*

Patógeno	gen	Enfermedad	Aplicación	Referencias
Fluorescencia				
<i>L. amazonensis</i>	<i>egfp</i>	CL	Inmunoterapia	(Metha y col., 2008)
<i>L. major</i>	<i>gfp</i>	CL	Quimioterapia	(Latorre-Esteves y col. (2010)
<i>L. major</i>	<i>egfp</i>	CL	Validación	(Bolhassani y col., 2011)
<i>L. major</i>	<i>mCherry</i>	CL	Inmunoterapia	(Calvo Álvarez y col., 2012)
<i>T. cruzi</i>	<i>tdTomato</i>	Chagas	Quimioterapia	(Canavaci y col., 2010)
Luminiscencia				
<i>L. amazonensis</i>	<i>luc</i>	CL	Validación	(Lang y col., 2005)
<i>L. major</i>	<i>luc</i>	CL	Quimioterapia	(Lecoeur y col, 2007)
<i>L. major</i>	<i>luc</i>	CL	Quimioterapia	(Lecoeur y col, 2010)
<i>L. infantum</i>	<i>luc</i>	VL	Validación	(Thalhofer y col., 2010)
<i>L. mexicana</i>		CL		
<i>L. major</i>	<i>luc</i>	CL	Validación	(de la Llave y col., 2011)
<i>L. donovani</i>		VL		
<i>L. infantum</i>	<i>luc</i>	VL	Quimioterapia	(Michel y col., 2011)
<i>L. amazonensis</i>	<i>luc</i>	CL	Quimioterapia	(Reimao y col., 2013)
<i>T. brucei</i>	<i>rluc*</i>	HAT ^{&}	Quimioterapia	(Claes y col., 2009)
<i>T. cruzi</i>	<i>luc</i>	Chagas	Quimioterapia	(Canavaci y col., 2010)
<i>T. cruzi</i>	<i>luc</i>	Chagas	Quimioterapia	(Andriani y col., 2013)
<i>T. vivax</i>	<i>luc</i>	Nagana	Patogenia	(D'Archivio y col., 2013)
<i>T. brucei</i>	<i>eluc**</i>	HAT	Quimioterapia	(Myburg y col., 2013)
<i>T. brucei</i>	<i>luc***</i>	HAT	Validación	(McLatchie y col., 2013)

* *Renilla reniformis* luciferasa

** enhanced firefly luciferase

*** red-shifted firefly luciferase

& Human African Trypanosomiasis: Enfermedad del Sueño

Las primeras publicaciones que demuestran la validez de estos métodos se realizaron en un modelo murino de CL que se había infectado subcutáneamente en el dorso de la oreja con una cepa de *L. amazonensis* (luc). Resultados semejantes se obtuvieron a las 10 semanas de una infectar la almohadilla plantar de ratones BALB/c con una cepa de *L. mexicana* (luc). Gracias a estos modelos Lecoeur y colaboradores (2007) optimizaron un protocolo de administración tópica de una pomada que tenía como principio activo un antibiótico aminoglucósido. El estudio concluyó demostrando que la duración del tratamiento era un factor de mayor peso que la dosis total aplicada en la curación de este modelo de CL. Canavaci y colaboradores examinaron una serie de compuestos con efectos tripanocidas en un modelo de ratón de la enfermedad de Chagas, producido por *T. cruzi* (luc). Sorprendentemente, ninguno de los compuestos analizados con la excepción de los controles de uso clínico benznidazol y posaconazol, fueron capaz de lograr la curación de la enfermedad. Estos resultados demuestran la dificultad de encontrar una buena correlación entre los resultados *in vitro* y los estudios preclínicos. Por el contrario, Andriani y colaboradores (2011) encontraron que dos compuestos seleccionados (“leads”) de un cribado HTS previo de 23 hits que fueron capaces de reducir la infección por *T. cruzi* (luc) en más de 90%. En la misma línea, un estudio preclínico de tripanosomiasis africana en CD-1 ratones infectados con *T. brucei* (luc) demostró que sólo el melarsoprol y el DB829, pero no otros nuevos fármacos seleccionados como “leads”, eran capaces de eliminar eficientemente los parásitos de la zona craneal después de 3 días de tratamiento en las etapas finales de la infección.

Una ventaja de las plataforma preclínicas de bioimagen es la de poder detectar patógenos en regiones anatómicas diferentes a las descritas hasta el momento. De esta manera, Michel y colaboradores fueron capaces de localizar una señal bioluminiscente en grasa mesentérica en ratones infectados con *L. infantum* (luc) después de la infección intraperitoneal. Este nicho orgánico inesperado no se observó cuando la infección se realizó con *L. donovani* (luc) lo que sugiere una localización específica de especie. En otro trabajo se encontró un acantonamiento de *T. brucei* (luc) en testículo como consecuencia de la administración de una serie de análogos de adenosina. Este tropismo inesperado podría ser explicado por una ineficiente distribución de los fármacos al atravesar la barrera sangre-testículo.

Igualmente se han utilizado proteínas fluorescentes en modelos de CL para estudiar el efecto de sistemas vacunales y fármacos. De esta manera, se estudió el efecto profiláctico de una poliproteína recombinante administrada a ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* (GFP) que indujo una disminución significativa tanto en la severidad de la lesión como de la fluorescencia ligada a la carga parasitaria. Nuestro grupo demostró recientemente las ventajas de una cepa de *L. major* (mCherry) para evaluar el efecto profiláctico de una vacuna experimental en un modelo de CL. Del mismo modo, se utilizó una cepa modificada de *L. major* (GFP) para evaluar el efecto leishmanicida de una pomada que contenía un fármaco fotosensibilizador basado en phenotiazinium que redujo significativamente la fluorescencia verde emitida por la carga de parásitos que infectan el dorso de la oreja del ratón.

1.5. DIANAS DE INTERVENCIÓN FARMACOLÓGICA EN *Leishmania* sp.

En general los fármacos leishmanicidas presentan una alta indeterminación en sus dianas terapéuticas. Esto dificulta la obtención de modelos simplificados en los cribados de moléculas pequeñas basados en el fenotipo con formato HTS. Esto sucede tanto con los fármacos que poseen una acción pleiotrópica elevada, tales como la pentamidina, como con aquellos que poseen una diana definida formalmente (Balaña-Fouce y col., 1998; Murray, 2000). Se han señalado multitud de dianas farmacológicas potenciales en *Leishmania* sp. de las que destacaremos las más interesantes.

Las enzimas glicolíticas están parcialmente compartimentalizadas en promastigotes y amastigotes. Las primeras enzimas de la ruta glucolítica están englobadas en un orgánulo específico denominado glicosoma, característica común a todos los tripanosomátidos, incluido *Leishmania* (Glew y col., 1988). El Pentostam® y la suramina son fármacos de primera línea, cuya acción está dirigida sobre la compartimentalización de la ruta glucolítica de tripanosomátidos (Oppenheimer y col. 1984).

La síntesis de esteroides en tripanosomátidos puede ser una importante diana terapéutica. A diferencia del hospedador, en el que el colesterol es el esteroide sintetizado con mayor abundancia, los derivados del ergostano (episterol y 5-hidroxidehidroepisterol) son los principales esteroides producidos por tripanosomátidos y recuerdan al ergosterol sintetizado por los hongos (Berman, 1988). Por esta razón muchos fungicidas (antibióticos poliénicos, ketoconazol) tienen actividad leishmanicida con escasos efectos tóxicos sobre el hospedador (Goad y col., 1984). Sin embargo, a diferencia de los hongos, el colesterol del hospedador puede ser incorporado y utilizado por los amastigotes, produciendo resistencias a dichos antibióticos (Basselin y col., 1998).

El metabolismo de las purinas presenta igualmente diferencias importantes entre el parásito y el hospedador. *Leishmania* carece de la capacidad de sintetizar purinas *de novo* a partir de precursores metabólicos, y debe incorporarlas del medio circundante. En consecuencia, los tripanosomátidos han desarrollado un sistema de transporte de purinas muy eficaz, así como un sistema específico de recuperación de bases púricas y pirimidínicas. El sistema hipoxantina guanina fosforribosil transferasa de los amastigotes puede ser utilizado como diana por el alopurinol, un análogo de la inosina, previa transformación a alopurinol 5'-monofosfato, con elevada actividad leishmanicida (Basselin y col., 1998). Por su parte la ruta de recuperación de pirimidinas en tripanosomas y leishmanias, es controlada por una enzima bifuncional con actividad timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa (Goad y col., 1989) que es inhibida eficazmente por los antiparasitarios pirimetamina, pentamidina y el agente anticancerígeno metotrexato.

Aunque las especies de los Gen. *Trypanosoma* y *Leishmania* contienen pequeñas cantidades de glutatión libre, el principal tiol intracelular de bajo peso molecular es el tripanotión (N^1, N^8 -bisglutationil espermidina). Los parásitos sintetizan tripanotión por condensación del glutatión con espermidina, mediante dos reacciones de conjugación dependientes de ATP (Grumont y col., 1986). Las funciones del tripanotión son semejantes a las del glutatión en mamíferos, es decir, mantenimiento del equilibrio redox tiólico, defensa contra el estrés oxidativo y frente a los xenobióticos. La enzima tripanotión reductasa (ausente en el hospedador) puede ser inhibida específicamente por fármacos arsenicales trivalentes (óxido de

melarseno) (Fairlamb y Cerami, 1992), naftoquinonas y nitrofuranos, constituyendo una importante diana de acción quimioterapéutica.

Leishmania contiene altos niveles de lípidos-éter, que se encuentran principalmente en los glicolípidos unidos a glicosilfosfatidilinositol y en las glicoproteínas presentes en la superficie del parásito. Lípidos-éter (alquil-fosfolípidos) tales como la miltefosina y la edelfosina poseen una importante actividad leishmanicida, tanto *in vitro* como *in vivo* (Varela-M y col., 2012). Estos compuestos, podrían actuar sobre diversas dianas incluyendo el metabolismo y biosíntesis de LPG y glicoproteína gp63 (Fairlamb y col., 1989).

El descubrimiento de diferencias estructurales importantes entre las DNA-topoisomerasas de tipo I (TopIB) en tripanosomátidos con respecto a sus homólogas de mamífero, ha abierto un nuevo campo de investigación que combina las técnicas de biología molecular con la cristalización de proteínas para poder diseñar nuevos fármacos dirigidos específicamente a su inhibición. Estas enzimas son consideradas como potenciales dianas de intervención terapéutica debido a su posición estratégica en la replicación, transcripción y recombinación del material genético (Pommier, 2006; Balaña-Fouce, 2006).

1.5. DNA TOPOISOMERASAS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

1.5.1. Topología del DNA

El DNA es la molécula biológica en la que se encuentra codificada esta información y su estructura es la de una doble cadena polinucleotídica con disposición antiparalela (Watson y Crick, 1953). En condiciones fisiológicas se ha demostrado que la doble hélice de DNA es dextrógira, da una vuelta completa cada 3,4 nm y posee un diámetro de 2 nm. Esta estructura característica del DNA se conoce como B-DNA, tiene 10,5 pares de bases (pb) por vuelta y en ella se pueden diferenciar un surco menor de 1,2 nm y un surco mayor de 2,2 nm (Luger y col., 1997). En el año 1965, Vinograd y colaboradores identificaron cómo una molécula de DNA, bajo ciertas condiciones experimentales, adquiriría una conformación retorcida, compacta y que giraba sobre sí misma varias veces (Vinograd y col.,

1965). Esta forma topológica del DNA recibió el nombre de superenrollada (del inglés *supercoiled*) en contraposición a la estructura topológica no retorcida a la que se denominó relajada (del inglés *relaxed*) (Fig. 1.8).

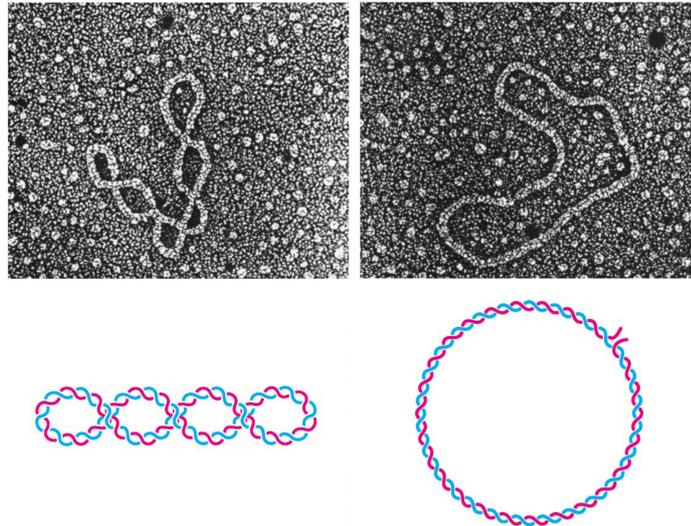
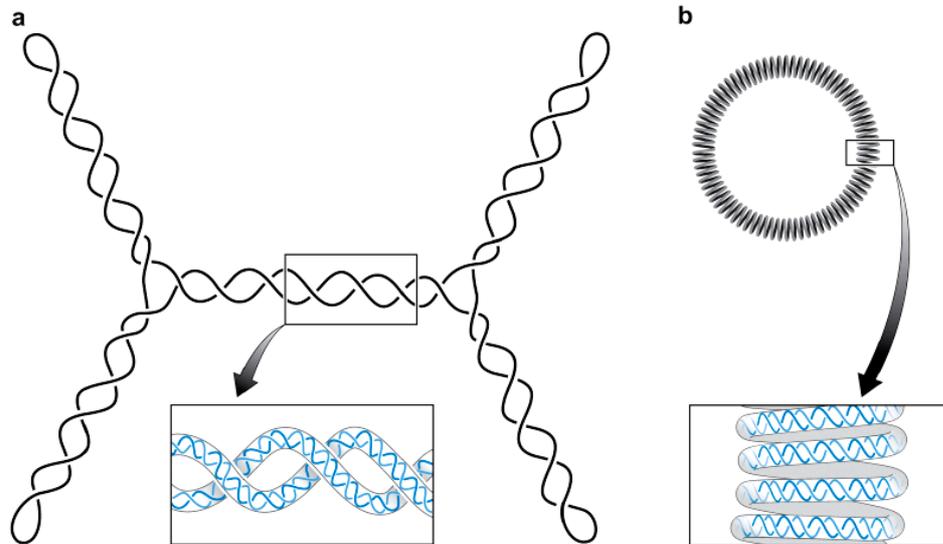


Figura 1.8. Fotografía de microscopía electrónica de los dos estados del DNA. A la izquierda de la imagen se observa el estado topológico superenrollado, mientras que a la derecha se aprecia la molécula de DNA en configuración relajada.

La longitud del DNA es miles de veces mayor que el tamaño de una célula. El genoma completo de una célula humana es de unos 3×10^9 pb que corresponden aproximadamente a 1,8 m. Esto significa que la longitud del DNA es miles de veces mayor que el tamaño de la célula, lo que representa un desafío para los seres vivos. La molécula debe de ser altamente compactada para formar los cromosomas y que estos encajen dentro del núcleo. En los organismos procariotas el DNA presenta un estado superenrollado plectonémico, lo que permite que su genoma se organice en pequeños cromosomas circulares cerrados (Vologodskii y Cozzarelli, 1994). En cambio, en los eucariotas, el superenrollamiento se produce en forma de solenoide, facilitado por las histonas que ayudan a una compactación más efectiva del DNA en nucleosomas (Fig. 1.9).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Figura 1.9. Figura esquemática de las distintas formas de empaquetamiento. A la izquierda esta representado el superenrollamiento plectonómico (a) y a la derecha la forma toroidal (b).

Este superenrollamiento se mide mediante una propiedad topológica denominada número de enlace o *linking number* (Lk) que toma valores enteros para cualquier molécula de DNA circular cerrado y representa el número de veces que una hebra cruza a través de la otra sobre el plano de proyección. Lo realmente interesante de ese valor es la variación del parámetro comparándolo en diferentes condiciones, por ejemplo en presencia y ausencia de un agente intercalante (Singleton y col., 1982). El Lk depende de dos propiedades geométricas, el giro (Tw) y la torsión (Wr). Tw (del inglés *twist*) es el número de vueltas de hélice que tiene una molécula de DNA completa, mientras que Wr (del inglés *writhe*) indica el número de veces que la trayectoria del eje de la doble hélice se cruza sobre sí misma cuando está dispuesta en un plano, dicho de otro modo, es el número de giros de una superhélice, considerando como superhélice a la formada por ambas hebras. Por convenio, el valor de Lk es negativo para las superhélices dextrógiras. Los cambios en Lk (ΔLk) son siempre números naturales, aunque no los cambios en Tw y Wr, cumpliéndose siempre que la suma de las variaciones en ambos parámetros es constante: $\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$. (White y Bauer, 1986).

El grado de superenrollamiento del DNA es crucial en los procesos celulares en los que se requiere acceso a su información codificada. Durante la replicación, transcripción y reparación del DNA se necesita la reparación de las dos cadenas mediante complejos polimerasa/helicasa que generan tensiones y enredos en la molécula (superenrollamientos positivos por delante de los lugares de replicación o transcripción, y superenrollamientos negativos por detrás) que si no son resueltos pueden conducir a roturas en la cadena potencialmente mutagénicas y citotóxicas. (Liu y Wang, 1987; Seychelle y col., 2011). Las topoisomerasas (Top) son las proteínas encargadas de impedir que esto ocurra. Sin ellas los superenrollamientos positivos que se generan detendrían los procesos de replicación y transcripción, mientras que los negativos provocan la formación de estructuras anormales del DNA tales como D-loops (cuando las dos hebras de una molécula de DNA de doble cadena se separan por un tramo y mantienen separadas por una tercera cadena de DNA), R-loops (cuando el RNA se queda anclado en su molde de DNA), cuartetos de guanosa, y estructuras de DNA en forma Z (superenrollamiento hacia la izquierda producido por la RNA polimerasa durante el proceso de transcripción) (Pommier y col., 2010) (Fig. 1.10).

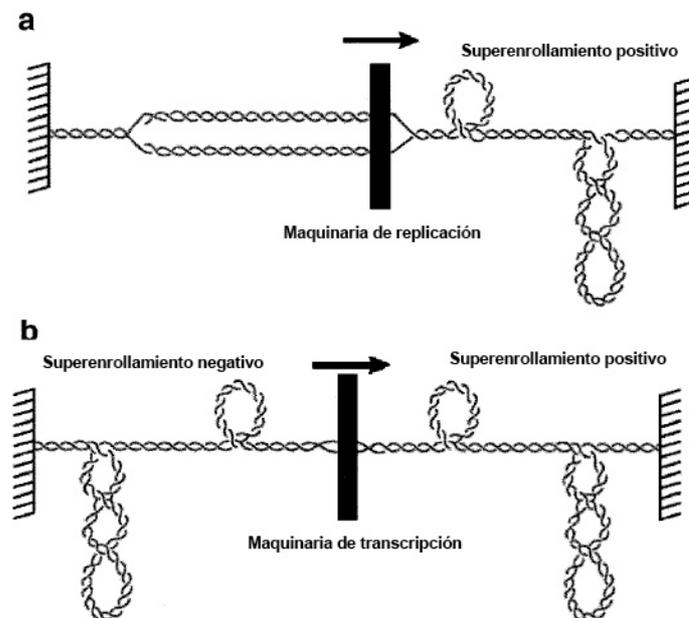


Figura 1.10. Figura esquemática de los problemas topológicos del DNA asociados a la replicación (a) y transcripción (b). Modificado de Wang, 2002.

1.5.2. Las DNA Topoisomerasas (Top)

El Lk es una propiedad invariable del DNA y está restringido desde el punto de vista topológico. Este solo puede variar si se provocan cortes en una o en las dos hebras de DNA permitiendo que la molécula gire y volviendo a religar. Las DNA topoisomerasas (Top) son las enzimas encargadas de llevar a cabo esta función y son de dos tipos: i) las enzimas de tipo II (TopII) producen roturas bicatenarias temporales en el DNA a través de las cuales pasa el otro segmento dúplex no cortado para luego volver a sellar la rotura; ii) las enzimas de tipo I (TopI) producen una rotura monocatenaria y la hebra no cortada pasa a través de la escindida que luego será reparada. Dentro de las diferentes variedades de Top encontramos las que pueden relajar únicamente superenrollamientos negativos y las que relajan tanto superenrollamientos positivos como negativos. Además, hay algunos tipos de Top que también pueden introducir superenrollamientos negativos en el DNA (DNA girasa bacteriana) o de signo positivo (girasa reversa). Los subtipos A, B ó C de las Top se utilizan para distinguir entre familias de enzimas que tienen distintas secuencias de aminoácidos y/o estructuras globales. Todos los tipos de Top catalizan una reacción de transesterificación mediante un ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de un residuo Tyr de su centro activo sobre uno de los enlaces fosfodiéster de la doble cadena de DNA, dando lugar a una unión covalente entre la Top, el DNA roto y la molécula (Fig. 1.11).

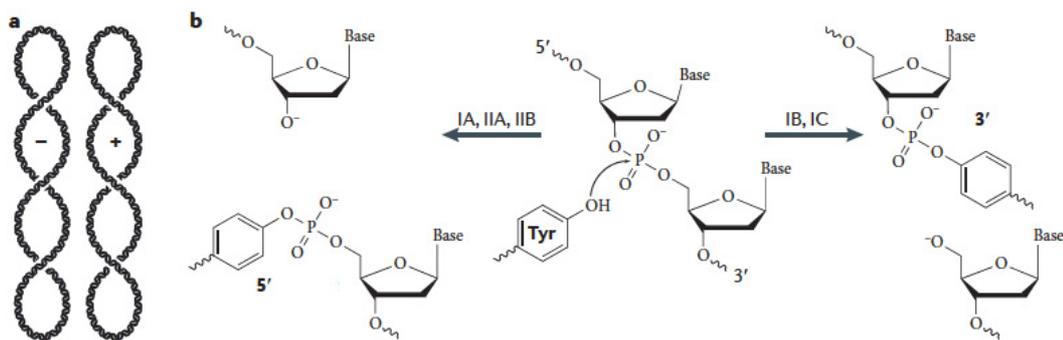


Figura 1.11. a) Superenrollamiento del DNA pletonémico negativo (-) y positivo (+). Las dos formas se distinguen por la dirección del giro superhelicoidal, a la derecha y a la izquierda respectivamente. b) La reacción de escisión del DNA. Las Top catalizan la escisión de la cadena mediante la formación de un enlace covalente reversible DNA-enzima mediante la Tyr presente en el centro activo. Las Top tipo IB y IC se unen al extremo 3' del DNA mientras que las de tipo IA, IIA y IIB se unen al extremo 5' del DNA.

Bajo condiciones fisiológica, la reacción es reversible favoreciendo la reparación del DNA a través de una segunda reacción de transesterificación y minimizando el daño (Wang, 2002; Champoux, 2001)

Las familias de Top descritas hasta la fecha son (Tabla 1.4): TopIA, TopIB, TopIIA y TopIIB, con la única excepción de la TopV, identificada hasta el momento en la especie bacteriana extremófila *Methanopyrus kandleri* (Slesarev y col., 1993; Forterre y col., 2007).

Tabla 1.7. Características y diferencias entre las cuatro familias Top.

	Tipo I		Tipo II	
	TopIA	TopIB	TopIIA	TopIIB
Dominio ATPasa	no	no	si	si
Dependencia metálica	Mg ²⁺	no	Mg ²⁺	Mg ²⁺
Ruptura del DNA	cadena sencilla	cadena sencilla	cadena doble	cadena doble
Polaridad de la ruptura	5'	3'	5'	5'
ΔLk	+1	± 1	± 2	± 2
Enzimas	Top I, Top III y girasa reverse (eubacterias)	Top I, Top V	Top II, girasa	Top VI

DNA topoisomerasas de tipo II (TopII)

Las TopII son enzimas homodiméricas que introducen varios cambios en el estado topológico del DNA, incluyendo el desanudado o el desencadenado de los anillos de doble cadena del DNA y la relajación de DNA superenrollado positiva o negativamente. Estos procesos son posibles gracias a la ruptura transitoria de las dos cadenas de la doble hélice que va acompañado de gasto energético en forma de hidrólisis de ATP (Wang, 1998). Durante el proceso de ruptura y ligado (Fig.

1.12) se produce un intermediario covalente entre los extremos 5' de cada una de las hebras del DNA y cada una de las subunidades enzimáticas. Esto origina un cambio conformacional, dejando un espacio abierto, el segmento G, por donde pasa una segunda región de DNA bicatenario, bien de la misma cadena (en casos de relajación, anudado o desanudado) o bien de otra diferente (encadenado, desencadenado), lo que explicaría porqué el Lk cambia en bloques de dos en dos cuando actúan estas enzimas (Bates y col., 2011).

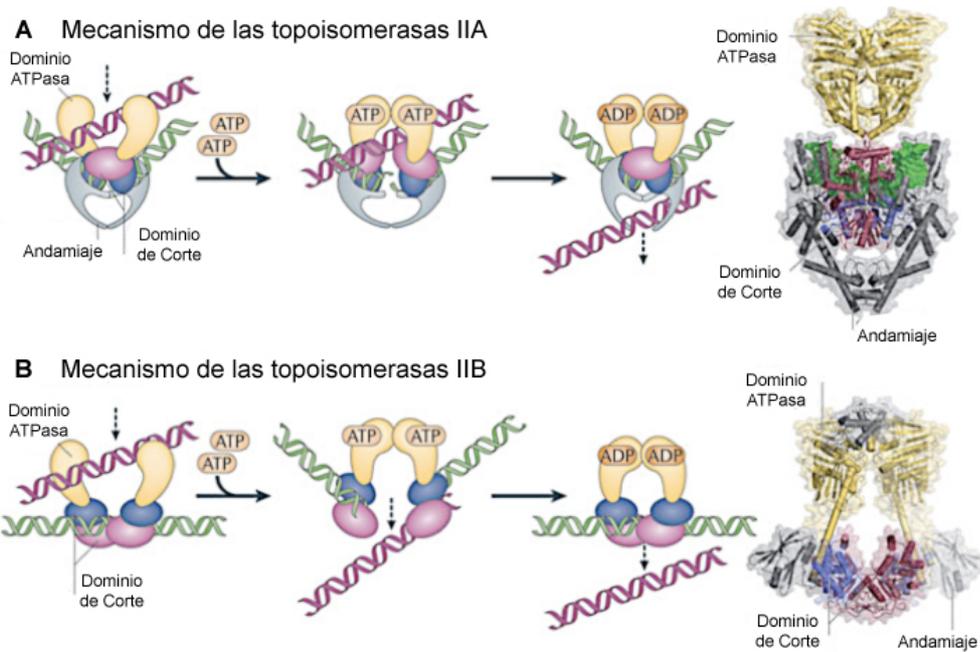


Figura 1.12. (A) Las TopIIA cortan ambas cadenas del DNA bicatenario (verde) y pasan otra doble cadena (rosa) a través de la rotura reversible en una reacción asociada al gasto de ATP. Una vez que se ha producido la religación de las hebras los productos son liberados de la enzima. (B) Las TopIIB presentan un mecanismo similar al de las TopIIA y poseen los mismos dominios de corte y ATPasa, pero difieren en toda su estructura terciaria. Modificado de Seychelle y col. 2011.

De la misma manera que las girasas descritas en *E. coli* (Gellert y col., 1976) las TopII hidrolizan ATP para introducir superenrollamientos negativos en el DNA. El grupo de Anthony Maxwell (2011) de la Universidad de New Anglia (Gran Bretaña) ha propuesto un modelo en el que la energía liberada por la hidrólisis del ATP es imprescindible para manipular las interacciones proteína-proteína y

mantener la configuración dimérica de la enzima durante el paso de la doble cadena de DNA a través del corte (Bates y col., 2011).

DNA Topoisomerasas de tipo I (TopI)

Al contrario que las TopII, las TopI, pueden cortar únicamente una de las dos hebras de DNA bicatenario (Champoux y Dulbecco, 1972). Estas enzimas han sido subdivididas en dos grupos, TopIA y TopIB, que difieren tanto a nivel estructural como mecanicista. Ambas enzimas están presentes en todos los organismos vivos, aunque en un principio las TopIA se habían descrito únicamente en organismos procariotas y las TopIB se relacionaban con los eucariotas. La mayor diferencia entre ellas es que las enzimas TopIA forman el intermediario covalente con el extremo 5' del segmento escindido, mientras que las TopIB lo hacen con el extremo 3' (Tabla 1.8). El intermediario se produce tras el ataque nucleofílico del residuo Tyr característico del centro catalítico sobre un grupo fosfato de la cadena nucleotídica, originando un enlace fosfodiéster transitorio que rompe la cadena de DNA (Pommier, 2009).

Tabla 1.8. Clasificación y características cinéticas de las TopI.

	Procariotas					Virus	Eucariotas	
	TopI	TopIII	Dam TopIII	Girasa Reversa	TopV	TopI	TopI	TopIII
Tipo	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IB	IA
Sustrato	ss	ss	ss	ss	ds	ss	ds	ss
Enlace	5'-P	5'-P	5'-P	5'-P	3'-P	3'-P	3'-P	5'-P
Mg²⁺	+	+	+	+	-	-	-	-
ATP	-	-	-	+	-	-	-	-
Actividad	relaja (-) DNAsc	corte de 2 DNAss	relaja (-) DNAsc	introduce sc (+)	relaja (+)(-) DNAsc	relaja (+)(-) DNAsc	relaja (+)(-) DNAsc	relaja (-) DNAsc

ss: cadena sencilla
 ds: doble cadena
 sc: superrollado
 (-): superenrollamiento negativo
 (+): superenrollamiento positivo

TopIA

Las TopIA tienen una estructura proteica toroidal con un ligero parecido a un candado (Lima y col. 1994). Comprenden tres subfamilias distintas repartidas en todos los organismos. Dentro de estas subfamilias se han descrito la TopI bacteriana (TopIA), la TopIII de bacterias y células eucariotas y la girasa reversa, de bacterias y arqueobacterias. Salvo el caso excepcional de la girasa reversa heterodimérica de *Methanopyrus kandleri*, estas enzimas son siempre monoméricas (Kozyavkin y col., 1994).

La principal actividad de la TopIA es relajar el DNA superenrollado negativamente. Sin embargo, la TopIII puede resolver enredos de cadena sencilla que pueden surgir durante la replicación y reparación del DNA (López y col., 2005). La girasa reversa, por su parte, introduce superenrollamientos positivos en el DNA y renaturaliza las cadenas separadas por medio de la acción de un dominio helicasa de la superfamilia 2 dependiente de ATP fusionado a la TopIA. (Hsieh y Plank, 2006).

El mecanismo de acción de estas enzimas guarda cierta similitud con las TopIIA, ya que ambas forman un intermediario covalente con el DNA mediante un enlace fosfodiéster 5' con el residuo Tyr del centro activo. Efectúan cambios topológicos en el DNA a través del mecanismo "paso de hebra" en el cual, una de las cadenas de la doble hélice del DNA es cortada y abierta físicamente. Posteriormente, la cadena intacta puede atravesar la abertura para rápidamente religar el corte (Fig.1.13 a). Estas enzimas son también capaces de catalizar el "anudado", "desanudado" y entrelazado de círculos de DNA de cadena sencilla, así como el "anudado", "desanudado", "encadenado" y "desencadenado" de círculos de DNA de cadena doble mellados o rotos.

Las TopIA, al igual que las TopII, requieren la presencia de un ión metálico divalente (Mg^{2+}), pero no necesitan hidrolizar ATP para llevar a cabo su función (con la única excepción de la girasa reversa). Existen otra serie de propiedades catalíticas comunes a todos los miembros de la subfamilia TopIA: i) el DNA debe tener un alto contenido de superenrollamientos negativos para facilitar su unión; ii) necesitan que exista una región de DNA de cadena sencilla; iii) no relajan por

completo los superenrollamientos de DNA. Durante la relajación del DNA, el Lk sufre cambios en pasos de uno, en contraposición a las TopII que lo hacen en bloques de dos (Champoux, 2001).

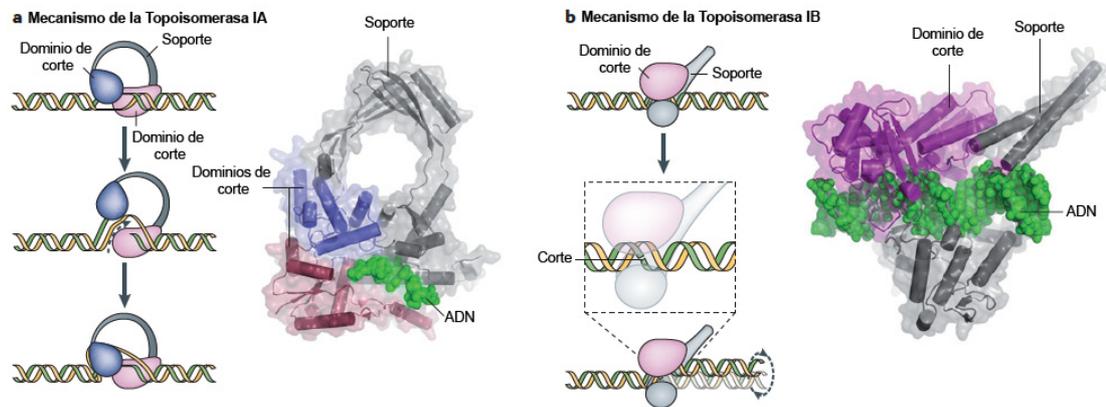


Figura 1.13. a) La TopIA pasa una de las cadenas del DNA (amarillo) a través de la rotura originada en la segunda hebra (verde). A la derecha vemos la estructura de la TopIII de *E. coli*, un tipo de TopIA- b) La TopIB corta una de las cadenas de DNA (verde) seguido de una rotación del resto de la molécula de DNA dúplex que rota con respecto al enlace fosfodiéster de la cadena complementaria. A la derecha la estructura de la TopIB humana unida a una molécula de DNA dúplex. Modificado de Seychelle y col. 2011.

TopIB

Las TopIB se encuadran en dos categorías estructurales divergentes. La primera categoría incluye las TopIB virales, siendo la TopI de *Vaccinia* la más estudiada. La segunda categoría incluye las enzimas eucarióticas, tipificadas por la TopIB humana (Leppard y Champoux, 2005). Las TopIB, a pesar de compartir escasa homología con otras Top, se relacionan tanto funcional como estructuralmente con un grupo de enzimas conocido como tirosina recombinasas, que incluyen la Cre del bacteriófago P1, la XerD de *E. coli* y ciertas integrasas de bacteriófagos (Fujimoto y col., 2006).

Las TopIB difieren de las TopIA tanto en la estructura como en el mecanismo de acción. La TopIB relaja el DNA mediante un corte en una de las hebras y, en lugar de pasar a través del corte la cadena opuesta, es la molécula, desde la rotura hasta el final, la que rota sobre el enlace fosfodiéster intacto de la hebra complementaria (Fig 1.13 b). Esta rotación del DNA se denomina "rotación controlada" y en ella se alinean los extremos rotos para su religación (Koster y col.,

2005). Además las TopIB pueden relajar totalmente el DNA superenrollado, tanto positiva como negativamente. No necesitan la presencia de DNA en forma de cadena sencilla. El enlace covalente que se establece con la cadena de DNA se produce con el extremo 3' de la hebra escindida en vez de con el 5' como en el caso de las TopIA. Finalmente, estas enzimas no requieren de iones metálicos para relajar DNA (Tabla 1.8).

1.6. LA TopIB HUMANA

1.6.1. Estructura

La TopIB humana (hTopIB) es una enzima monomérica constituida por 765 aminoácidos y con un peso molecular de 91 kDa. Basándose en la conservación de la secuencia de aminoácidos entre especies y en estudios de sensibilidad a la proteólisis, los 91 kDa de la hTopIB han sido divididos en cuatro dominios estructurales y funcionales distintos: el dominio N-terminal, el dominio central o *core*, el dominio linker y el dominio C-terminal (Stewart y col., 1996) (Fig. 1.14).

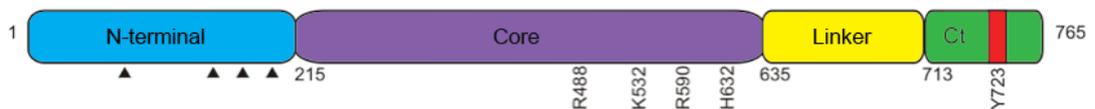


Figura 1.14. Representación lineal de los dominios estructurales de la hTopIB. Dominio N-terminal (1-214), dominio *core* (215-634), dominio *linker* (635-712) y dominio C-terminal (713-765). En el esquema se muestran los cinco aminoácidos que constituyen el centro activo de la proteína. Las señales de localización nuclear (NLS) están representadas por triángulos negros.

El dominio N-terminal está constituido por los primeros 214 aminoácidos (Met1-Gly214) con un peso molecular de unos 24 kDa. Este dominio hidrofílico, además de tener un grado de conservación filogenético muy bajo tiene una elevada sensibilidad a las proteasas (Redinbo y col., 1999). En los primeros estudios realizados se determinó que los primeros 174 residuos eran prescindibles pero más tarde se demostró que en esta región se localizaban dos de las cuatro señales de localización nuclear (NLS) que se han identificado en la hTopIB (Mo y col., 2000).

En el dominio N-terminal también se han sido descrito posibles secuencias de fosforilación, además de regiones de interacción con la nucleolina, con el antígeno SV40, con factores de transcripción y con las proteínas p53 y WRN (Edwards y col., 2000; Mao y col., 2002; Roy y col., 2003). Aunque el extremo N-terminal no es necesario para la actividad catalítica de la enzima, se ha demostrado que se necesitan un número mínimo de residuos para establecer interacciones dinámicas no covalentes corriente abajo del sitio de escisión del DNA durante el corte y el religado (Alsner y col., 1992), además de estar involucrados en mayor o menor medida en la sensibilidad a camptotecina (Lisby y col., 2001).

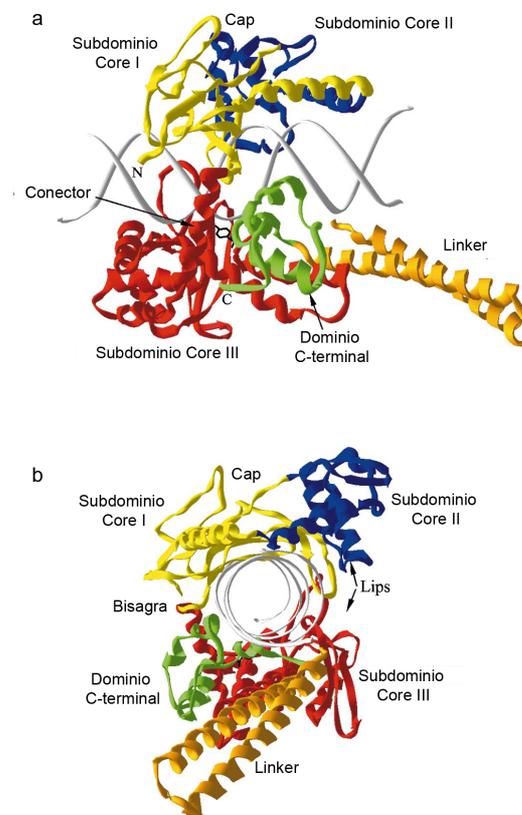


Figura 1.15. Esquema tridimensional obtenido de la estructura del cristal de la forma de 70 KDa de la hTopIB en complejo con un dúplex de DNA de 22 pb. El dominio core ha sido esquematizado por subdominios en color amarillo (I), azul (II) y rojo (III), el dominio linker en naranja y el extremo C-terminal en verde. En a) se muestra la vista lateral de la enzima con el DNA en eje orientado de manera horizontal. La cadena lateral de la Tyr723 (representada en modelo de bolas y barras negro) está entre el núcleo del subdominio core III y el dominio C-terminal. Uno de los lóbulos de la proteína está compuesto por el subdominio core I y II formando el CAP. El otro lóbulo forma la base de la proteína y está compuesto por el subdominio core III y el dominio C-terminal. Ambos lóbulos están conectados por una larga α -hélice denominada conector. En b) se observa la enzima desde abajo. En

esta vista se distinguen dos bucles opuestos denominados *lips* que interactúan a través de 6 aminoácidos y un puente de sal uniendo el CAP con la base de la proteína. La apertura y cierre de la proteína durante la unión y la liberación del DNA implica la ruptura de esta interacción entre los *lips*. La bisagra para que se produzca este movimiento está situada en la parte superior del conector. Modificado de Champoux, 2001.

El dominio *core* está muy conservado filogenéticamente y abarca desde residuo Ile215 hasta la Ala635, con una masa molecular de 54 kDa. Al contrario que el N-terminal, el dominio *core* es resistente a la proteólisis (Stewart y col., 1996). Está dividido en tres subdominios: *core* I (215-232 y 320-433), II (233-319) y III (434-635) (Fig. 1.X). Los subdominios *core* I y III forman un lóbulo denominado CAP que se caracteriza por la presencia de estructura secundaria hélice α y hoja β (Redinbo y col., 2000). El segundo lóbulo se denomina CAT y está compuesto principalmente por hélices α . Este lóbulo está formado por el subdominio *core* III, que contiene los residuos catalíticos Arg488, Lys532, Arg590 e His632, que junto a la Tyr723 del dominio C-terminal constituyen el centro activo de la enzima. Estos residuos son los responsables de la escisión y relajación del DNA (Redinbo y col., 1999). Dos lazos contrapuestos denominados *lips*, pertenecientes a los subdominios *core* I y III, que interactúan a través de 6 aminoácidos (367-369 del subdominio *core* I y 497-499 del subdominio *core* III), y un puente salino que conecta el CAP con la base de la enzima. Para que la unión al DNA tenga lugar, la enzima debe encontrarse en una conformación abierta, actuando la Pro431 y la Lys452 como una bisagra (Stewart y col., 1998).

Tras el dominio *core* volvemos a encontrar una región muy poco conservada filogenéticamente y muy sensible a la proteólisis, el dominio *linker* (Fig.1.15). Esta región compuesta por 77 aminoácidos (5 kDa) está cargada positivamente y consiste en dos hélices α antiparalelas (α 18 e α 19) conectadas por un pequeño giro formado por los residuos Met675-Ala678. Las dos hélices antiparalelas están estabilizadas por tres puentes salinos inter-helicoidales y nueve interacciones hidrofóbicas (Stewart y col., 1998; Redinbo y col., 1999). Esta estructura "*coiled-coil*" sobresale por la base de la enzima y no es necesaria para la actividad de relajación, pero sí juega un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio de escisión-religación (Stewart y col., 1997). Un estudio realizado a partir de una

mutación puntual Ala653Pro demostró un incremento en la flexibilidad del *linker*, dando como resultado un desplazamiento hacia la religación en el equilibrio escisión-religación. El aumento en la velocidad de religación origina una mayor resistencia a CPT ya que impide la entrada de la molécula en el centro activo (Fiorani y col., 2003).

Finalmente el dominio C-terminal, de unos 8 kDa, se extiende desde la Gln713 hasta la Phe765, donde la Tyr723 forma parte del centro catalítico. Está formado por 5 pequeñas hélices α y junto con el dominio *core* forma una cavidad de aproximadamente 20 Å de diámetro que rodea al DNA. En su interior están alojados los aminoácidos integrantes del centro activo, conocidos como péntada catalítica (Arg488, Lys532, Arg590, His632 y Tyr723). El dominio C-terminal contiene principalmente residuos de carga positiva, lo que facilita la interacción con el DNA. Este dominio junto con el *core* representan la unidad funcional mínima con capacidad para relajar el DNA *in vitro* (Stewart y col., 1997).

1.6.2. Mecanismo de catálisis y relajación

Antes de comenzar la reacción la enzima presenta una conformación abierta, con el CAP y la base catalítica separadas. Una vez que el DNA se une, estos dos lóbulos se cierran formando una abrazadera alrededor de la doble cadena, quedando una de las cadenas de DNA unida covalentemente a la enzima y además permite agarrar un segmento dúplex para rotar con respecto al otro y así relajar superenrollamientos positivos o negativos. El modelo más preciso para explicar el mecanismo de acción de la hTopIB es el conocido como "rotación controlada" (Stewart y col., 1998), ya que el extremo OH 5' que queda libre es capaz de rotar antes del paso de religación controlado por la fricción generada entre el DNA y la cavidad de la propia enzima (Koster y col., 2005). El dominio *linker*, presente en las TopIB de eucariotas, proporciona interacciones adicionales entre la proteína y el DNA, además de la regulación del equilibrio de escisión-religación y el control de la rotación. En condiciones normales el equilibrio escisión-religación está desplazado hacia la religación (Schoeffler y Berger, 2008).

El ciclo catalítico de la hTopIB se compone de cuatro etapas que suceden de forma secuencial (Fig. 1.16): i) unión de la enzima al DNA (Fig. 1.15 B); ii) reacción de *trans*-esterificación de la enzima con el DNA (Fig. 1.15 C); iii) relajación del DNA gracias a la tensión helicoidal acumulada (Fig. 1.15 D-E); iv) sellado del enlace fosfodiéster y liberación del DNA (Fig. 1.15 A).

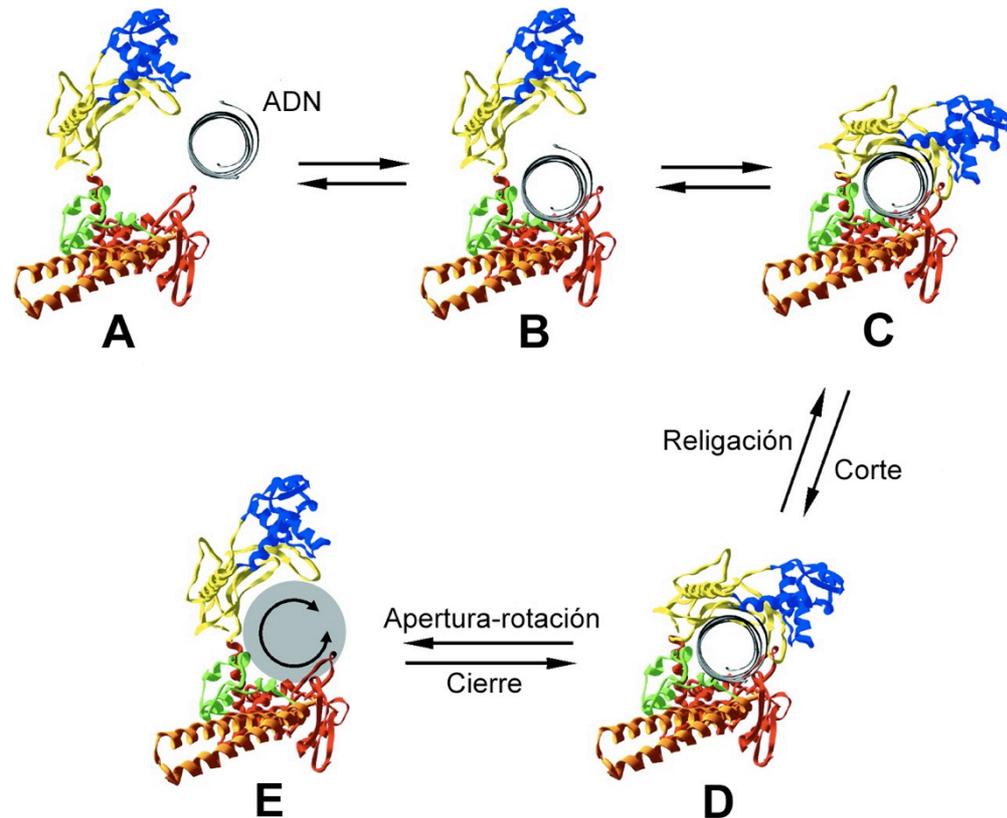


Figura 1.16. Esquema del mecanismo de relajación del DNA mediado por la hTopIB. Tras la unión al DNA (A y B) la forma cerrada de la enzima cataliza el corte de la hebra a escindir (C y D). El DNA cortado rota (E) alrededor de una serie de enlaces en la cadena intacta. Existe la posibilidad de que sucedan múltiples rotaciones antes de que los pasos sean revertidos, y el DNA puede entonces ser cortado de nuevo o liberado. Modificado de Champoux 2001.

La especificidad por el sustrato de la hTopIB ha sido caracterizada tanto al nivel de la secuencia de nucleótidos como al nivel de la estructura terciaria del DNA. Mediante ensayos con detergentes que atrapan los complejos covalentes, se

realizó un mapa de los sitios de corte de la enzima (Tanizawa y col., 1993). Se observó que la hTopIB cortaba el DNA con una preferencia por una combinación específica de nucleótidos que se extiende desde la posición -4 a la -1 del sitio de corte. Los nucleótidos preferentes en la cadena a escindir son 5'-(A/T)(G/C)(A/T)T-3' con la enzima unida covalentemente en el residuo T⁻¹. Estas enzimas se unen preferentemente a superenrollamientos de cualquier signo en lugar de fragmentos relajados, lo que parece indicar que el motivo estructural reconocido dentro del DNA se corresponde con un fragmento doblado de DNA (Muller, 1985). Una explicación alternativa sería que las TopIB podrían reconocer el nodo donde dos dúplex de DNA se cruzan, tal y como sucede en el proceso de replicación.

La rotura de una de las hebras de DNA se produce por el ataque nucleofílico del O⁻⁴ de la Tyr723 sobre el fosfato de la cadena nucleotídica que va a ser cortada. Esta reacción de *trans*-esterificación genera un enlace fosfodiéster transitorio entre la Tyr723 y el fosfato en posición 3' de la T⁻¹, liberándose el grupo hidroxilo de la posición 5' del DNA. En base a estructuras cristalográficas se ha observado que los residuos clave en la actividad experimentan diferentes orientaciones, sugiriendo así que durante el ciclo catalítico existen dos estadios diferentes (Champoux, 2001). Cuando en posición -1 de la cadena de DNA se encuentra una T los residuos de Arg488 y Arg590 forman puentes de hidrógeno con átomos de oxígeno del fosfato que va a ser escindido, mientras la His632 permanece unida a otro oxígeno (Fig 1.17). En cambio, cuando en posición -1 se encuentra una base de C el grupo fosfato experimenta una rotación de 75°, llevando a la Arg488 y a la His632 a estar unidas por enlaces de hidrógeno a los dos mismos átomos de oxígeno, pero siendo ahora la Lys532 y no la Arg590 la que forma un puente de hidrógeno con el oxígeno. En ambas orientaciones parece que la Tyr723 está perfectamente alineada para el ataque nucleofílico y que los tres aminoácidos básicos mencionados están colocados para estabilizar el estado pentavalente transitorio mediante interacciones con oxígenos del fosfato escindido (Champoux, 2001; Redinbo y col., 1998). Aunque se ha sugerido que el O⁻⁴ de la Tyr723 podría ser activado por la proximidad de una base, las estructuras cristalográficas obtenidas no permiten identificar ningún aminoácido lo suficientemente cercano a la Tyr como para desempeñar este papel. Sin embargo, se ha visto que una molécula de agua permanece unida por un puente de

hidrógeno a la Arg590 solamente a 2.3 Å del mencionado oxígeno (Redinbo y col., 2000) pudiendo así actuar como una base específica aceptando un protón durante la catálisis.

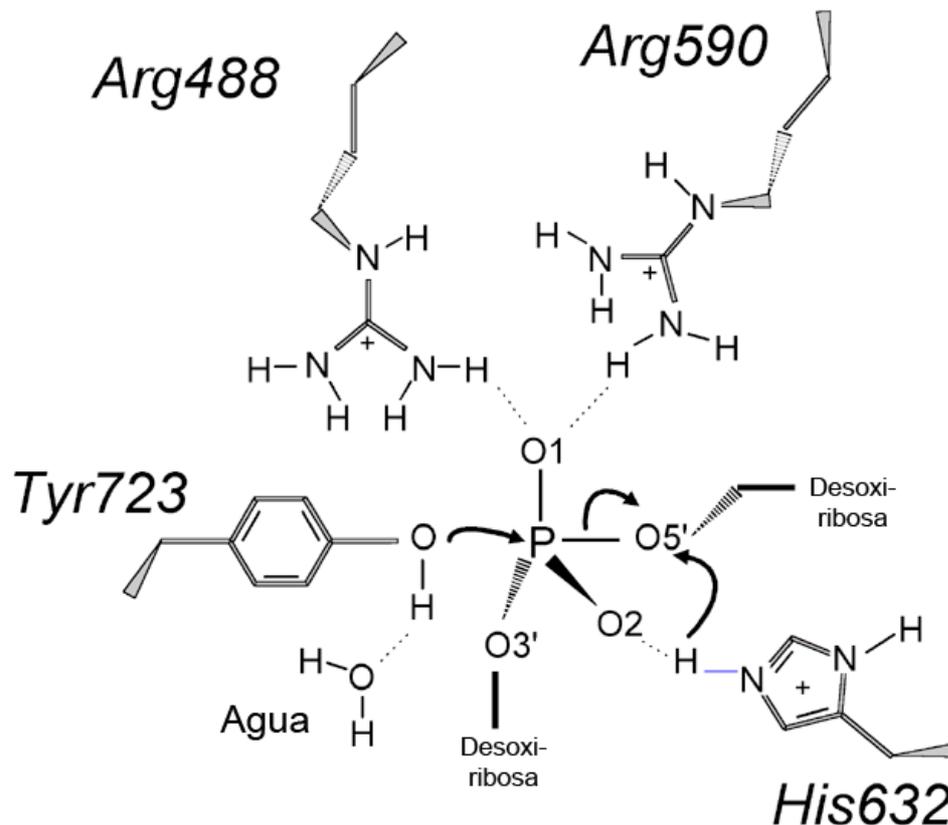


Figura 1.17. Figura esquemática que representa un posible estado intermedio de la fase de escisión durante la catálisis de la hTopIB. Los residuos conservados, Arg488 y Arg599, son los que estabilizan, en el estado de transición, la unión electrostática mediante la interacción de los hidrógenos con un átomo de oxígeno del grupo fosfato de la cadena a escindir. El otro átomo de oxígeno está estabilizado por la His632. Este residuo además puede actuar como ácido general donando un protón al oxígeno 5'. Cuando la Tyr723 está perfectamente posicionada en línea con el oxígeno 5' de la cadena de DNA escindible es cuando la hTopIB se une covalentemente al extremo 3' del DNA mellado. Modificado de Stewart y col., 1998.

Una vez escindida una de las cadenas, se produce una rotación libre del filamento debido a la tensión acumulada en el DNA en forma de superenrollamientos. Las cargas positivas presentes en la superficie del dominio

linker y de la región del "nose cone" tienen la función de frenar y estabilizar esta rotación, estableciendo lo que Champoux denominó como control de rotación. De esta forma se produce una relajación del DNA superenrollado de una forma distributiva. Una vez relajado el DNA, se produce el resellado del enlace fosfodiéster utilizando para ello la energía almacenada en el complejo covalente intermediario DNA-TopIB. Por este motivo el paso de escisión-religación no precisa de la hidrólisis de ATP, al contrario de lo que ocurre con las TopIA. Bajo condiciones normales, los intermediarios de escisión son transitorios y el proceso de religación está favorecido.

1.7. LA TopIB DE LEISHMANIA

La TopIB de *Leishmania* (LdTopIB) es significativamente diferente del resto de las enzimas homólogas descritas hasta la fecha. En 1999, se identificó un gen en el cromosoma 34 de *L. donovani* que codificaba una proteína de 635 aminoácidos similar a una TopIB. La peculiaridad de esta proteína es que carecía del motivo "SKxxY" del extremo C-terminal. Este motivo está conservado en todas las TopIB y contienen la Tyr catalítica. Este polipeptido recombinante era incapaz de relajar el DNA *in vitro*, por lo que se pensó que era un pseudogen o que debía de existir otro gen que codificaría una segunda subunidad que completaría una enzima funcional (Broccoli y col., 1999).

Más tarde se encontró en el cromosoma 4 de *L. major* el segundo gen que codificaba para una proteína que contenía el centro activo y por lo tanto el motivo "SKxxY" con la Tyr en la posición 222 (Tyr222) necesaria para la actividad catalítica. Una vez clonados ambos genes en un vector biscistrónico de expresión en levaduras, se consiguió expresar y purificar una enzima recombinante capaz de relajar DNA *in vitro*. La LdTopIB se caracterizó como una enzima heterodimérica formada por dos subunidades: una grande (LdTopIL) de 635 aminoácidos y 73 kDa que contiene el extremo N-terminal y el dominio *core*, y una pequeña (LdTopIS) de 262 aminoácidos y 28 kDa que presenta la Tyr catalítica (Villa y col., 2003). Poco después se encontraron resultados similares en tripanosomas africanos, lo que puso de manifiesto que esta estructura heterodimérica es característica de tripanosomátidos (Bodley y col., 2003).

Comparando la estructura de la TopIB de tripanosomatidos con la hTopIB, se pudieron asignar dominios y subdominios (Fig. 1.18). La subunidad LdTopIL contiene el dominio N-terminal más corto que el de la enzima humana y muy poco conservado filogenéticamente. El dominio *core* sí conserva alta homología con el de otras TopIB y es donde se encuentran la mayoría de aminoácidos que interaccionan con el DNA (Fig. 1.17), como la Arg314 (Arg488 en la enzima humana), Lys352 (Lys532 en la enzima humana), Arg410 (Arg590 en la enzima humana) e His453 (His632 en la enzima humana) (Fig. 1.19). Finalmente la enzima presenta una extensión C-terminal que carece de homología con otras proteínas ortólogas de las especies caracterizadas hasta el momento (Díaz-González y col., 2008).

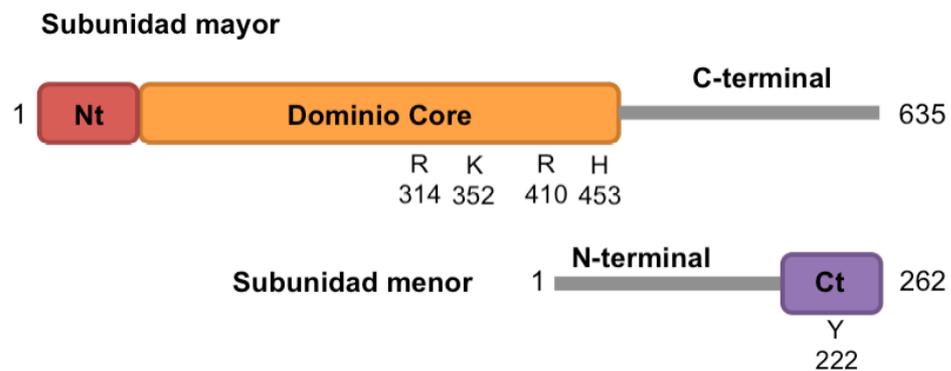


Figura 1.18. Representación esquemática lineal de la LdTopIB. Nt representa el dominio N-terminal y Ct el dominio C-terminal. Los aminoácidos señalados constituyen la péntada catalítica en el centro activo de la enzima.

La subunidad 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 conserva una alta homología con el dominio C-terminal de otras TopIB y es donde se sitúa la Tyr222 (Tyr723 en la enzima humana), esencial para la ruptura transitoria de la cadena nucleotídica del DNA (Reguera y col., 2006).

La localización del *linker* es hasta ahora desconocida. Podría estar formado por parte de los extremos no conservados de las dos subunidades que al interaccionar entre sí estabilizarían el conjunto, o podría generarse como consecuencia de modificaciones post-traduccionales que eliminaran parte de los grupos amino y carboxilo de las diferentes subunidades.

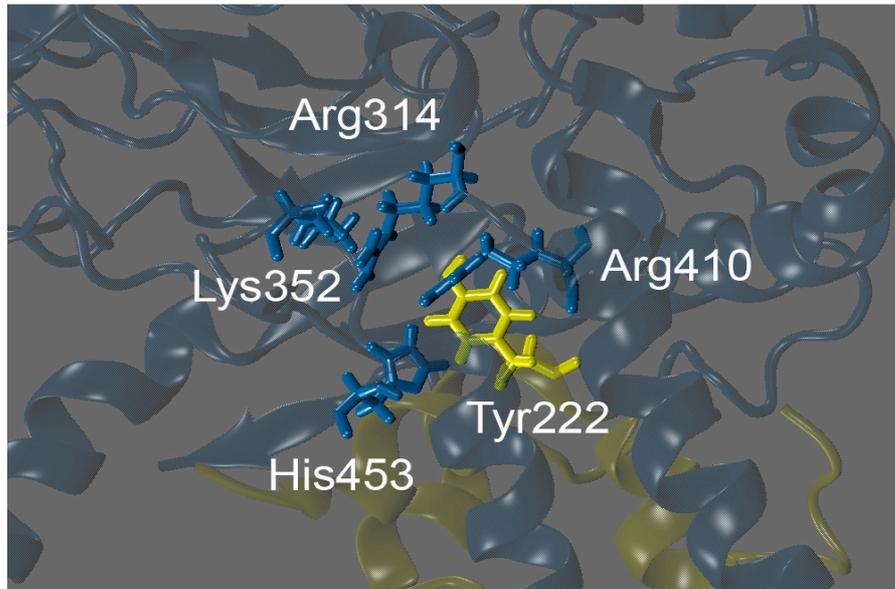


Figura 1.19. Representación tridimensional de los amino ácidos integrantes del centro activo de la LdTopIB dentro del cristal realizado por Davies y col. (2006). Los residuos pertenecientes a la subunidad grande (LdTopIL) están representados en color azul, mientras que la Tyr222 de la subunidad pequeña está esquematizada en color amarillo (Tomada de Prada, 2013).

El silenciamiento *in vitro* de cualquiera de las dos subunidades en *T. brucei* mediante siARN muestra una reducción drástica de la síntesis de DNA y ARN, equiparándose a la reducción que se produce cuando se tratan con CPT las formas intraeritrocitarias de tripanosomas (Bakshi y Shapiro, 2004). Además, el doble reemplazamiento génico del gen que codifica LdTopIS, origina un fenotipo no viable en *L. major* (Balaña-Fouce y col., 2008). Todo esto indica que la TopIB es una enzima esencial en tripanosomas de la misma manera que para el resto de organismos eucariotas, con la excepción de las levaduras.

1.8. LAS TopIB COMO DIANA TERAPÉUTICA

Las Top son proteínas muy vulnerables bajo ciertas condiciones de estrés, como por ejemplo la exposición a inhibidores, un pH ácido o el estrés oxidativo. Estos factores pueden convertir a las TopIB en nucleasas que rompen el DNA provocando una inestabilidad genómica y/o la muerte de la célula. La TopIB tiene una estructura filogenéticamente muy conservada lo que hace que los fármacos diseñados no discriminen entre organismos. Sin embargo, la TopIB de tripanosomátidos, como hemos visto, difiere enormemente de la de su hospedador, lo que la posiciona como una diana extraordinariamente interesante para el cribado masivo de moléculas pequeñas (TBS).

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

1.8.1. La camptotecina (CPT)

La reacción de escisión/relicación de las TopIB es la diana de algunos de los fármacos anticancerígenos con uso clínico (Pommier, 2006). Las TopIB son particularmente vulnerables a los inhibidores durante el paso intermediario de escisión (nos referiremos a ellos como complejos CL). A pesar de su frecuencia elevada dentro del genoma, los CL son normalmente tan efímeros que no pueden ser detectados. La camptotecina (CPT) y sus derivados cercanos (Fig. 1.20) son capaces de atrapar de forma específica y reversible los complejos CL. Dado que el paso de relicación del complejo CL requiere el ataque nucleofílico del enlace tirosil-DNA-fosfodiéster por parte del extremo del DNA libre (el extremo 5'-hidroxilo), es crucial que este esté perfectamente alineado con aquel. La CPT se intercala entre los pares de bases en el sitio de corte, donde la enzima está enganchada a la doble hélice, lo que promueve una desalineación del extremo 5'-hidroxilo del DNA que incrementa la vida media del complejo (Redinbo y col., 1998).

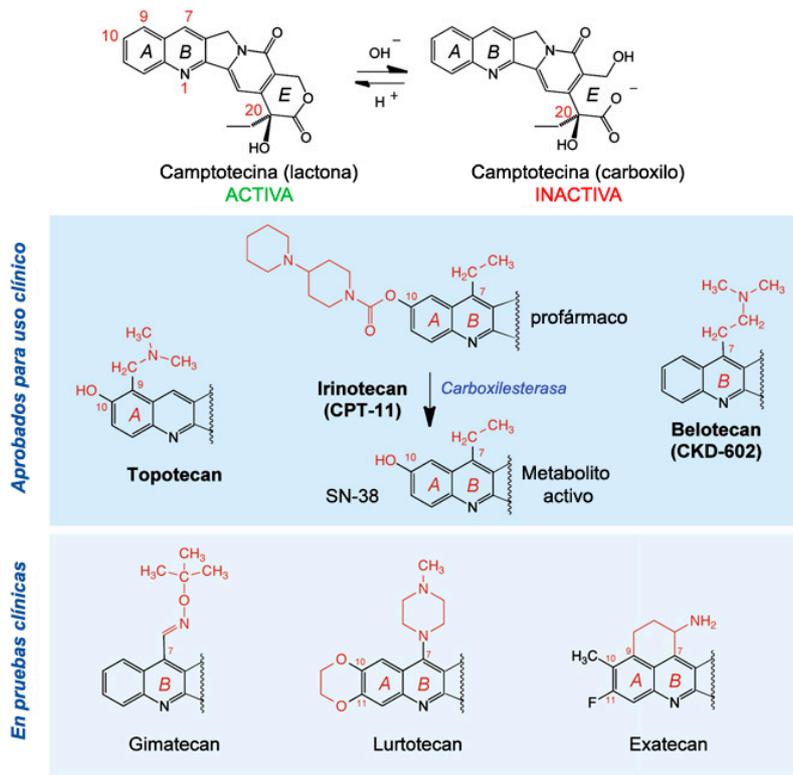


Figura 1.20. Representación esquemática de la CPT y de algunos de sus en fase clínica o ya aprobados para su uso clínico en tratamientos.

La CPT fue identificada originariamente como un componente antitumoral en el extracto de la planta *Camptotheca acuminata*. En ese momento fue probada clínicamente, mostrando una gran eficacia frente a diversos tumores en pacientes humanos (Pommier, 2006), por lo que fue aprobada por la FDA para el tratamiento del cáncer de ovario, colon o pulmón. Con el transcurso de los años se han desarrollado numerosos análogos de la CPT que aunque presentan una elevada similitud estructural y un mecanismo de acción idéntico tienen diferente comportamiento farmacocinético. Algunos se usan en la clínica del cáncer y otros están en evaluación (Ulukan y Swaan, 2002; Pommier, 2006; Kaufmann y col., 1995; Li y col., 2003). Tanto el topotecan como el irinotecan se introdujeron en medicina humana en 1997 para el tratamiento de tumores sólidos, más de 30 años después de que se aislara la CPT.

Los derivados de la CPT (CPTs) son capaces de penetrar rápidamente en el interior de las células e interactuar con la TopIB a los pocos minutos de exposición. Los complejos CL estabilizados por la CPT se revierten tras unos minutos de la eliminación de la droga del medio. Todas las CPTs tienen dos centros involucrados en su actividad biológica: i) un anillo de lactona terminal que las hace inestables en soluciones acuosas produciéndose la rápida hidrólisis no enzimática dependiente del pH para formar un anillo abierto de ácido hidroxicarboxílico, prácticamente inactivo frente a la TopIB (Hertzberg y col., 1989). A pH neutros o básicos el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la apertura del anillo mientras que a pH ácidos se favorece la formación de la lactona activa; ii) un carbono asimétrico en posición 20 cuya configuración S es la farmacológicamente activa (Hsiang y col., 1989).

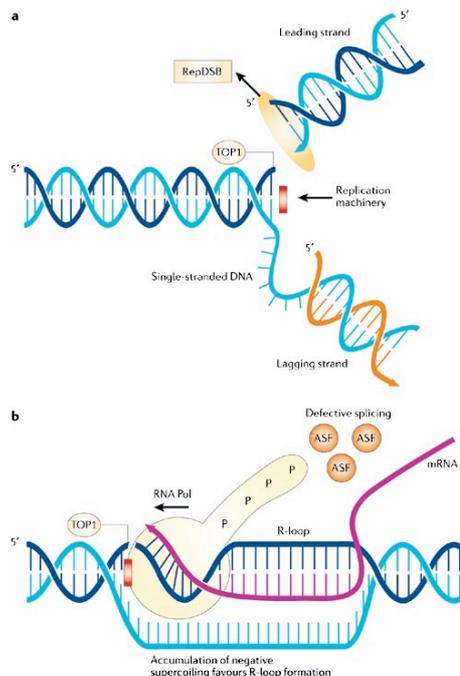


Figura 1.20. Conversión de los complejos CL en daño de DNA por colisión con la horquilla de replicación y durante el proceso de transcripción. A) Cuando la horquilla de replicación colisiona con el complejo CL estabilizado por la CPT se produce una rotura de doble cadena. Además, la colisión provoca la detención de la horquilla, conlleva la formación del complejo irreversible covalente y desencadena la muerte celular. B) Cuando la CPT atrapa el complejo CL en una hebra que se está transcribiendo (azul oscuro), la ARN polimerasa puede chocar con dicho complejo y parar la elongación del ARN. El dúplex ARN-DNA impide la religación del complejo CL produciendo una rotura irreversible de cadena sencilla (Pommier, 2006).

La CPT mata de forma selectiva las células en la fase S de su ciclo celular (Hsiang y col., 1989) por la colisión entre la horquilla de replicación que avanza y los complejos CL (Fig. 1.20). Esta colisión desencadena tanto la muerte celular específica de fase S como un arresto del ciclo celular en fase G2. El arresto en G2 conduce a otros tres acontecimientos importantes: i) formación de una rotura de doble cadena en la horquilla; ii) parada irreversible del movimiento de la horquilla de replicación y iii) la formación de los aductos irreversibles DNA-TopIB.

Mecanismo de formación de complejos CL

Tras la cristalización de la hTopIB unida covalentemente al DNA y al topotecan (Redinbo y col., 2000; Staker y col., 2005) se estableció un modelo de interacción en el que el derivado de la CPT se intercalaba en el espacio formado por el corte de cadena tras el ataque nucleofílico de la Tyr, mimetizando así la posición de una base nucleotídica.

En este modelo, los anillos planos ocupan el mismo espacio que la base en posición +1, siendo su eje mayor paralelo a los pares de bases. El complejo de unión intercalante se genera por una rotación del enlace fosfodiéster de la hebra intacta, que amplía su ángulo sin necesidad de una rotación de base fuera de la hélice. La posición abierta del fósforo se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos Arg362 y Gly363, al tiempo que la Thr718 forma un puente de hidrógeno en -1 y la Arg364 y Lys532 con el par de bases GC en posición +1. Por su parte, el anillo E del topotecan (Staker y col., 2005) y de la CPT (Stewart y col., 1998) establece contacto con el Asp533, independientemente del estado químico de la droga; en el caso de presentarse como ácido hidroxicarboxílico, se suman la Asn722 y la Arg364 – sólo en el caso de la CPT – como agentes estabilizantes de la droga al establecer contacto con el carbonilo 17 y el N⁻¹, respectivamente (Fig. 1.21).

Como otros compuestos que inducen daños en el DNA, los inhibidores de clase I se comportan como inductores de la muerte celular programada. Sen y colaboradores (2004) demostraron que el efecto leishmanicida inducido por la CPT aparecía inmediatamente después de que su función mitocondrial fuera inhibida lo que originaba un incremento en su potencial de membrana. Este desacoplamiento

iba ligado a un incremento en la concentración de ROS, con el concomitante efecto sobre la peroxidación lipídica y disminución de la concentración de glutathion reducido. Como en células de mamífero, se han descrito que otros marcadores apoptóticos como las proteasas de tipo caspasa, la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares y la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) eran igualmente producto de la exposición de los promastigotes de *L. donovani* a CPT.

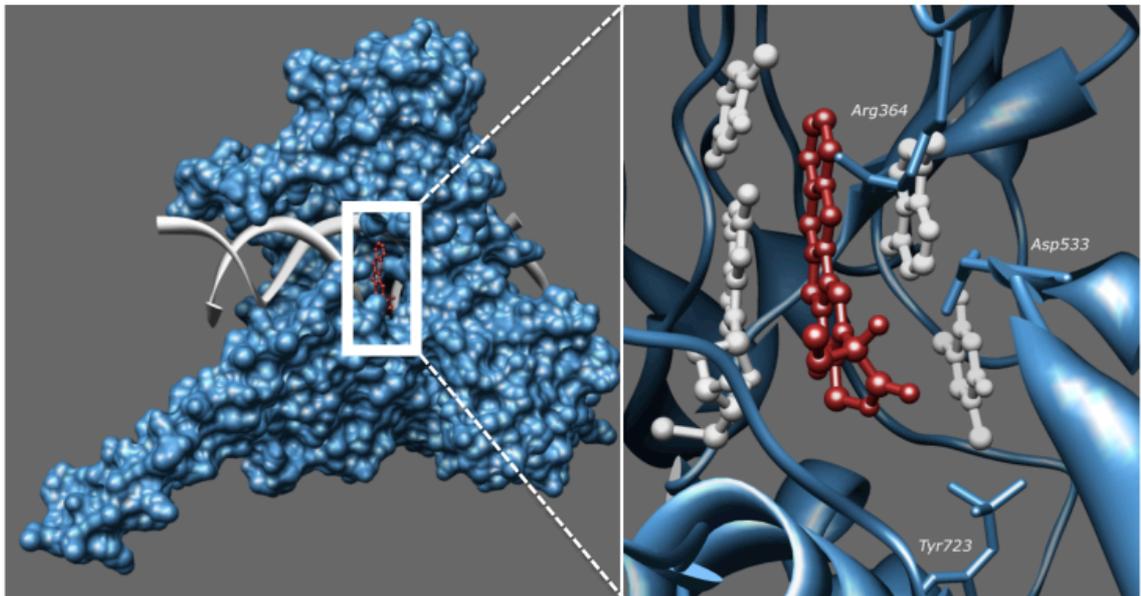


Figura 1.21. Mecanismo de interacción de la CPT con el complejo covalente DNA-TopIB: el fármaco se intercala entre los pares de bases del DNA interaccionando tanto con la proteína como con el DNA. La imagen de la derecha presenta el mapa de superficie de la hTopIB (azul) en complejo ternario con un fragmento de DNA de 22 pb (blanco) y la CPT (rojo). En la imagen de la izquierda se aprecia con detalle la intercalación de la CPT entre los pares de bases en posición +1 y -1 (Tomado de Prada, 2013).

Se han realizado muy pocos estudios para determinar la actividad de la CPT y de sus análogos como leishmanicidas en infecciones experimentales. En 2001 Proulx y col. estudiaron la eficacia de una formulación de CPT encapsulada en liposomas en un modelo murino de leishmaniosis visceral observando una reducción significativa de la carga parasitaria a la dosis de 2,5 mg/kg peso vivo cuando se administraba por vía intraperitoneal.

1.8.2. Derivados poliheterocíclicos no camptotécnicos

Los compuestos indolocarbazólicos (rebecamicina; REB y derivados) constituyen un prometedor grupo de inhibidores de clase I de la TopIB con estructura poliheterocíclica producidos naturalmente por el actinomiceto *Saccharotrix aerocolonigenes* (Yamashita y col., 1992). Muchos derivados semisintéticos de la REB se han ensayado *in vitro* para evaluar su relación estructura-actividad (SAR) frente a multitud de líneas tumorales humanas y de animales que han servido para comenzar algunos ensayos clínicos de importancia. La estructura poliheterocíclica plana de estas moléculas (Fig. 1.21) les permite intercalarse entre los pares de bases de DNA donde finalmente se establecen los complejos ternarios junto con el DNA y la enzima (Prudhomme, 2003). En 2005, Deterding y colaboradores encontraron que la REB presentaba un buen efecto citotóxico frente a tripomastigotes de *T. brucei* a concentraciones sub-micromolares.

Una segunda clase de inhibidores de clase I de las TopIB son los compuestos con estructura indenoisoquinolínica (Fig. 1.22). Igual que los compuestos anteriores, algunas de estas moléculas se encuentran en fase preclínica como agentes antitumorales (Antony y col., 2007), pero presentan una serie de ventajas sobre las CPTs: i) poseen una mayor estabilidad química; ii) estabilizan los complejos CL en sitios diferentes a los de las CPTs, lo que indica que afectan potencialmente genes diferentes; iii) su actividad antiproliferativa es generalmente superior a la de los derivados CPT; iv) no son eliminadas por los transportadores de membrana de tipo ABC, capaces de generar resistencia a CPTs.

Otros compuestos no camptotécnicos son los derivados de las fenantridinas (ARC-111), los cuales comparten muchas de las ventajas ya descritas para las indenoisoquinolinas. Este hecho no es en absoluto sorprendente si se considera la enorme similitud química existente entre ambas familias de compuestos (Feng y col., 2009).

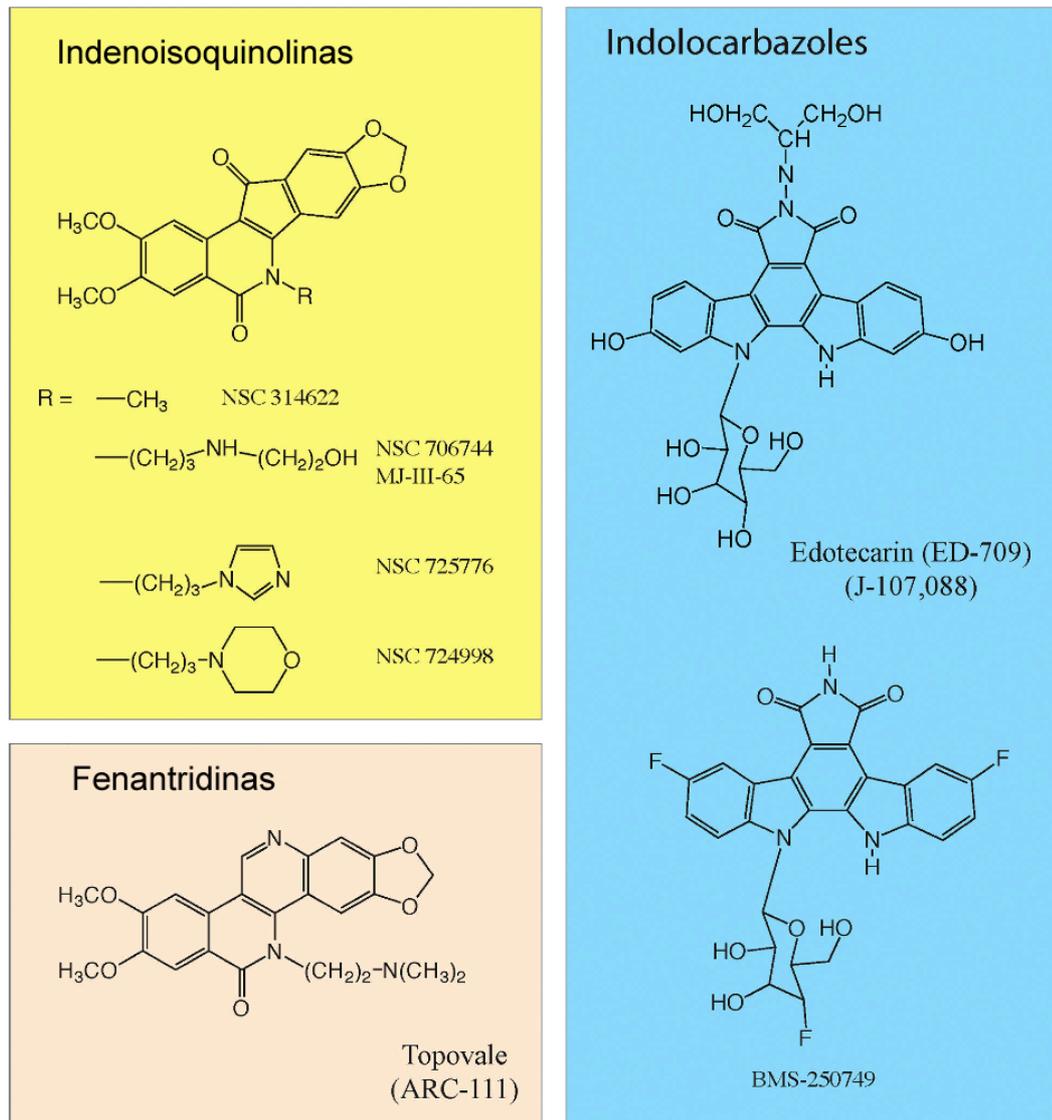


Figura 1.22. Estructura química de los inhibidores TopIB no CPT con relevancia clínica. En la figura se recogen las tres familias químicas más importantes: indenoisoquinolinas (bloque amarillo), indolocarbazoles (bloque azul) y fenantridinas (bloque rosa). Modificado de Pommier (2011) .

L. donovani es muy sensible a otros fármacos inhibidores de clase I como la naftoquina diospirina. La diospirina es un inhibidor relativamente específico de la enzima de *Leishmania*, necesitándose concentraciones diez veces superiores para producir un efecto semejante en la enzima homóloga de mamífero (Ray y col., 1998). Por su parte, los derivados del ácido betulínico con estructura de

triterpenoides pentacíclicos actúan previniendo la formación del complejo binario enzima-DNA aunque, a diferencia de los compuestos anteriores, no forman parte del mismo (Chowdhury y col., 2003). Este compuesto tiene un efecto drástico sobre el crecimiento de promastigotes de *L. donovani* en los que inducen la marginación de la cromatina y subsiguiente descromatinación, aunque no se han encontrado efectos sobre el kDNA.

La berberina es otro inhibidor de clase I de la TopIB con estructura poliheterocíclica semejante al fármaco antitumoral intercalante benzo[a]acridina (Vennerstrom y col., 1990). La berberina y alguno de sus análogos, han sido estudiados *in vitro* frente a promastigotes de *L. donovani* y formas sanguíneas de *T. brucei* y *T. congolense*, mostrando eficacia en el rango micromolar. Los ensayos en experimentación animal con estos compuestos han mostrado su eficacia en infecciones experimentales de hámster (Marquis y col., 2003).

1.8.3. Otros inhibidores de la TopIB

Finalmente, ciertos compuestos que se han venido utilizando desde hace décadas como antiparasitarios, pueden comportarse como inhibidores tipo II de la TopIB en ensayos *in vitro*. Entre estos inhibidores resaltaríamos los fármacos leishmanicidas de elección derivados del Sb^{V+} ; Glucantime[®] (antimoniato de meglumina) y Pentostam[®] (estibogluconato de sodio). Estos compuestos estabilizan los complejos binarios de escisión *in vitro* (Walker y Saravia, 2004), aunque no parece que constituya su mecanismo de acción principal *in vivo*. Por otro lado, los compuestos que se unen al surco menor externo del DNA tales como los derivados bis-benzimidazólicos (Ho-33342, Ho-33258) y las diamidinas aromáticas pentamidina y berenil, pueden inhibir la TopIB *in vitro*. Estos compuestos se unen a las regiones del DNA ricas en AT del surco menor interfiriendo la reacción de *trans*-esterificación sin estabilizar los complejos CL de escisión (Chen y col., 1993). Un trabajo reciente demuestra sin embargo que el efecto leishmanicida de estos compuestos está relacionado sólo marginalmente con la inhibición de la TopIB, indicando un comportamiento pleiotrópico más complejo (Jean-Moreno y col., 2006).

2. objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Memoria de Doctorado es la generación de un sistema de cribado fenotípico de moléculas pequeñas basado en un cepa de *Leishmania infantum* modificada genéticamente y que tiene la capacidad de emitir fluorescencia infrarroja. Esta cepa servirá para cribar el potencial parasiticida de una colección de 298 compuestos bajo un sistema de alto rendimiento HTS. En paralelo, los compuestos seleccionados servirán para evaluar su potencial mecanismo de acción basado en la inhibición de la DNA topoisomerasa de tipo I en el parásito que será de utilidad para explicar la capacidad leishmanicida de los compuestos seleccionados.

Los objetivos específicos de la Memoria son:

Objetivo 1: Establecer una plataforma de cribado HTS en esplenocitos murinos infectados con una cepa de *L. infantum*-iRPF que emite fluorescencia infrarroja.

Objetivo 2: Cribado de varias colecciones de moléculas pequeñas en el sistema de esplenocitos murinos y seleccionar los “hits” con mayor potencial leishmanicida.

Objetivo 3: determinar la citotoxicidad de los “hits” seleccionados en macrófagos murinos (esplenocitos no infectados) con el fin de determinar su índice selectivo.

Objetivo 4. Realizar un cribado basado en diana de los compuestos con estructura indenoisoquinolínica seleccionados del HTS con el fin de validar su potencia como inhibidores de la DNA-topoisomerasa de tipo IB del patógeno en relación con la del hospedador.

Objetivo 5. Estudiar el efecto de estos compuestos sobre la estabilidad del genoma y los sistemas de reparación del parásito, haciendo hincapié en la fosforilación de la histona γ H2A.

3. materiales y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) y *E. coli* XL-1Blue (Holmes y Quigley, 1981) se utilizaron en experimentos de transformación para la amplificación de plásmidos (Clontech Laboratories, Inc.; Palo Alto, CA. EEUU).

Tabla 3.1. Descripción genotípica de la cepas bacterianas DH5 α y XI-1Blue.

	Genotipo
DH5α	<i>deoR endA1 gyrA96 recA1 hsdR17(rk⁻,mk⁺) relA1 supE44 thi-1</i> Δ (lacZYA-argFSV169) f80 δ lacZDM15 F λ ⁻
XI-1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB</i> lacIqZ Δ M15 Tn10(tet ^R)] ^c

3.1.2. Cepas de levaduras

Para la expresión de las diferentes proteínas recombinantes se utilizaron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* EKY3 y MBY3. Ambas cepas fueron cedidas por la Dra. Mary A. Bjornsti del St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, EEUU. La ventaja de estas levaduras es que tanto EKY3 como MBY3 son deficientes en Top1B. Además, la cepa MBY3 es especialmente útil ya que presenta una mutación en el gen *rad52* que la hace deficiente en la reparación del DNA por recombinación homóloga.

Tabla 3.2. Descripción genotípica de la cepas de levaduras utilizadas en este trabajo.

	Genotipo
EKY3	MAT α , <i>ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, trp1Δ63, top1: :TRP1</i>
MBY3	MAT α , <i>ura3-52, his3Δ200, leu2Δ1, trp1Δ63, top1: :TRP1, rad52: :LEU2</i>

3.1.4. Modelo murino BALB/c

Los ratones (*Mus musculus*) de la línea BALB/c se utilizaron para la obtención de cultivos primarios de esplenocitos. Los ratones infectados se mantuvieron en el laboratorio de seguridad P2 de la ULE hasta su sacrificio y procesamiento.

3.2. VECTORES

3.2.1. pBluescript SK (+/-)

Los plásmidos de la familia pSK (Stratagene) tienen un tamaño de 2.958 pb y contienen el gen de resistencia a ampicilina (*bla*). La secuencia también incluye un sitio de clonado múltiple (MCS) en medio del gen *lacZ*, permitiendo la selección por color de los transformantes. Además, el origen de replicación del bacteriófago f1 permite la obtención de DNA circular de cadena sencilla.

3.2.2. pESC-URA GAL

Los vectores pESC están específicamente diseñados para la expresión y análisis funcional de genes eucariotas en *S. cerevisiae*. El vector pESC-URA es un plásmido de expresión episomal en levaduras (YEp) de 6.631 pbs que toma su esqueleto a partir del fagémido pBluescript II SK(+). Entre las características del vector destacan: i) la presencia del origen de replicación pUC y el gen *bla*, lo que permite la replicación y selección en *E. coli*; ii) contiene el origen de replicación de levaduras, permitiendo así su utilización en *S. cerevisiae*; iii) posee el marcador URA3 que permite la selección y mantenimiento del vector de expresión en auxotrofia; iv) los promotores GAL1 y GAL10 en orientación opuesta, que permite la expresión simultánea de dos genes.

3.2.3. YCpGAL1-hTOP1

Este vector de 12.400 pbs contiene el DNAC de la hTop1B bajo el control del promotor inducible por galactosa GAL1 y posee el marcador de selección URA3. El YCpGal1-hTop1 fue creado por el Dr. Wang y amablemente cedido por la Dra. Paola Fiorani (Departamento de Biología Estructural, Universidad de Roma "Tor Vergata", Italia).

3.2.4. pLEXY-hyg2

Vector de 9.133 pb que permite la expresión de proteínas mediante un sistema constitutivo en *Leishmania sp.* Las proteínas expresadas pueden quedar en el citosol o ser secretadas al medio mediante un péptido señal. El plásmido contiene las secuencias 5' y 3' del gen *ssu* que codifica el 18s RNAr, que además de ser transcrito por la RNA polimerasa I endógena, permite la integración en el genoma de *Leishmania* por recombinación. La integración requiere la linearización previa del vector mediante digestión enzimática con *SwaI*. Como marcadores de resistencia presenta el gen *bla* para bacterias y el gen *hyg* para *Leishmania sp.*

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 (Sambrook y col., 1989). Se preparó disolviendo 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 L de H₂O, con un pH final de 7,0. Para su utilización como medio sólido se añadieron 10 g de agar por litro de medio de cultivo. La esterilización se realizó en un autoclave Sterilclav-18 (Raypa) durante 20 min a 120 °C.

3.3.2. Medio YPD

El YPD (Yeast Peptone Dextrose) es el medio de cultivo estándar para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Para su preparación se disolvieron 10 g de extracto de levadura y 20 g de bactopectona en un volumen de 900 mL de H₂O, para ser inmediatamente esterilizado en el autoclave con un ciclo estándar. Una vez atemperado fue suplementado con ampicilina estéril (50 µg/mL) y 100 mL de glucosa al 20 % (p/v).

3.3.3. Medio S.C. ura-

Las levaduras transformadas con el plásmido pESC-URA deben crecerse en el medio deficiente en uracilo S.C. ura- para mantener la auxotrofia. El medio S.C. ura- debe suplementarse con tres azúcares diferentes a una concentración final del 2% (p/v): i) glucosa, para iniciar el crecimiento del cultivo; ii) rafinosa, para eliminar

las trazas de glucosa que actúa como represor de los promotores GAL1 y GAL10; iii) galactosa para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Para su preparación se mezclaron 1,7 g de medio para levaduras libre de aminoácidos y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.), 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,72 g de una mezcla de aminoácidos sin uracilo y 2 mL de NaOH 1 N en 900 mL de H_2O . Tras la esterilización se añadieron 100 mL de la solución del azúcar requerido para dar lugar a una concentración final del 2% (p/v).

3.3.4. Medio SOC

SOC es un medio de cultivo para la obtención de células competentes de *E. coli* (Inoue y col., 1990). Se preparó disolviendo 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl en 1 L de H_2O , 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. Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 °C. Inmediatamente antes de ser utilizado, se añadieron 5 mL de MgCl_2 2 M y 20 mL de D-glucosa 1 M, previamente esterilizadas.

3.3.5. Medio M199

Es un medio de cultivo básico para el crecimiento de promastigotes de *L. infantum*. Se preparó un stock concentrado 5x para disponer de él a la hora de preparar medio líquido o en placa. Para ello se disolvieron 53,15 g de M199 (Sigma Aldrich®) en 1 L de H_2O , al que se añadió HEPES sólido hasta alcanzar una concentración de 25 mM. El pH se ajustó a 6,9. Para esterilizarlo se utilizaron filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

- Medio líquido: Para el crecimiento de cultivos líquidos de *L. infantum* se diluyeron 100 mL de medio M199 (5x) en 500 mL de H_2O estéril. Se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Innogenetics) inactivado, 40 mM HEPES, 0,1 mM adenina, 5 ‰ (p/v) hemina, 1 ‰ (p/v) biotina, 2 ng/mL de bioterina y 5 mL de un cóctel de antibióticos que contenía 10.000 U/mL de penicilina y 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina (Sigma-Aldrich®).

- **Medio sólido:** La selección de colonias de promastigotes se realizó en placa mezclando medio M199 (2x) con agar noble (Difco®) líquido al 2 % (p/v). El agar noble se preparó mezclando 10 g con 500 mL de H₂O, que se autoclavaron para permitir la completa disolución de la mezcla y al mismo tiempo su esterilidad; una vez terminado el ciclo de autoclavado, se enfrió a 60 °C y se mezcló a partes iguales con M199 (2x) previamente calentado a 37 °C y con su correspondiente antibiótico de selección.

3.3.6. Medio RPMI 1640

El medio RPMI 1640 se ha empleado para el establecimiento de los cultivos primarios de bazo infectados de ratones BALB/c. Para su preparación se diluyeron 10,26 g de medio RPMI 1640 (Gibco®) en 800 mL de H₂O estéril y se suplementó con 10% (v/v) de SFB inactivado (Gibco®), 24 mM de Na₂CO₃, 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, aminoácidos RPMI (1x) (Sigma Aldrich®), 1 mM piruvato de sodio y 5 mL de un cóctel de antibióticos que contenía 10.000 UmL de penicilina y 10.000 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®). Para esterilizarlo se utilizaron filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

3.4. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.4.1. Bacterias y levaduras

Las cepas bacterianas DH5α y XI-1Blue y las cepas de *S. cerevisiae* EKY3 y MBY3 se almacenaron bien a 4 °C en medio sólido o congeladas a -80 °C tras ser resuspendidas en el medio de cultivo adecuado (SOC para las DH5α y XI-1Blue; S.C. ura- o YPD para las levaduras) suplementados con DMSO al 10% (v/v).

3.4.2. Promastigotes de *Leishmania infantum*.

Los promastigotes de *L. infantum* se mantuvieron conservados mediante congelación en tanques de nitrógeno líquido. Para ello se resuspendieron 10⁶ células/mL en medio M199 suplementado con DMSO al 10% (v/v), en ausencia de tampón HEPES y antibiótico.

3.5. REACTIVOS ESPECÍFICOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.5.1. Ácidos nucleicos

El DNA proveniente de esperma de salmón empleado para el proceso de transformación de las levaduras fue adquirido a Sigma-Aldrich®. Para la síntesis de oligonucleótidos se recurrió indistintamente a los servicios de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ. EE.UU.) y Sigma-Aldrich®. Los marcadores de pesos moleculares de DNA se obtuvieron de Amersham Biosciences y Roche Diagnostics.

3.5.2. Enzimas de restricción y “klenow”

Para digerir el DNA se emplearon las siguientes endonucleasas de restricción: *BamHI*, *XhoI*, *MunI*, *BglII*, *NotI*, *EcoRI*, *SpeI*, *HindIII*, *DpnI*. Para la realización de los distintos experimentos se utilizaron otras enzimas como, DNA ligasa del bacteriófago T4, polinucleótido-quinasa de T4, DNA polimerasa “Klenow”, *Pwo* DNA polimerasa, etc. Todas ellas fueron adquiridas de acuerdo a su calidad a Amersham Biosciences, Roche Diagnostics, Promega y New England Biolabs (Beverly, MA. EEUU).

3.5.3. Antibióticos

Para la selección y mantenimiento de los cultivos *E. coli* DH5α y XL-1 Blue se empleó ampicilina (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 50 µg/mL. Para el cultivo de los promastigotes se utilizó el antibiótico G418 (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 10 µg/mL en medio sólido, mientras que en medio líquido se realizó un gradiente progresivo de presión selectiva desde 10 a 100 µg/mL.

3.5.4. Isótopos radiactivos

Se utilizó [α -³²P] dGTP (~3.000 mCi/mmol) para el marcado radiactivo del sustrato de DNA de doble cadena de 202 pbs utilizado en el ensayo de equilibrio escisión-religación. Los oligonucleótidos destinados a los ensayos de actividad TopIB se marcaron con [γ -³²P] ATP (~3.000 mCi/mmol). Finalmente, en los ensayos de incorporación de DNA con mitógenos se usó [U¹⁴H]-timidina, mientras que para los ensayos de precipitación de complejos covalentes con SDS/KCl se empleó [2-

¹⁴C]-timidina (53 mCi/mmol). Todas las fuentes radiactivas fueron adquiridas a Hartmann Analytic (GmbH Deutschland).

3.6. MANIPULACIÓN DEL DNA

3.6.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para la obtención del DNA plasmídico se inoculó una colonia de *E. coli* en 3 mL de medio LB con antibiótico de selección. El cultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 250 rpm durante toda la noche. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 250 µL del tampón P1 Qiagen®. A la suspensión obtenida se añadieron 250 µL del tampón de lisis P2 Qiagen® y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, la muestra fue neutralizada con 350 µL del tampón N3 Qiagen® y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a las columnas suministradas en el kit y centrifugado durante 1 min a máxima potencia. Tras este paso la solución fue lavada con 750 µL del tampón PE Qiagen® y centrifugada durante 1 min. Tras retirar el eluato se procedió a centrifugar de nuevo durante 5 min y a 13.000 rpm para eliminar los restos de etanol ya que el alcohol residual puede inhibir las reacciones enzimáticas subsecuentes. Finalmente se realizó la elución con 50 µL de tampón EB Qiagen® centrifugando durante 1 min a 13.000 rpm.

Para conseguir DNA a mayor escala se emplearon kits comerciales como Miniprep Spin Kit® (Qiagen) y Plasmid Maxi Kit® (Qiagen). La concentración de DNA obtenido se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 Uv-Vis® (Thermo Scientific, USA). Su grado de pureza se determinó mediante la relación A260/A280.

3.6.2. Preparación de proteínas recombinantes

El primer paso para la obtención de LiTopIB fue el diseño de oligonucleótidos para cada uno de los dos genes que constituyen el heterodímero. Para facilitar su clonado en pESC-URA se incluyeron secuencias reconocibles por las enzimas de restricción escogidas: *Bam*HI / *Xho*I para el gen codificante de la subunidad grande LdTopIL, y *Not*I / *Spe*I, para el de la pequeña LdTopIS siendo en

ambos casos la primera enzima citada la localizada en el extremo N-terminal de la proteína codificada

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía: 20 ng de DNA genómico de *L. donovani* (*template*), 125 ng de oligonucleótidos (*primers*), 0,1 mM de una mezcla de dNTPs, 5 μ L de tampón (10x) para la polimerasa y 1 μ L de *Pwo* polimerasa de alta fidelidad. Antes de añadir la enzima se aplicó un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C. A continuación la mezcla se sometió al siguiente programa en un termociclador PTC-100 (Master-J Research, EEUU):

- Desnaturalización: 95 °C, 1 min.
- Hibridación: 66 °C, 1 min.
- Elongación: 72 °C, 1min.

Estos tres pasos se repiten cíclicamente 29 veces, momento en el que se mantiene la temperatura a 72 °C durante 10 min.

Una vez terminada la amplificación, se analizó una alícuota de cada reacción en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) en TAE (1x). Tras la confirmación del tamaño con marcadores apropiados, el fragmento fue extraído y purificado sometándose a la digestión de sus extremos con las enzimas de restricción escogidas para su clonado.

3.6.5. Secuenciación de DNA

Todas las muestras de DNA, tanto las obtenidas por PCR como las construcciones obtenidas en los vectores plasmídicos, fueron enviadas al servicio de secuenciación analítica de INBIOTEC (León, España) para confirmar su secuencia usando iniciadores específicos o universales según el caso.

3.6.6. Purificación de DNA procedente de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis en geles de agarosa se aislaron y purificaron mediante el método QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen), basado en la adsorción selectiva del DNA a una resina de gel de sílice situada en una microcolumna.

El proceso seguido se describe con brevedad: en primer lugar se disolvió el fragmento del gel. Para ello se utilizaron los tampones e instrucciones proporcionados por el proveedor. La solución obtenida se cargó sobre la microcolumna, que se lavó con los tampones suministrados junto al resto del sistema para eliminar las impurezas. Finalmente el DNA se eluyó utilizando 50 μ L de la solución Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

3.6.7. Ligado de fragmentos de DNA con extremos cohesivos

Con el fin de unir el vector plasmídico a los distintos fragmentos de DNA digeridos previamente con las enzimas de restricción seleccionadas, se procedió a ligarlas con DNA ligasa de T4 (Promega) siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

A 10-40 ng de DNA vector se añadió una cantidad equimolar de DNA inserto, 2 μ L de tampón de reacción (10x), 1 μ L (2 U) de DNA ligasa de T4 y H₂Odd estéril hasta completar un volumen de 20 μ L. La reacción se incubó a 16 °C durante 16 h. Las nuevas moléculas generadas en el proceso fueron transformadas en la cepa de *E. coli* adecuada.

- TAMPÓN DE REACCIÓN PARA LA DNA LIGASA DE T4 (10x): ATP 10 mM; BSA 500 μ g/mL; DTT 200 mM; MgCl₂ 100 mM; Tris-HCl 500 mM pH 7,8.

3.6.8. Generación del vector IRFP-pLEXY-3'Hsp70 II-BSD

Para la generación de esta construcción se amplificó mediante PCR 1628 pb de la región intergénica 3' del gen *HSP70 II* de *L. infantum* JPC (Folgueira y col., 2005) contenida en el vector pCR-3'II JPC, amablemente cedido por el Dr. José M. Requena (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC Madrid, España), mediante los cebadores RBF674 y RBF675 (Tabla 1). El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *NotI* y *XbaI* y ligado al vector de clonación pBluescript SK (Stratagene), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generándose así la construcción pSK-3'Hsp70 II. A continuación se amplificó mediante PCR la región codificante del gen de la blasticidina S desaminasa (*BSD*), de 399 pb, a partir del vector pXG-BSD, amablemente cedido

por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University in St. Louis, Missouri, EE.UU.), el cual confiere resistencia al marcador antibiótico blasticidina S (Goyard y Beverley, 2000); para ello se emplearon los cebadores RBF676 y RBF677 (Tabla 1). El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Spe*I y ligado a la construcción pSK-3'Hsp70 II digerida de igual manera, dando lugar así al clon pSK-3'Hsp70 II-BSD. Esta última construcción generada fue digerida con las enzimas de restricción *Not*I y *Spe*I, liberándose así el fragmento 3'Hsp70 II-BSD (2027 pb), y ligado en el vector IFP 1.4-pLEXY digerido con la misma combinación de enzimas de restricción, originándose la construcción IFP 1.4-pLEXY-3'Hsp70 II-BSD. De este modo la región utr2 de vector comercial y el cassette de resistencia a higromicina fueron sustituidos por la región intergénica 3' del gen *HSP70 II* de *L. infantum* y el marcador de resistencia a blasticidina S.

3.6.9. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA procedentes de las digestiones enzimáticas, o los sustratos de DNA circular con diferente grado de superenrollamiento, pueden separarse en función de su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon disolviendo agarosa (Fisher Scientific) en tampón TAE (1x) Una vez disuelta se añadió 0,1 µg/mL de bromuro de etidio para visualizar las bandas de DNA.

Las muestras se mezclaron con 1/5 de su volumen de solución de carga, y se depositaron en los pocillos del gel. La electroforesis se realizó en cubetas submarinas inmersas en TAE (1x), aplicándose una diferencia de potencial de 100 V. Como marcador de peso molecular se utilizó el Molecular Weight Marker X (Roche Diagnostics, Germany), que incluye bandas de tamaño comprendido entre 0,07 hasta 12,2 kpb. Las bandas de DNA se visualizaron exponiendo el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

- TAMPÓN TAE (50x): 242 g Tris base; 57,1 mL ácido acético glacial; 100 mL 0,5 M EDTA pH 8,0.
- SOLUCIÓN DE CARGA: azul de bromofenol 0,25% (p/v); azul de xilenocianol 0,25% (p/v); sacarosa 40% (p/v).

3.7. TRANSFORMACIÓN CELULAR

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

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α y XL1-Blue se realizó por el protocolo descrito por Inoue y col. en 1990, consiguiéndose una alta eficiencia de transformación (5×10^8 transformantes/ μ g de DNA).

Para ello, se sembraron placas LB o LB-tetraciclina para *E. coli* DH5 α , o *E. coli* XL1-Blue, respectivamente, incubándose O/N a 37°C. A continuación se aislaron colonias en medio SOC a 37°C O/N. Transcurrido este tiempo cada 50 μ l de esta suspensión se inocularon en 50 mL de medio SOC, y se incubaron a 18 °C en agitación a 200 rpm, hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀= 0,2 momento en el que se enfrió en hielo durante 10 min.

A continuación, las células se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C (estas condiciones se mantuvieron en el resto de los pasos siguientes). Después las células fueron resuspendidas en 80 mL de TB frío y mantenidas en hielo durante 10 min. Acto seguido, la suspensión se centrifugó en las condiciones expuestas anteriormente, y el precipitado se resuspendió en 20 mL de TB frío, al que se habían añadido 1,4 mL de DMSO (concentración final 7%) como crioconservante.

Finalmente, las células competentes se alicuotaron en tubos de microcentrífuga estériles, y se congelaron en N₂ líquido para su almacenamiento a -80 °C.

- TAMPÓN TB: PIPES 10 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM; pH 6,7.

3.7.2. Transformación en *E. coli*

La transformación de las células competentes de *E. coli* ha sido descrita por Hanahan (1983). En un baño de hielo se descongelaron 200 μ L de células competentes y se añadieron 50 ng de DNA. La mezcla se incubó durante 20 min en hielo y seguidamente se la sometió a un choque térmico por inmersión en un baño a 42 °C durante 45 s y posterior enfriamiento rápido en hielo durante 5 min.

Después se añadieron 800 μ L de medio SOC y se incubó durante 1 h a 37 °C y 250 rpm. De este modo las bacterias que han incorporado el plásmido, expresan el gen de resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección. Por último, se sembraron alícuotas en placas de LB con el antibiótico apropiado para la selección de transformantes.

3.7.3. Transfección de promastigotes de *L. infantum*

La transfección de promastigotes de *L. infantum* fue mediante electroporación según el protocolo descrito por LeBowitz (1994).

El ensayo se realizó transfectando 10 μ g de DNA plasmídico portador de la construcción a valorar. Se partió de 20 mL de cultivo con una densidad de 1×10^6 parásitos/mL por cada transformación que se desea realizar, y que se recogieron al alcanzar la fase exponencial temprana (5×10^6 parásitos/mL). A continuación se eliminó el medio de cultivo mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C y se lavó con la solución de electroporación fría (CYTOMIX) por el mismo procedimiento. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mL de CYTOMIX por cada transformación y se introdujeron en cubetas de electroporación estériles y enfriadas de 4 mm de distancia entre electrodos (Bio-Rad Hercules, CA. EEUU).

La electroporación se llevó a cabo utilizando el electroporador “Gene Pulser® II” con “Capacitance Extender Plus” (Bio-Rad). Los parámetros empleados fueron de 1.500 V/cm (450 V en una cubeta de 4 mm) y 500 μ F de capacitancia.

Tras aplicar el pulso eléctrico, el contenido de las cubetas se transfirió a tubos estériles que contenían 10 mL de medio M199 1X, que se incubaron 20 h a 26°C para su completa recuperación tras el choque eléctrico.

A continuación las células se recuperaron por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min para retirar el medio, y se plaquearon finalmente unos 100 μ L del pellet por cada placa de medio sólido (M199 2X, agar noble 2X, G418 10 μ g/mL).

- CYTOMIX: KCl 120 mM; CaCl₂ 0,15 mM; K₂HPO₄ 10 mM; HEPES 25 mM; EDTA 5 mM; MgCl₂ 5 mM.

3.7.4. Transformación de levaduras

Para la obtención de las cepas de levaduras transformantes (EKY3 y MBY3) se utilizó el método de transformación por acetato de litio (Ito y col., 1983). En primer lugar se inoculó una colonia en 10 mL de medio YPD suplementado con un 2% (p/v) de glucosa y 50 µg/mL de ampicilina para evitar posibles contaminaciones bacterianas. El cultivo se dejó crecer a 30 °C durante 16 h con una agitación constante de 120 rpm, tras las cuales se ajustó la OD₆₀₀ del cultivo a 0,7 por dilución en medio de cultivo. A continuación se incubó durante 2 h a 30 °C y 120 rpm para que alcanzase una OD₆₀₀ de aproximadamente 1. En este momento las células fueron centrifugadas 10 min a 2.300 rpm y lavadas con la Solución 1 en un 25 % del volumen inicial de cultivo por el mismo procedimiento. El pellet resultante se resuspendió en 300 µL de la Solución 1. Por cada transformación se incubó durante 30 min a 30 °C y 150 rpm la siguiente mezcla:

- 30 µL de células (resuspendidas en la Solución 1)
- 8 µL de DNA de esperma de salmón (6,6 µg/µL)
- 130 µL de Solución 2
- ≥ 100 ng del DNA a transformar

Transcurrida esta incubación, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42 °C durante 15 min y acto seguido sembradas en placas de medio S.C. ura- suplementadas con glucosa al 2% (p/v). Las placas fueron incubadas a 30 °C hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado.

- SOLUCIÓN 1: 40 mL H₂O; 5mL TE 10X; 5mL LiOAc 10X
- SOLUCIÓN 2: 8 mL PEG 50%; 1mL TE 10X; 1mL LiOAc 10X

3.8. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.8.1. Crecimiento e inducción de cultivos

Tanto el plásmido pESC-URA GAL (con los genes codificantes de LdTopIL y LdTopIS clonados bajo el control de los promotores GAL1 y GAL10) como el YCpGAL1-hTOP1 tienen como marcador de selección URA3 lo que permite su crecimiento en medio sintético completo carente de uracilo (S.C. ura-). En ambos

casos, para la sobreexpresión de LiTopIB y hTopIB recombinantes, se inoculó una colonia aislada en 10 mL de cultivo S.C. ura- complementado con glucosa al 2 % (p/v) y se creció a 30 °C O/N con agitación continua. Una alícuota del cultivo se diluyó cien veces en medio S.C. ura- con rafinosa al 2 % (p/v) y se incubó durante 24 h. A este cultivo se añadió galactosa de una solución stock al 20 % (p/v) para alcanzar una concentración final en el cultivo del 2 %, induciéndose así la expresión de los genes clonados bajo su promotor. Tras 6 h de incubación, las células fueron recogidas por centrifugación a 2500 rpm a 4 °C, lavadas dos veces con un volumen de H₂O fría y resuspendidas en 15 mL de tampón de lisis.

- TAMPÓN DE LISIS: *tampón TEEG (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10% (p/v) suplementado con KCl 0.2 M y coctel de inhibidores de proteasas [NaF 1X, bisulfito sódico 1X, Complete[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals) (2x)].*

3.8.2. Obtención de extractos

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

3.8.3. Purificación de proteínas recombinantes

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

Los extractos solubles procedentes de la sobreexpresión en levaduras se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ sólido hasta alcanzar una saturación entre el 35% (p/v) (para precipitar proteínas nucleares que comparten características físico-químicas con la LiTopIB) y el 75% (p/v). Las proteínas precipitadas en este intervalo se

recogieron por centrifugación a 10.000 rpm y se resuspendieron en 20 mL de tampón TEEG (1x), 0,2 M KCl suplementado con inhibidores de proteasas para la columna de intercambio iónico.

La solución proteica obtenida se aplicó cuidadosamente en la interfase de una columna de polipropileno empaquetada con 5 mL de resina de fosfocelulosa P-11 (Whatman®) (sólo fueron necesarios 2 mL en el caso de la purificación de la hTopIB), equilibrada previamente con 10 mL del tampón TEE (5x) G (1x), 2 M KCl y 10 mL de TEEG 1(x), 0,2 M KCl para ajustar la conductividad de la columna. Una vez que la disolución proteica penetró en el gel por gravedad, se efectuaron dos lavados de la resina con 10 mL de TEEG (1x), 0,2 M KCl cada uno. Posteriormente se lavó la columna con 5 mL de TEEG (1x), 0,4 M KCl. En este gradiente ascendente discontinuo de KCl, la elución de la TopIB se produjo con 0,6 M KCl en el caso de la enzima de *Leishmania*, mientras que la enzima humana se eluyó a una concentración de 0,8 M KCl.

Las soluciones proteicas enriquecidas en TopIB se aplicaron sobre una columna cromatográfica de interacción hidrofóbica de PSP CL-4B (Sigma-Aldrich®, Chemical Co) equilibrada con 10 mL de TEEG (1x), 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La columna se lavó con 5 mL de TEEG (1x) 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posteriormente con 3 mL de TEEG (1X), 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Finalmente, se procedió al eluido de la columna con 4 mL de TEEG (1x) recogiendo fracciones de 1mL.

El volumen eluido de la columna PSP CL-4B, se colocó en una bolsa de diálisis previamente hervida durante 15 min y lavada con H_2O fría. Seguidamente se sumergió en un litro de tampón de diálisis durante 2 h, a 4 °C de temperatura. El proceso se repitió tres veces.

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

- TEEG (1x): Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol al 10 % (v/v); NaF 80 µg/mL; NaSO₃ 10 µg/mL; IP (0,2x) [Inhibidor de proteasas Complete Mini[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals)]
- TEE (5x) G (1x): Tris-HCl 250 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; EGTA 5 mM; glicerol al 10 % (v/v); NaF 80 µg/mL; NaSO₃ 10 µg/mL; IP (0,2x).
- PRETRATAMIENTO DE LA RESINA DE FOSFOCELULOSA P-11: una vez tratada según las instrucciones del fabricante, se resuspende el mismo volumen de resina húmeda en tampón de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 50 % (v/v); KCl 1 M). Una vez decantada la resina, se lava dos veces con un tampón reducido en sales (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glicerol 50 % (v/v); KCl 0,2 M) y se vierte el volumen deseado en la columna de polipropileno.
- PRETRATAMIENTO DE LA RESINA FENIL SEPHAROSA CL4B: La resina de PSP CL4B no necesita ser activada. Para su compactación y lavado se procedió de manera similar a la columna P11. Se compactaron 3 mL de la resina y se añadieron cuidadosamente 10 mL de H₂O 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 (NH₄)₂SO₄ con una mezcla de inhibidores de proteasas.
- IP (1x): 1 pastilla de inhibidor de proteasas Complete[®] EDTA-free (Roche Molecular Biochemicals) por cada 50 mL de solución.
- TAMPÓN DE DIÁLISIS: Tris-HCl 10 mM pH= 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 0,1 mM; albúmina sérica bovina (BSA) 150 µg/mL; glicerol 10% (v/v).

3.9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (Laemmli, 1970)

3.9.1. Preparación del gel separador

Las cantidades de los distintos componentes necesarios para preparar 10 mL de gel separador varían en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, y se reflejan en la Tabla 3.3. Antes de añadir el persulfato amónico y el TEMED, la mezcla se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 10 min. La polimerización tuvo lugar en 20-30 min.

Tabla 3.3. Cantidades necesarias para preparar 10 mL de gel separador.

Componente	Concentración de acrilamida/bisacrilamida		
	10%	12%	13%
H₂O_d	1,9 mL	1,6 mL	1,1 mL
acrilamida/bisacrilamida	1,7 mL	2 mL	2,5 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 mL	1,3 mL	1,3 mL
10% SDS (p/v)	50 µL	50 µL	50 µL
10% persulfato amónico	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	2 µL	2 µL	2 µL

- **ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA:** 30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida. Añadir H₂O_d hasta 100 mL.

3.9.2. Preparación del gel concentrador

El gel concentrador se preparó utilizando 6,1 mL de H₂O_d, 2,5 mL de Tris-HCl pH 6,8, 1,3 mL de acrilamida/bisacrilamida y 100 µL de SDS al 10% (p/v). Tras desgasificar la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 10 min, se añadieron 50 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) y 10 µL de TEMED. La mezcla se dejó polimerizar durante 15 min.

3.9.3. Preparación de las muestras

Las muestras de extractos proteicos se mezclaron con 1/5 de su volumen de solución de carga, y se hirvieron durante 5 min, tras lo cual se procedió a cargarlas en los pocillos del gel concentrador.

Como marcador de pesos moleculares se empleó el suministrado por Bio-Rad, que incluye los patrones preteñidos de la fosforilasa B (111 kDa), BSA (73 kDa), ovoalbúmina (47,5 kDa), anhidrasa carbónica (33,9 kDa), inhibidor de la tripsina de soja (28,8 kDa) y lisozima (20,5 kDa).

- **SOLUCIÓN DE CARGA:** 4,8 mL de H₂O_d; 0,5 mL de azul de bromofenol al 0,05% (p/v); 1 mL de glicerol; 0,5 mL de β-mercaptoetanol; 2 mL de SDS al 10% (p/v); 1,2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.

3.9.4. Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta “Mini-Protean II” (Bio-Rad) con tampón de electroforesis, y aplicando una diferencia de potencial de 8 V/cm hasta que el frente penetró en el gel separador. A continuación, el voltaje se incrementó hasta 15 V/cm y se mantuvo hasta que el azul de bromofenol de la solución de carga alcanzó el final del gel separador. Una vez que se corrieron los geles de proteínas se procedió a la tinción con azul de Coomassie durante 20 min en agitación y posterior desteñido.

- TAMPÓN DE ELECTROFORESIS: 14,42 g de glicina; 1 g de SDS; 3,03 g de Tris base; H₂O hasta completar 1 L.
- SOLUCIÓN DE TEÑIDO: 0.1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético glacial.
- SOLUCIÓN DE DESTENIDO: 40% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético glacial en H₂O.

3.9.5. Medida de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976), utilizando el sistema “Protein Assay” (Bio-Rad). La recta de calibrado se estableció utilizando BSA (Sigma-Aldrich®, Chemical Co) como estándar.

3.10. ESTUDIOS ACTIVIDAD Y SENSIBILIDAD TopIB *in vitro*

3.10.1. Determinación de la actividad TopIB

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

Antes de valorar la actividad de los inhibidores de TopIB sobre las diferentes enzimas purificadas, realizamos un ensayo destinado a cuantificar la actividad de la misma sobre el DNA superenrollado. La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 μ L y contenía 2 μ L de tampón TOP (10x), y como sustrato 0,5 μ g de DNA circular superenrollado pBluescript SK-(pSK). A la mezcla se añadieron 0,5 μ g de la proteína purificada, realizándose diluciones 1:3 hasta no observar topoisómeros. Los tubos de reacción se incubaron durante 30 min en un baño a 37 °C a partir de la adición de la proteína, y posteriormente se digirieron con 2 μ g de proteinasa K y SDS al 1 % (p/v). La visualización de los topoisómeros se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) preparada en 200 mL de TBE (1x). La electroforesis se resolvió a razón de 2 V/cm durante 16 h, y se tiñó con una solución de BrEt (0,5 μ g/100 mL) para obtener imágenes digitales usando un sistema de adquisición de geles (G-Box Syngene UK).

Gracias a este ensayo definimos una Unidad Enzimática TopIB (U) como la cantidad de enzima necesaria para relajar completamente 0,5 μ g de DNA superenrollado en 30 min a 37 °C. Esto permitió normalizar todos los ensayos realizados con LiTopIB y hTopIB recombinantes.

- TAMPÓN TOP (10x): Tris 100 mM pH 7,5; KCl 150 mM; MgCl₂ 50 mM; EDTA 0,2 mM; 150 μ g/mL BSA.
- TAMPÓN TBE (10x): Tris 890 mM; ácido bórico 890 mM; EDTA 20 mM pH 8,0.

3.10.2. Inhibición de la actividad de relajación

Para comprobar la inhibición de las indenoisoquinolinas sobre la actividad de relajación TopIB se llevaron a cabo ensayos tiempo y concentración dependientes. La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 μ L y contenía 2 μ L de tampón TOP (10x), 0,5 μ g de DNA pSK, 1 U LiTopIB ó hTopIB y 1 μ L de las diferentes concentraciones del compuesto a estudiar (ensayo dosis dependiente) o una concentración fija de 75 μ M de cada molécula a diferentes tiempos de reacción (0.2 a 15 min). Las mezclas fueron incubadas a 37 °C. Las reacciones fueron detenidas añadiendo SDS al 1 % (p/v) y posteriormente se digirieron con 2 μ g de proteinasa K. Los topoisómeros fueron resueltos las mismas condiciones que el

apartado anterior. Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software de análisis de geles ImageJ (NIH software) y representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK).

3.10.3. Detección de complejos covalentes en geles de agarosa

Tal y como se ha descrito en la introducción algunos inhibidores TopIB son capaces de atrapar los complejos CL, lo que genera la estabilización de DNA mellado (rotura de cadena sencilla) con la proteína unida covalentemente al extremo 5' de la rotura (dejando libre el extremo 3' OH). En este ensayo se utilizó como sustrato el plásmido superenrollado circular pSK. En presencia de un agente estabilizante de complejos CL, la banda correspondiente al DNA mellado se pudo observar únicamente después de que la TopIB desnaturalizada fuera degradada por la acción de la proteinasa K. Otro aspecto importante de este ensayo es que los productos de la actividad TopIB fueron separados en presencia de BrEt (agente intercalante) que alteró la forma de las moléculas de DNA circular (cerrado) y por lo tanto, modificó su movilidad electroforética en el gel de agarosa. El agente intercalante no produjo cambios en el Lk, sino que indujo un aumento relativo en el Wr. De esta forma se pudo observar el DNA mellado, correspondiente a los complejos covalentes DNA-droga-TopIB (CL), acumulados en una única banda (Hsiang y col., 1985).

Al igual que en el caso del ensayo de inhibición de la relajación, se llevaron a cabo ensayos tiempo y concentración dependientes. La mezcla de reacción (20 μ L) contenía 2 μ L de tampón TOP (10x), 0,5 μ g de DNA pSK, 75-100 U LiTopIB ó hTopIB y 1 μ L de las diferentes concentraciones de la droga a estudiar (ensayo dosis dependiente) o una concentración fija de 75 μ M de las distintas indenoisoquinolinas y a diferentes tiempos de reacción. Las mezclas fueron incubadas a 25 °C. Tras detener las reacciones con SDS al 1 % (p/v) se procedió a la digestión de las mismas con 2 μ g de proteinasa K durante 1 h a 37 °C. Seguidamente, se procedió a limpiar las muestras mediante una extracción 1:1 (v/v) con fenol-cloroformo. Por último, las muestras extraídas se resolvieron en geles de agarosa al 1% (p/v) en TBE (1x) suplementado con BrEt a una concentración final de 40 pg/ μ L. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones que en los apartados anteriores y las bandas se cuantificaron con el software de análisis de

geles ImageJ (National Institutes of Health software). La cantidad de DNA mellado se calculó como el porcentaje de señal obtenido para la banda de mellado dividido por el total de señal del carril. Los resultados fueron representados gráficamente con el software estadístico SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK).

3.11. ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

Debido a la alta sensibilidad de la GFP a los tratamientos tradicionales de fijación, tales como el formaldehído o el paraformaldehído, se optó por realizar preparaciones de células *in vivo*. Los promastigotes, transfectados con las diferentes deleciones de cada una de las subunidades fusionadas a la GFP, fueron fijados a la superficie de los pocillos de las placas para microscopía *Slide for Live Cell Analysis*® (IBIDI) con una solución de poli-L-lisina (Sigma Chem. Co.). La localización subcelular de las proteínas LiTopIB-GFP fue determinada en un sistema de microscopía confocal Nikon C1. Las proteínas de fusión GFP fueron excitadas con un láser de argón con una longitud de onda de 488 nm y la fluorescencia emitida fue registrada con un detector de 509/30 nm. Para los estudios de co-localización de la LiTopIB tanto con el núcleo celular como con el kinetoplasto se realizó una tinción del DNA celular con diamino-2-fenilindol (DAPI).

3.12.1. Tinción con diamino-2-fenilindol (DAPI)

Se partió de 3×10^6 células/mL, las cuales se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min para eliminar el medio de cultivo y a continuación se lavaron dos veces con PBS. Se centrifugaron las células a las mismas revoluciones y se resuspendieron en 200 μ L de la solución de DAPI 10 μ g/mL y se incubaron durante 30 min en oscuridad. Tras este periodo de incubación se volvió a centrifugar a la misma velocidad y se lavaron con 1 mL de PBS para finalmente resuspender las células en 1 mL del tampón fosfato y añadir 150 μ L al pocillo tratado con poli-L-lisina.

3.12.2. Fijación con poli-L-lisina

Para realizar la fijación *in vivo* de los promastigotes se preparó una dilución 1:10 de poli-L-lisina (Sigma) en H₂O. Los pocillos fueron tratados incubando 300 μ L de ésta dilución durante 20 min a temperatura ambiente, pasados los cuales se

procedió a retirar el exceso de poli-L-lisina de los pocillos mediante cinco lavados cinco de 500 μ L/pocillo con H₂Odd estéril.

3.11. VIABILIDAD CELULAR

3.11.1. Determinación de la viabilidad en promastigotes de *L. infantum*-iRFP

Los cultivos de promastigotes de *L. infantum*-iRFP se sembraron en medio M199 (1x) suplementado con SFB inactivado al 10 % (v/v) y antibióticos partiendo de una densidad de 1×10^6 células/mL en placas de microtitulación negras con fondo transparente de 96 pocillos. Se añadieron entonces diferentes concentraciones de cada compuesto por triplicado por columnas, dejándose una incubación adicional de 48h a 26 °C en agitación. La viabilidad de los cultivos se determinó por la fluorescencia infrarroja emitida por los mismos registrada en un detector Odyssey (Li/Cor). El efecto leishmanicida se expresó como la concentración necesaria para producir la reducción de la viabilidad al 50 % del control negativo (IC₅₀), utilizando para ello el paquete informático SigmaPlot™ 11.3 (Systat Software Inc, UK). La relación entre la emisión de fluorescencia y el número de células viables fue determinado mediante un contador de células Beckman Coulter® Z1.

3.11.2. Plataforma fenotípica HTS de explantes murinos infectados con *L. infantum*-iRFP

Los bazos con pesos $\geq 0,7$ g procedentes de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*-iRFP se recogieron a las 5 semanas post-infección para su procesamiento. En pocas palabras, las piezas pequeñas se obtienen mediante el uso de un bisturí. Con el fin de obtener una única suspensión de células, el tejido se incubó con 2 mL de colagenasa D (Roche) a 2 mg/mL de tampón (10 mM HEPES pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, 1,8 mM CaCl₂) durante 20 min a 37° C. La suspensión de células y fragmentos de tejido restante se pasaron suavemente a través de un colador de células de 100 μ m para eliminar los fragmentos de tejido. Después de la lisis de los eritrocitos, los esplenocitos se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación (500 xg durante 7 min a 4° C). Los esplenocitos se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas negras de 384 pocillos con fondo transparente en medio RPMI que contenía SFB al

20% (v/v), piruvato sódico 1 mM, complemento vitamínico RPMI (1x), HEPES 10 mM y una mezcla de 100 U/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomina suplementado con 50 mM 2-mercaptoetanol.

Con el fin de estandarizar la plataforma de cribado, los esplenocitos aislados según el procedimiento anterior se sembraron con una densidad suficiente que permitiera el crecimiento de los amastigotes intracelulares. Con este fin se sembraron $2,0 \times 10^5$ AU de esplenocitos infectados en cada uno de los pocillos de la placa, con excepción de las filas y columnas primeras y últimas, para evitar las medidas irregulares que suelen producirse en estos pocillos. Para evitar el efecto borde – consecuencia de la mayor evaporación en estos pocillos a lo largo de los días – los pocillos correspondientes se llenaron con H₂O. Los controles positivos – que incluyen el fármaco de referencia (AmphB) y los controles negativos (0,5% DMSO) fueron distribuidos en forma alternativa a lo largo de las columnas (“placas control”). Esta distribución sistemática se mantuvo en todos los ensayos.

Se dispusieron un total de 298 compuestos a una concentración única de 10 μ M en las placas de 384 pocillos (“placas de cribado”) evitando el efecto borde. Los esplenocitos obtenidos según el apartado anterior se añadieron a las “placas de cribado” (que contienen los compuestos a ensayar) y las “placas control” (que contienen los controles positivos y negativos). Todas ellas se incubaron a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%, registrándose la emisión fluorescente en el infrarrojo cercano a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación con los compuestos en el dispositivo Odyssey (LI-COR, EE.UU.).

- i. El efecto leishmanicida de las tres colecciones de compuestos se calculó como el porcentaje de inhibición relativas a los controles positivos (Amph B) y negativos (DMSO) como sigue:
- ii. $I = (\text{media de DMSO } 1\% - \text{valor experimental}) / (\text{media de } 1\% \text{ de DMSO} - \text{media de Amph BEC100}) \times 100$.
- iii. Todas las “placas de cribado” contenían en las columnas 2 y 23 controles positivos (Amph B, 10 μ M) y negativos (DMSO 1% v/v) con el fin de normalizar los resultados al de las “placas control”. La reproducibilidad se determinó por el factor Z' que se calculó:

- iv. $Z' = [(controles\ positivos\ 3SD + 3SD\ controles\ negativos) / (media\ de\ los\ controles\ positivo-media\ de\ los\ controles\ negativos)]$.

Los “hits” primarios se definieron como compuestos que muestran una inhibición del 50% de la señal infrarroja.

3.11.3. Citotoxicidad en esplenocitos murinos no infectados

Para obtener esplenocitos murinos sin infectar, se utilizaron ratones Swiss de ambos sexos que fueron sacrificados para obtener el bazo en condiciones estériles. Los esplenocitos se obtuvieron como se ha descrito en el apartado anterior, se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 2×10^5 /pocillo y se expusieron a distintas concentraciones de indenoisoquinolinas durante 48, 72 y 96 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La viabilidad de los esplenocitos a los compuestos se determinó mediante la reducción de resazurin (azul alamar) a resofurin que emite fluorescencia a 595nm, con un lector multimodal de placas Synergy HT (BioTek). La relación entre la emisión de fluorescencia y el número de macrófagos viables fue determinado mediante un contador de células Beckman Coulter® Z1.

3.12 FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA H2AX

El antisuero frente a la histona fosforilada H2AX de *L. infantum* se preparó en conejos inoculados con el epítipo C-KHAKA[pT]PSV (Open Biosystems) que contiene Thr-130 fosforilada. El antisuero policlonal se obtuvo después del sangrado del animal, titulándose mediante ELISA directo a una dilución de 1: 204800. Los promastigotes de *L. infantum* que habían sido expuestos a diferentes concentraciones de CPTs e indenoisoquinolinas por un periodo de tiempo variable (15 min a 2 h) se recogieron y lavaron en PBS y a continuación se destruyeron mediante sonicación. Los extractos celulares se añadieron al tampón de lisis y las muestras se separaron en un gel de SDS-PAGE 15%. El anticuerpo primario frente a *L. infantum* H2A se utilizó a una dilución de 1: 200 y el secundario (preparado en cabra frente a las IgGs de conejo con el fluoróforo IRDye 680 Licor Biosciences) se usó con un título de 1:2000. En algunos experimentos se utilizó wortmanina a una concentración de 10 µM y/o cafeína a una concentración de 4 mM pre-incubadas

antes de la adición de los correspondientes inhibidores con el fin de evaluar su efecto sobre la fosforilación de la histona H2AX.

3.13. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El efecto de las CPTs y de los derivados indenoisoquinolínicos inhibidores de la TopIB se midió en promastigotes de *L. infantum* a diferentes tiempos de incubación y distintas concentraciones. De diez a cincuenta mil promastigotes sin tratar (control) y tratados con los distintos compuestos se recogieron a los distintos tiempos de incubación en PBS y se fijaron en una suspensión de metanol libre de formaldehído al 1% en PBS a 0 °C durante 15 min. Pasado este tiempo, las células se resuspendieron en etanol al 70% durante al menos 2 h a -20 °C. Los promastigotes se lavaron a continuación dos veces con PBS y se resuspendieron en Triton X100 0,2% (v/v) en BSA al 1% (p/v) durante 30 min. Después de centrifugarse a 300 x g durante 4 min a temperatura ambiente, las células se resuspendieron en una solución que contenía 1 mg de diamidino-2-fenilindol (DAPI) disuelto en PBS. Transcurridas 12 h de incubación a 4°C, la suspensión celular se lavó dos veces con PBS y las diferentes poblaciones celulares se analizaron en un citómetro de flujo Cyan ADP Dako.

3.14. ESTUDIO INFORMÁTICO DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS

Las características físico-químicas de una molécula tienen especial importancia en su biodisponibilidad después de su administración a animales en los estudios preclínicos. La regla de cinco de Lipinski es una regla completamente empírica que permite evaluar cualitativamente que tan adecuado podría resultar un compuesto químico para cumplir alguna determinada función farmacológica o actividad biológica una vez que es ingerido como medicamento para consumo oral (Lipinski y col., 2001).

Esta regla es importante para el desarrollo de fármacos a partir de compuestos con propiedades farmacológicas previamente demostradas para obtener mejores actividades y selectividades, por ejemplo. Estas modificaciones a las estructuras moleculares suelen conllevar a fármacos con pesos moleculares

superiores, mayor número anillos, más enlaces con posibilidad de rotación libre y más alta lipofilidad.

Tal y como lo indica la regla de Lipinski, en general, una droga activa y para consumo oral no debe violar más de una de las siguientes consideraciones:

- i. No debe contener más de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno (HDA).
- ii. No debe contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno (HBA).
- iii. Debe poseer un peso molecular inferior a 500 Da.
- iv. Debe poseer un coeficiente de reparto octanol-agua (Clog P) inferior a 5.

El cálculo virtual de las características físico-químicas de los compuestos utilizados en la Memoria se ha realizado mediante el paquete informático de DruLiTo (Drug Likeness Tool) que es una herramienta de cribado virtual de acceso libre (http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html).

4. resultados

4. RESULTADOS

4.1. GENERACIÓN DE LA CEPA DE *L. infantum*-iRFP

Las propiedades de los fitocromos de origen bacteriano como colorantes fluorescentes son conocidas desde hace décadas. La proteína iRFP es una modificación de IFP1.4 procedente de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* que tras incorporar biliverdina emite fluorescencia en el infrarrojo cercano (λ_{exc} . 690 nm/ λ_{emm} . 713 nm).

Con el fin de crear una cepa fluorescente infrarroja como herramienta en una plataforma fenotípica HTS, los promastigotes de *L. infantum* BCN 150 se electroporaron con el fragmento lineal de 6.110 pb procedente de la digestión con *Swa*I que contiene el ORF que codifica iRFP, así como el marcador de selección *hyg* del plásmido pLEXSY-*hyg*2 (Fig. 4.1 A y B) que le confiere resistencia a este antibiótico. Después de la selección en placa con 200 μ g/ml de higromicina B, las colonias individuales fueron sembradas en medio líquido M199 suplementado con SFB inactivado térmicamente al 10% v/v y el antibiótico correspondiente. El DNA genómico aislado a partir de estos cultivos se utilizó para confirmar la integración correcta en el locus del rRNA 18s del genoma de *L. infantum* (Fig. 4.1 C).

La manipulación genética de la cepa de *Leishmania* modificada no afectó a su tasa de crecimiento ni a su infectividad. La Fig. 4.2 (A y B) demuestra que el crecimiento de los promastigotes de *L. infantum*-iRFP no difería del de la cepa salvaje no manipulada tanto en términos de número de células como en el de emisión de fluorescencia. Paralelamente medimos su capacidad infectiva *in vitro* – sobre cultivos de monocitos humanos THP-1 – y *ex vivo* – en amastigotes aislados de lesión (bazos de ratones BALB/c tras 5 semanas de infección). La Fig. 4.2 C

muestra la población de macrófagos THP-1 infectados con amastigotes de *L. infantum*-iRFP por citometría de flujo cuando se excitan con una la longitud de onda de 650 nm. Finalmente, la Fig. 4.2 D muestra a viabilidad de los promastigotes fluorescentes transformados de amastigotes de bazo de un ratón infectado con *L. infantum*-iRFP. En todos los casos la correlación entre la fluorescencia emitida por los promastigotes (medida en un sistema de detección de imagen infrarroja Odyssey[®] (LI-COR)) y su número – determinado mediante recuento en Coulter – fue directa, con valores de $r > 0,99$.

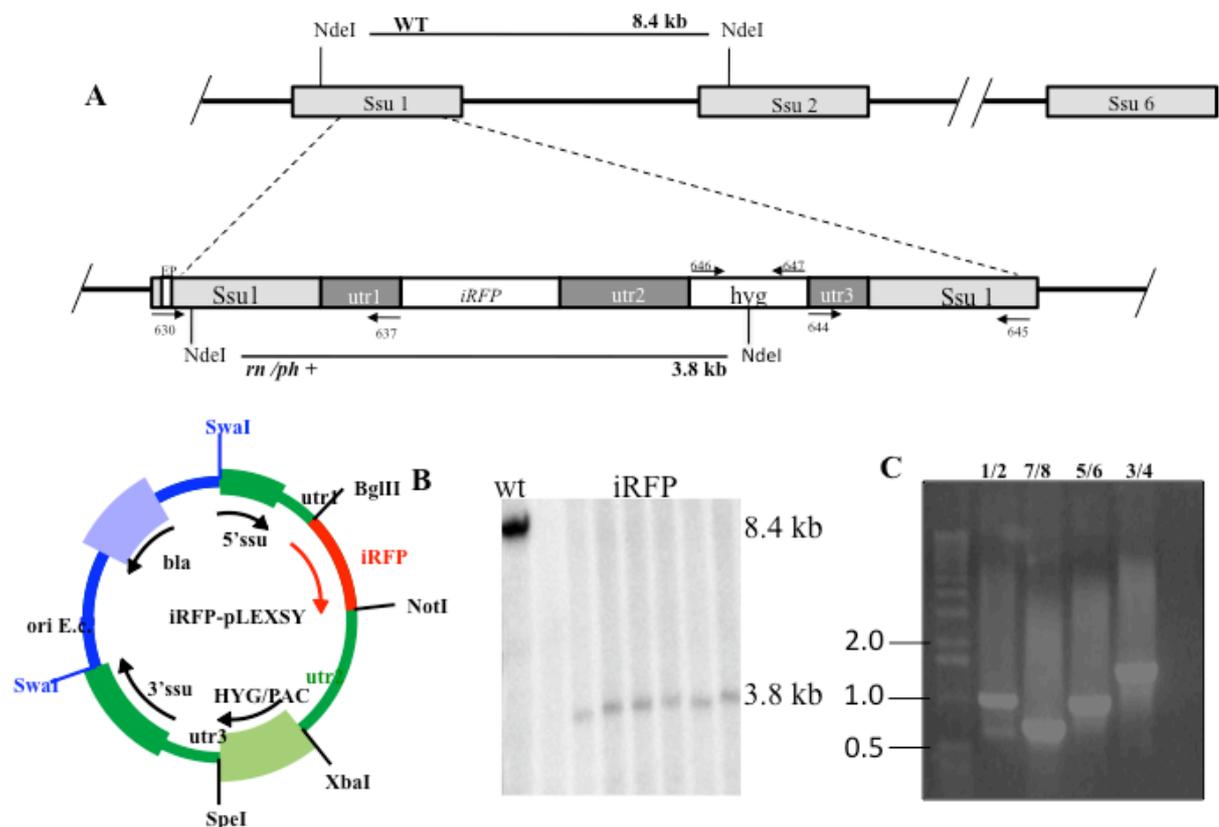


Figura 4.1. Estrategia de integración del gen *irfp* en el locus rRNA 18s de *L. infantum* BCN150. A) Estructura del locus rRNA 18s de la cepa salvaje y lugar planeado de clonaje. clave: utr1: 5'UTR del gen *apt*; utr2: 1.4kb region intergénica del operón *cam*; y utr3: 5'UTR del gen *dhr-ts*; hyg; cassette de resistencia a higromicina B. la caja blanca estrecha del lado izquierdo corresponde la sonda externa usada para la detección por Southern. B) Análisis de Southern de dos clones de *L. infantum* después de su selección con higromicina B e hibridación con la sonda externa EP. C) confirmación por PCR de la integración correcta de iRFP en el genoma de *L. infantum*-iRFP.

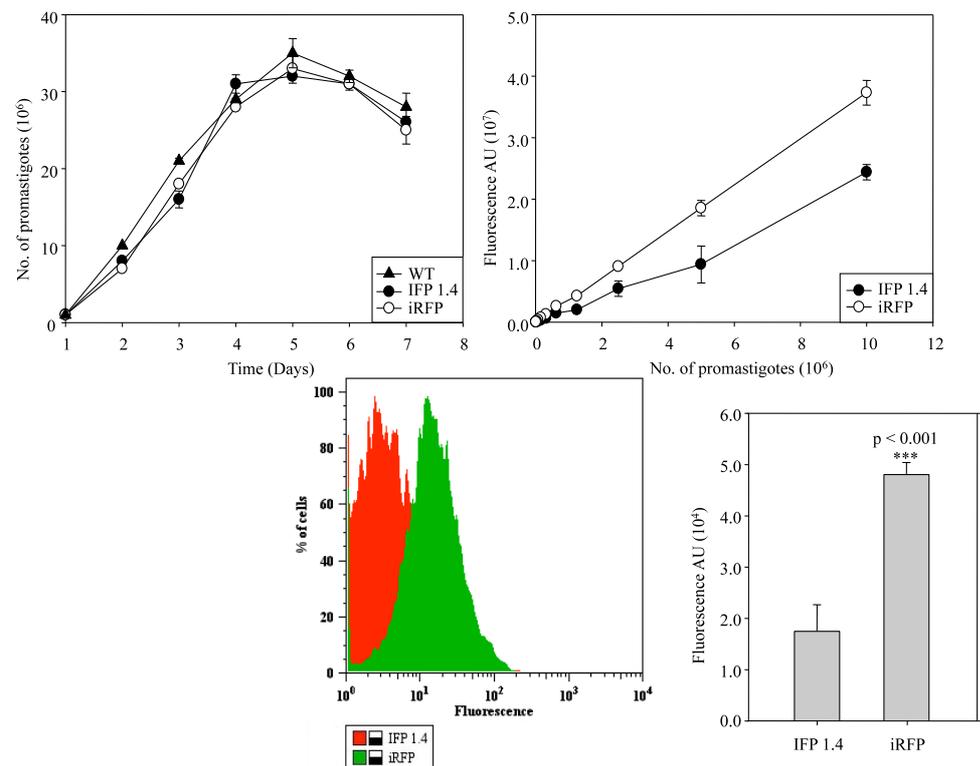


Figura 4.2. Caracterización de las cepas transgénicas *L. infantum*-iRFP *in vitro*. A) Estudio del crecimiento de promastigotes de las cepas *L. infantum*-iFP1.4 (•), *L. infantum*-iRFP (○) con respecto a la cepa salvaje *L. infantum* (▲) en las condiciones estándar de cultivo líquido B) Correlación entre la emisión fluorescente infrarroja emitida por los promastigotes de las cepas *L. infantum*-iFP1.4 (•) y *L. infantum*-iRFP en función del número de células. C) Análisis de citometría de flujo de amastigotes aislados de infecciones *in vitro* en monocitos THP-1 con *L. infantum*-iFP1.4 (área roja) y *L. infantum*-iRFP (área verde) excitados con una longitud de onda de 650 nm. D) Emisión de los amastigotes aislados de una lesión de bazo de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*-iFP1.4 (barra izquierda) y *L. infantum*-iRFP (barra derecha) después de 5 semanas post-infección. Los valores se corresponden a la media \pm sd de tres experimentos realizados por separado.

La estabilidad de *L. infantum*-iRFP se estudió durante un período de 6 meses después de la transfección, no observándose cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida durante este período, incluso en ausencia de higromicina B.

4.1.1. Optimización de la construcción

Leishmania sp. como otros tripanosomátidos no regula la transcripción genética mediante la RNA polimerasa II. Por el contrario, los genes que codifican proteínas están dispuestos en forma tándem de cabeza a cola y se transcriben de

una sola vez como policistrones de RNA de 10 a 100 genes. El procesamiento de los RNA policistrónicos en mRNA monocistrónicos se hace mediante un mecanismo post-transcripcional de *trans*-splicing que coloca una secuencia CAP en cabeza y una cola de poli-A en los mensajeros maduros. La regulación de la expresión génica se hace pues a nivel post-transcripcional donde la abundancia de los mRNA depende de las regiones no traducidas colocadas en posición 3' (3'UTR: del inglés 3' Untranslated Regions) del gen que se va a transcribir. Por lo tanto la abundancia de los mRNA y de este modo el nivel de expresión de la proteína reportera va a depender de los 3'UTR que tenga corriente abajo de su ORF y del papel que jueguen éstos en las formas celulares de su ciclo digenético.

Con este fin, hemos identificado varios genes que se expresan de forma exclusiva en la forma amastigote de *L. infantum* – gen A2 y AMASTIN – y hemos obtenido su región intergénica mediante amplificación por PCR. De la misma manera hemos obtenido la región intergénica corriente abajo del gen codificante de la proteína de choque térmico HSP70 que aumenta su expresión bajo condiciones extremas de temperatura, como las que sufre el promastigote dentro del hospedador. La Fig. 4.3A es una representación esquemática de las diferentes construcciones realizadas en el vector pLEXY-hyg2 en el que se sustituyó la 3'UTR de la DHFR procedente del vector comercial, por las tres regiones intergénicas situadas corriente debajo del gen reportero *irfp*.

Tras la linearización de los vectores y la transfección de los promastigotes mediante electroporación en medio líquido, se procedió a la selección en medio sólido en presencia esta vez de puromicina. Se realizó en primera instancia un estudio del crecimiento de las cepas de promastigotes de *L. infantum*-iRFP que portaban integrados en el locus del RNA 18S los distintos 3'UTRs descritos en el párrafo anterior (Fig. 3.3B). Se observó que la cepa que emitía mayor fluorescencia – relativa al número de promastigotes – era aquella que llevaba la región intergénica del gen codificante de la proteína HSP70. Igualmente, los ensayos de citometría de flujo realizados con macrófagos infectados con amastigotes transformados con las distintas construcciones, demuestran que la cepa *L. infantum*-iRFP que portaba corriente abajo del gen reportero la región intergénica de HSP70 era la que tenía una mayor emisión de fluorescencia infrarroja.

(Fig.4.3C). Finalmente se analizó la fluorescencia emitida por los promastigotes procedentes de amastigotes transformados de una lesión *in vivo* de animales previamente infectados.

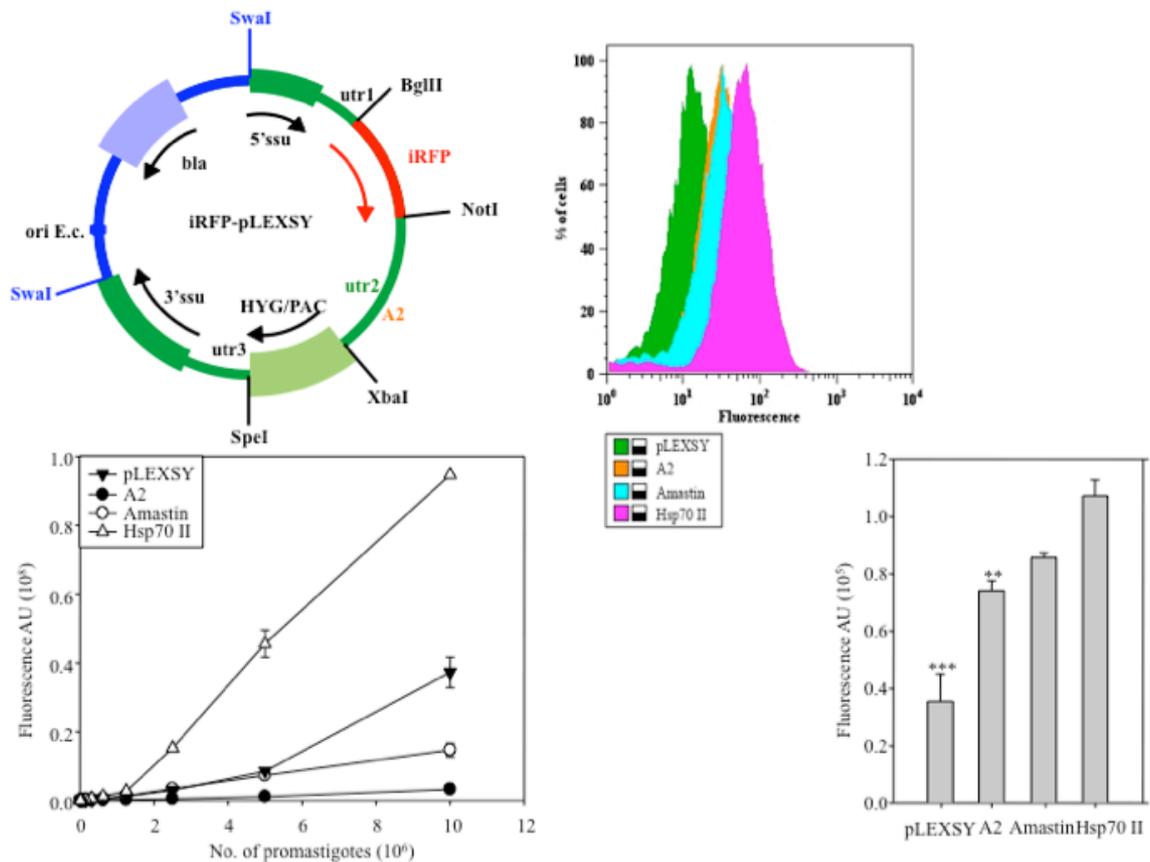


Figura 4.3. Efecto de las regiones intergénicas específicas de amastigotes en la emisión fluorescente infrarroja de *L. infantum*-iRFP. A) Esquema de la sustitución efectuada del promotor utr2 del vector de expresión pLEXSY por los 3'UTRs de los genes A2, AMASTIN y HSP70, corriente abajo de la ORF codificante de iRFP. B) Correlación entre la emisión fluorescente infrarroja emitida por los promastigotes logarítmicos de las cepas *L. infantum*-iRFP flanqueadas por la 3'UTR de A2 (▲), AMASTIN (○), HSP70 (●) o utr2 (△) en función del número de células. C) Análisis de citometría de flujo de amastigotes aislados de infecciones *in vitro* en monocitos THP-1 con *L. infantum*-iRFP expresados bajo la 3'UTR de A2 (área naranja), AMASTIN (área azul), HSP70 (área violeta) o utr2 (área verde) excitados con una longitud de onda de 650 nm. D) Emisión de los amastigotes aislados de una lesión de bazo de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*-iRFP que portaban las diferentes 3'UTR después de 5 semanas post-infección. Los valores se corresponden a la media \pm sd de tres experimentos realizados por separado.

La Fig. 4.3 D demuestra que la emisión de fluorescencia infrarroja fue siempre mayor en la cepa de *L. infantum*-iRFP en la que habíamos integrado el 3'UTR de *HSP70*, seguida de aquellas que recibieron los 3'UTR de los genes *A2* y *AMASTIN*, así como el *utr2* original procedente del plásmido pLEXY.

4.1.2. Caracterización del modelo murino de infección

Con el fin de establecer un modelo de leishmaniasis visceral con la cepa de *L. infantum*-iRFP que portaba la región intergénica de *HSP70*, procedimos a su caracterización a lo largo del curso de la infección en ratones BALB/c. Con este fin, infectamos por vía intraperitoneal diferentes grupos de ratones BALB/c con 1.5×10^9 promastigotes estacionarios. Transcurridas 1, 2, 3, 4 y 5 semanas después de la infección se sacrificaron los animales eutanásicamente, extrayéndose los bazo e hígados en condiciones de esterilidad para su posterior análisis.

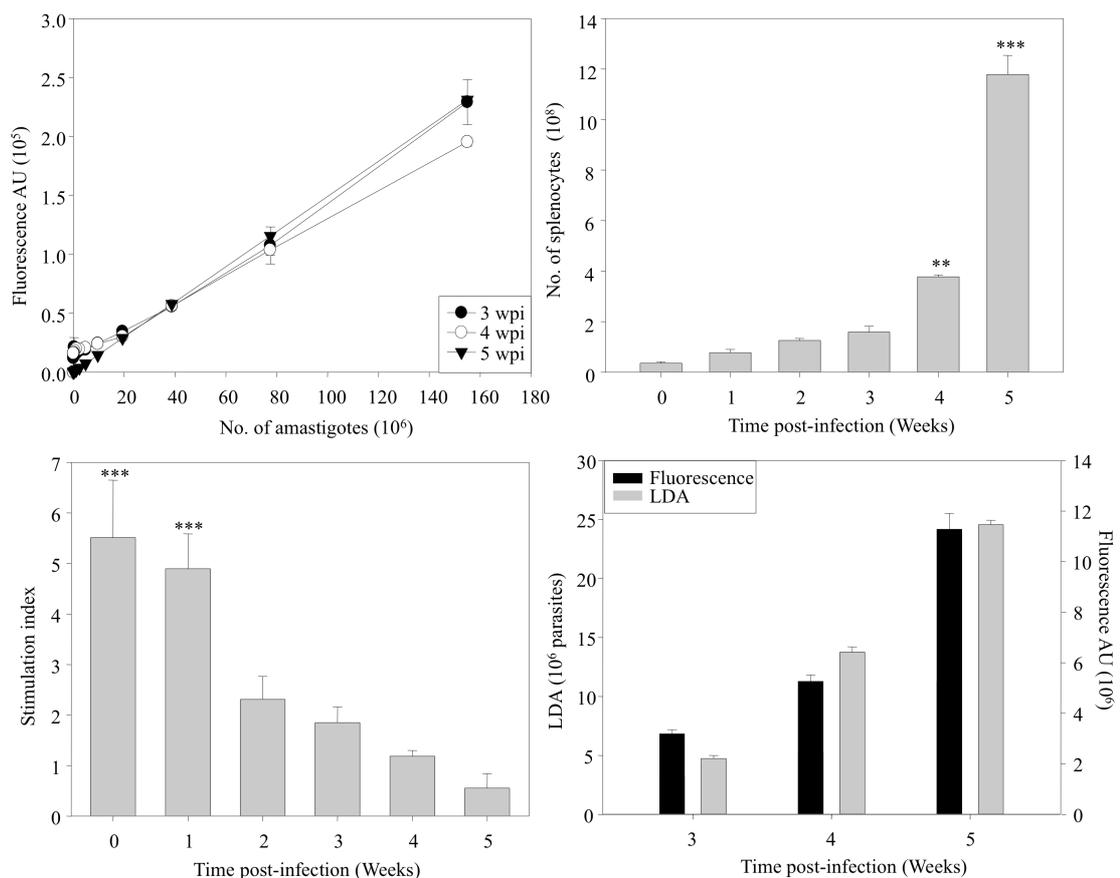


Figura 4.4. Puesta a punto del modelo de VL en ratones BALB/c infectados con promastigotes estacionarios de *L. infantum*-iRFP A) Curva estándar de correlación entre el número de amastigotes

aislados de lesión de bazo y la emisión fluorescente infrarroja emitida por los mismos después de 3, 4 y 5 semanas post-infección. B) Hiper celularidad estimada como el número total de esplenocitos procedentes de bazos murinos después de 1 a 5 semanas post-infección. C) Pérdida de respuesta a mitógenos por parte de los linfocitos T aislados de BALB/c bazos murinos después de 1 a 5 semanas post-infección tras la estimulación con mitógenos (ConA), comparadas con animales no infectados. D) Carga parasitaria de bazos infectados con *L. infantum*-iRFP a las 3, 4 y 5 semanas post-infección, medida mediante LDAU (barra gris) y emisión fluorescente (barra negra). Los valores se corresponden a la media \pm sd de tres experimentos realizados por separado. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; t de Student de dos colas).

A las 5 semanas post-infección se produjo un aumento drástico en el tamaño del bazo acompañado de un incremento en el número de esplenocitos – estimado en más de 10 veces respecto al de los animales no infectados – y estadísticamente significativo respecto a otros momentos de la infección anteriores (Fig. 4.4 B). La carga parasitaria de los órganos se estimó mediante ensayo de dilución límite y por la emisión de fluorescencia infrarroja de los amastigotes procedentes de 10 mg de suspensión celular de bazo (Fig. 4.4 C).

El tránsito de la progresión de la enfermedad hacia la forma grave – aunque no necesariamente mortal – se evaluó por la pérdida de la capacidad de respuesta a mitógenos de las células T (Fig. 4.4C). La adición de ConA a la suspensión de bazo enriquecida en células de la línea blanca produjo una estimulación 15 veces menor de la incorporación de [³H]-timidina al DNA en los ratones infectados después de 5 semanas con respecto a ratones control sin tratar. Por último, con objeto de poder cuantificar la carga parasitaria de los bazos mediante una simple lectura infrarroja en el sistema de detección de imágenes Odyssey[®] (LI-COR), se realizó una curva de calibrado estándar con amastigotes purificados a partir de bazos infectados procedentes de animales sacrificados las semanas 3, 4 y 5 post-infección (Fig. 4.4 A). No se observó una pérdida significativa de la fluorescencia de los amastigotes a lo largo de las cinco semanas de la infección como consecuencia de la integración del gen reportero en el locus del rRNA 18s de *L. infantum*.

En conclusión, se puede afirmar que el uso de esplenocitos infectados con *L. infantum*-iRFP después de 5 semanas post-infección en ausencia de antibióticos de selección, representa una estrategia eficiente para la evaluación *ex vivo* de la actividad leishmanicida de compuestos químicos en amastigotes que infectan

naturalmente las células del hospedador en un modelo de leishmaniasis visceral (Fig. 4.5).

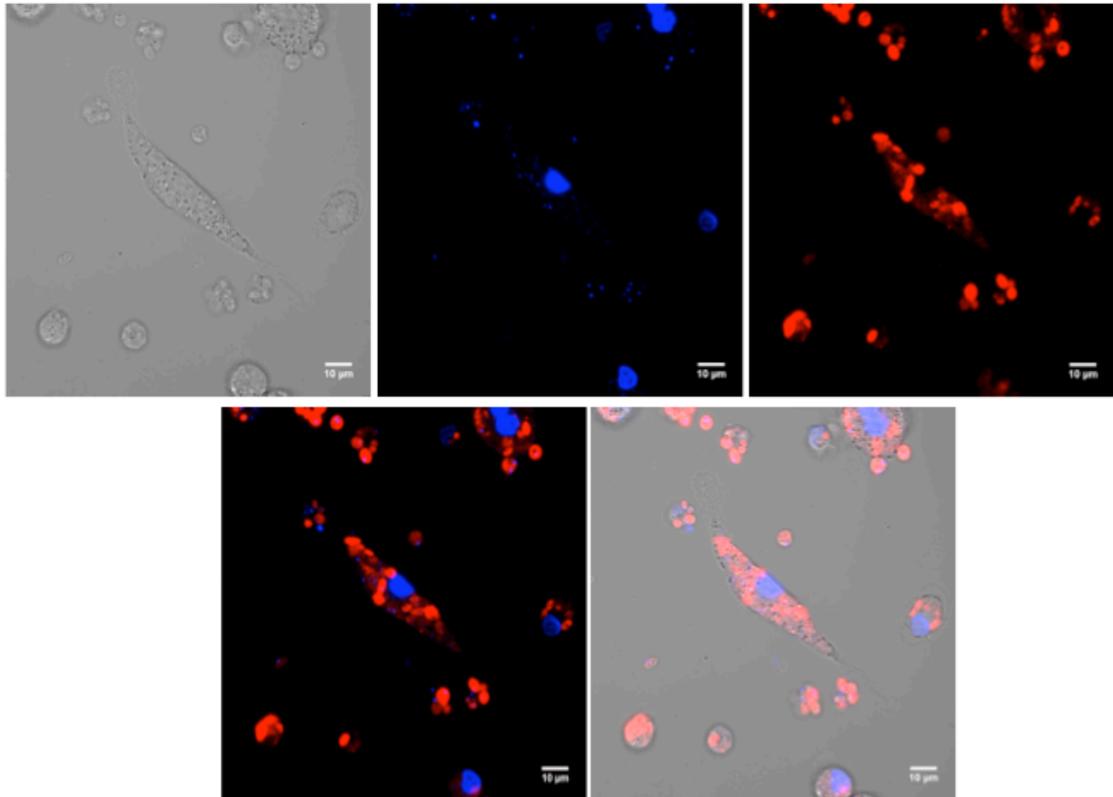


Figura 4.5. Microscopía confocal fluorescente de esplenocitos de bazo infectados con amastigotes *L. infantum*-iRFP procedentes de una infección experimental murina de 5 semanas. A) DIC. B) Tinción con DAPI. C) Emisión infrarroja por parte de los amastigotes *L. infantum*-iRFP. D) Combinación DAPI + fluorescencia infrarroja. E) Combinación A+B+C+D. Imágenes tomadas con un microscopio confocal Zeiss LSM710.

4.1.3. Establecimiento y optimización del modelo de esplenocitos infectados

Con el fin de evaluar y probar la actividad de fármacos leishmanicidas frente a la leishmaniasis visceral, hemos desarrollado un cultivo de explantes de bazos infectados con la cepa infrarroja *L. infantum*-iRFP. Este modelo tiene varias ventajas sobre otros métodos *in vitro* – promastigotes de vida libre, amastigotes axénicos e infecciones en macrófagos THP-1 – ya que incluye todos los tipos celulares implicados en la interacción parásito/hospedador en el órgano diana. Además, el sistema tiene otras ventajas adicionales: i) la replicación del parásito puede ser cuantificada fácilmente mediante el registro de la fluorescencia infrarroja

emitida por los amastigotes intracelulares; ii) el sistema permite la adaptación a una plataforma HTS con formato de 96 ó 384 pocillos.

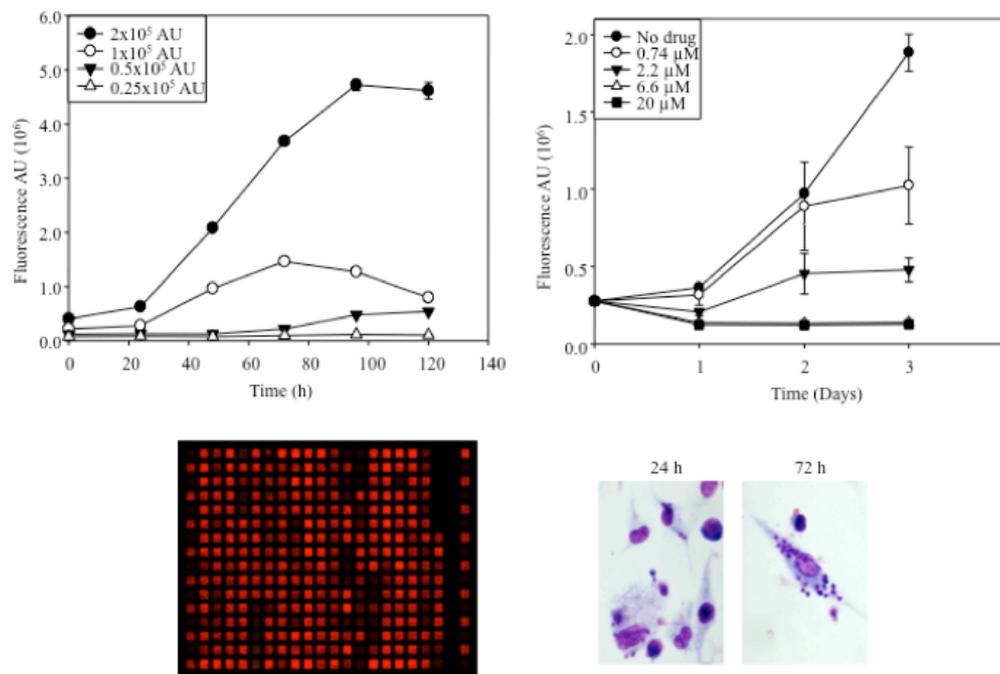


Figura 4.6. Establecimiento de los explantes esplénicos de ratón BALB/c infectados con amastigotes de *L. infantum-iRFP*. A) Replicación de los amastigotes dentro de los esplenocitos a diferentes densidades de siembra al comienzo del cultivo (●) 2×10^5 AU; (○) 1×10^5 AU; (▲) 0.5×10^5 AU and (△) 0.25×10^5 AU. La emisión fluorescente se registró diariamente durante 5 días. B) Efecto de la AmphB en los amastigotes intracelulares. A los esplenocitos infectados con amastigotes de una densidad de 2×10^5 AU se les añadieron distintas concentraciones de AmphB, registrándose la fluorescencia emitida diariamente a lo largo 72h. C) Imagen de una placa de 384 pocillos registrada por el dispositivo Odyssey (LI-COR). D) Tinción de Giemsa representativa de los esplenocitos infectados recogidos a las 24 y a las 72 h después de la siembra.

En primer lugar se procedió a registrar el rango dinámico de fluorescencia en el que se espera la replicación eficaz y cuantificable de los parásitos intracelulares dentro de los macrófagos. La Fig. 4.6 A muestra la capacidad proliferativa de los amastigotes dentro de los explantes en función del tiempo, respecto a las diferentes cantidades de esplenocitos infectados sembrados en la placa que se correspondían con 0.25×10^5 , 0.50×10^5 , 1.0×10^5 y 2×10^5 unidades de fluorescencia infrarroja (UA). El seguimiento de la fluorescencia emitida por los cultivos durante 5 días muestra únicamente un incremento significativo en aquellos cultivos que se sembraron con 2×10^5 UA lo que indica una multiplicación continua

de los amastigotes dentro de la célula hospedadora. A continuación procedimos a establecer el grado de discriminación entre los pocillos control no tratados con respecto a los tratados con un fármaco leishmanicida de referencia: la AmphB. A los cultivos de esplenocitos sembrados con una densidad equivalente a 2×10^5 UA – establecidos en la Fig. 4.6 A – se añadieron concentraciones crecientes del fármaco equivalentes a 0, 0,74, 2,20, 6,60 y 20 μ M, respectivamente. La carga parasitaria se midió diariamente durante 72 h mediante la emisión de fluorescencia de infrarroja (Fig. 4.6 B).

Considerando que los pocillos no tratados permiten la proliferación adecuada de los amastigotes la reducción de la fluorescencia respecto a la concentración de fármaco administrada a un tiempo dado servirá de marcador de la actividad leishmanicida. La concentración más baja a la que se observa la muerte de los amastigotes se utilizó como medida de la actividad leishmanicida de la AmphB. Esta concentración se estimó entre 6,6 y 20 μ M, por lo que, en estas condiciones, el ensayo podría identificar compuestos que no sólo tienen actividad leishmanioestática sino también leishmanicida. Estos ensayos se realizaron en placas negras de 384 pocillos con fondo transparente que contienen los explantes tratados con diferentes concentraciones del mismo compuesto y en las que la intensidad de la fluorescencia infrarroja – transformada en una señal visible en rojo – reflejan la viabilidad de los amastigotes de cada pocillo.

Finalmente, con el fin de comprobar que la emisión infrarroja de los explantes se correspondía con amastigotes de *L. infantum*-iRFP que estaban parasitando macrófagos murinos, se realizó un estudio de microscopia confocal de las suspensiones esplénicas de ratones disecados a las 5 semanas post-infección. Se pudo observar una fuerte emisión de fluorescencia roja dentro de los macrófagos que se corresponde con los amastigotes de *L. infantum* ya que co-localizan con la fluorescencia azul del DAPI procedente de sus kinetoplastos (Fig. 4.6 D). Simultáneamente se realizó una tinción con Giemsa para determinar la carga parasitaria de los macrófagos después de 72 h, encontrándose una buena correlación entre ambos recuentos (datos no mostrados, Fig. 4.6 E).

4.1.4. Identificación de “hits” con actividad contra leishmanicida en un sistema HTS de esplenocitos murinos

Se utilizaron tres colecciones de compuestos – un total de 296 moléculas pequeñas – con estructuras derivadas de la indenoisoquinolina (colección 1), de la podofilotoxina (colección 2) y de la carbolina (colección 3). Estos compuestos se ensayaron a concentración única en placas de 384 pocillos sembradas con explantes de bazo obtenidos de ratones BALB/c infectados la cepa de *L. infantum*-iRFP después de 5 semanas post-infección.

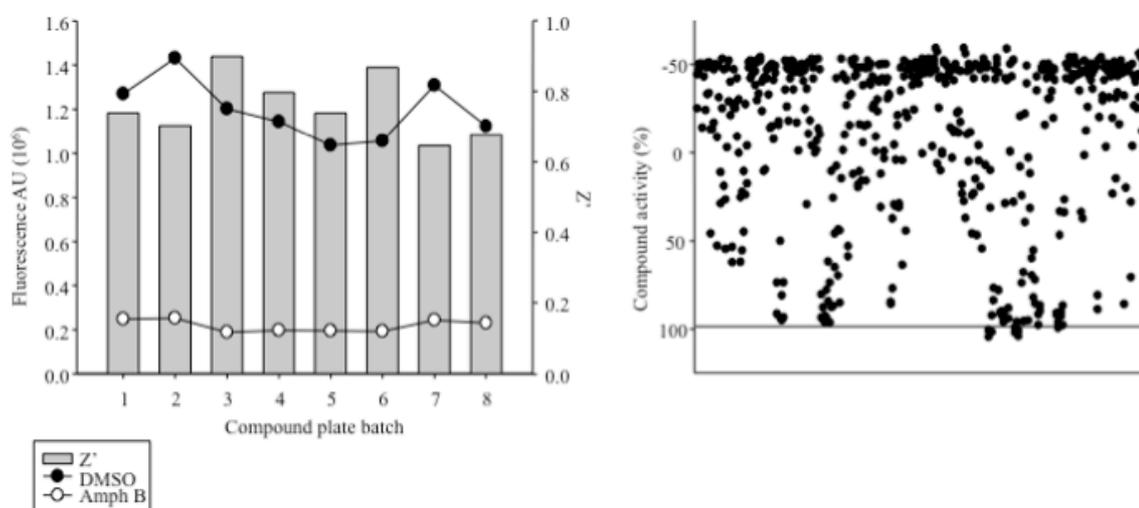


Figura 4.7. Identificación de “hits” de 296 compuestos procedentes de tres colecciones de moléculas pequeñas en la plataforma HTS fenotípica de explantes esplénicos murinos infectados con *L. infantum*-iRFP. A) Reproducibilidad del método con controles negativos (0.42% DMSO) y positivos (10 μM anfotericina). Las barras representan el cálculo del factor Z' (Z' eje de ordenadas) de cada placa control. B) Distribución relativa de la fluorescencia infrarroja de los 296 compuestos en función de su actividad leishmanicida; la línea roja representa el lugar de corte para discriminar un “hit”.

Para la validación del ensayo se utilizó el mismo formato de placa todos los días que comprendía una "placa de cribado" donde se distribuían todas las moléculas que querían ser analizadas a concentración única y una "placa control" que contenía el fármaco control AmphB (control positivo) y DMSO (control negativo) en forma de columnas alternas. Para minimizar el efecto borde (filas y columnas) que podía afectar a la homogeneidad de los ensayos debido a la evaporación de los pocillos exteriores, se llenaron con agua estéril las columnas 1 y 24 de las placas de cribado y control. Los compuestos a analizar se dispensaron en

las columnas 2 a 23 de las “placas de cribado” a partir de soluciones “stock” (200 μM en medio de cultivo completo y esterilizado por filtración) a la concentración única de 10 μM y se incubaron durante un periodo de 72h a 37 °C.

La capacidad leishmanicida de cada compuesto se calculó como el porcentaje de inhibición con respecto a los controles negativos. Las placas de control positivo y negativo se utilizaron para normalizar la capacidad leishmanicida del compuesto en relación con cualquier variación de placa a placa y para determinar la relación señal/ruido del ensayo. Además, las “placas control” se utilizaron estas para calcular el factor Z' que mide la reproducibilidad y la calidad del ensayo y es necesario para su optimización y validación. El factor de Z' se calculó según la fórmula:

$$Z' = [(\text{controles positivos } 3\text{sd} + 3\text{sd } \text{controles negativos}) / (\text{media de los controles positivos} - \text{media de los controles negativos})]$$

El ensayo mostró una excelente discriminación entre los controles positivos y negativos con un factor Z' > 0,5 en todos los análisis efectuados. El umbral para la selección de “hits” se estableció como la media de los controles positivos más dos veces la desviación estándar. La Fig. 4.7 A muestra la reproducibilidad del ensayo obtenido mediante el uso de “placas de control”, con un Z' promedio de 0,75. De los 296 compuestos cribados procedentes de las tres colecciones ensayadas, se encontraron – bajo las anteriores condiciones de astringencia – 29 “hits” primarios de las distintas colecciones de moléculas pequeñas que representa la distribución de los medicamentos de acuerdo con su actividad normalizada; la línea muestra el umbral de selección de “hit”.

Los resultados del análisis de “hits” se resumen en la Tabla 4.1, donde se muestran aquellos compuestos que a una dosis única de 10 μM produjeron una reducción de la emisión de fluorescencia infrarroja en más del 90% tomando un valor de Z' promedio > 0,75.

Tabla 4.1. Resultado del análisis de “hits” en explantes esplénicos infectados con *L. infantum*-iRFP clasificados por familias de compuestos.

Familia	Nº	Compuesto	Ensayo 1 Z' 0.56	Ensayo 2 Z' 0.63	Ensayo 3 Z' 0.54
Podofilotoxinas	64	JAP - 106	92	74	63
	61	JAM - 416	95	81	64
	60	JAP - 107	96	74	-
	66	JAP - 114	94	78	66
	67	JAM - 463	96	93	74
	68	JAM - 422	95	88	-
	69	JAP - 116	94	81	-
	96	JAP - 101	97	74	74
Indenoisoquinolinas	180	MC-2-8	94	88	77
	183	AM-8-3	96	91	82
	184	TN-1-75	90	93	-
	185	TN-1-65	91	91	76
	189	AM-10-57	77	84	87
	190	AM-14-32	102	73	93
	192	AM-10-30	105	101	101
	193	TN-1-62	90	87	87
	194	AM-14-7	98	92	92
	196	AM-14-19	86	72	72
	198	AM-12-13	60	70	70
	203	EK-5-74	96	68	68
	206	AM-14-67	104	100	-
	207	AM-14-58	100	96	-
	208	AM-12-21	102	99	-
	211	AM-14-21	98	87	85
212	AM-14-9	90	93	86	
214	AM-4-42	100	97	92	
Carbolinas	284	S-281	-	76	77
	276	S-266	-	75	56
	289	S-287	-	80	66

4.2. EFICACIA LEISHMANICIDA DE LAS INDENOISOQUINOLINAS

Los resultados de la Tabla 4.1. demuestran que de las tres familias de compuestos analizadas, 29 de los 296 analizados (9,7 %) redujeron significativamente la viabilidad de los amastigotes de *L. infantum*-iRFP a una concentración fija de 10 μ M. De ellos, 18 (6,1 % del total) tenían estructura indenoisoquinolínica. Estos resultados nos demuestran la potencia intrínseca de estos compuestos como posibles leishmanicidas.

Para determinar el efecto leishmanicida real de dichos compuestos se realizaron ensayos dosis-respuesta, con las distintos grupos de indenoisoquinolinas, utilizando la emisión de fluorescencia infrarroja emitida por los explantes infectados a las 48 h de exposición. Dichos compuestos se han clasificado considerando los radicales sustituidos dentro de su estructura química, obteniéndose así 7 series diferentes. Seguidamente se muestran los valores de CI_{50} de los distintos derivados. Las curvas dosis-respuesta obtenidas mediante ajustes no lineales con el paquete informático Sigma Plot 10.0 quedan recogidas en el ANEXO II, al final de la Memoria.

Tras el cálculo de las CI_{50} de los compuestos en explantes murinos infectados con *L. infantum*-iRFP, se procedió a realizar curvas dosis-respuesta en esplenocitos murinos no infectados (Anexo III de la Memoria) con el fin de determinar el índice selectivo (IS) de las moléculas, definido como el cociente entre el valor de CI_{50} en esplenocitos murinos no infectados y el valor de CI_{50} en esplenocitos murinos infectados con *L. infantum*-iRFP. El IS es un parámetro de seguridad del compuesto químico. A diferencia de los fármacos antitumorales donde la potencia citocida es el parámetro de mayor interés desde un punto de vista farmacológico, para los compuestos antimicrobianos, es imprescindible determinar la toxicidad producida en el hospedador.

El IS (que tiene su representación en el índice terapéutico en los ensayos *in vivo*) es un número real que nos indica la selectividad del compuesto para destruir las células del patógeno sin provocar daño en las del hospedador. Los valores de CI_{50} en esplenocitos (amastigotes) y sus correspondientes IS de los distintos derivados se muestran en las Tablas: 4.2 a 4.8 de esta sección.

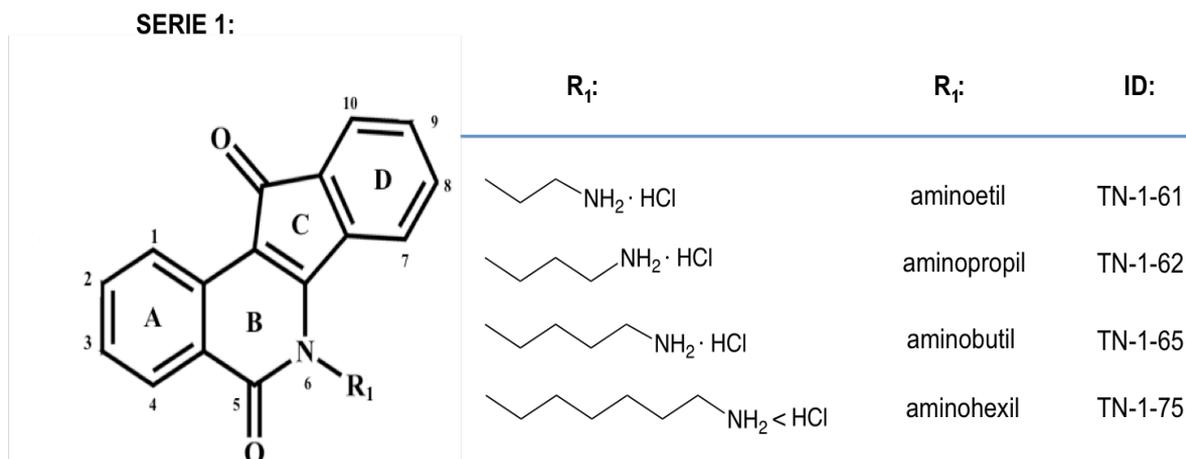


Tabla 4.2. Cálculo de Cl_{50} a las 48 h de los derivados indenoisoquinolínicos de la serie 1 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum-iRFP*. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en explantes no infectados. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	Cl_{50} (μ M) promastigotes	Cl_{50} (μ M) amastigotes	Cl_{50} (μ M) macrófagos	IS#
TN1-61*	0,94 \pm 0,03	0,04 \pm 0,09	1,10 \pm 0,06	24,4
TN1-62*	0,34 \pm 0,03	0,12 \pm 0,05	0,59 \pm 0,28	4,9
TN1-65*	0,43 \pm 0,08	0,73 \pm 0,42	2,11 \pm 0,22	2,9
TN1-75*	2,40 \pm 1,03	2,29 \pm 1,05	1,35 \pm 0,19	-
AM8-3*	0,24 \pm 0,06	1,12 \pm 0,27	0,61 \pm 0,02	-

(*) "hit" en el ensayo HTS

(#) calculado respecto a amastigotes

De los resultados de la Tabla 4.2 se desprende que 4 (1,5 % del total) de los compuestos de la serie fueron "hit" en el cribado HTS y todos ellos mostraron una fuerte actividad leishmanicida. El compuesto TN1-61, con un sustituyente aminoetilo en posición N₆ fue el más potente en términos de Cl_{50} , e igualmente el que mostró mayor IS (24,4). El IS de las moléculas disminuyó con la longitud de la cadena aminoalquílica sustituida en N₆ y fue de apenas 0,5 en el compuesto AM8-3

formado por dos indenoisoquinolinas unidas por un puente propilamino-propano en posición.

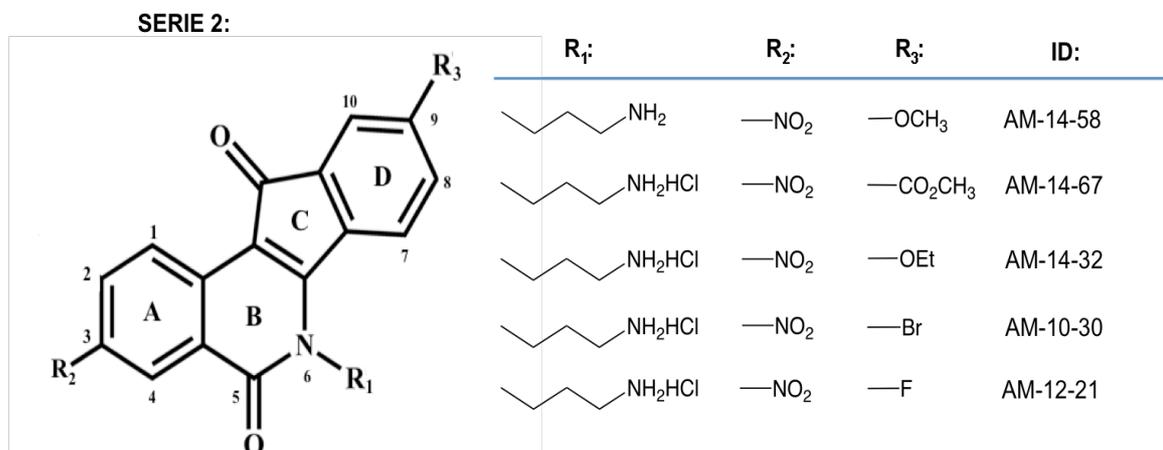


Tabla 4.3. Cálculo de Cl₅₀ a las 48 h de los derivados indenoisoquinolínicos de la serie 2 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum-iRFP*. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en macrófagos. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM) promastigotes	Cl ₅₀ (μM) amastigotes	Cl ₅₀ (μM) macrófagos	IS#
AM14-58*	0,20 ± 0,01	> 10	0,41 ± 0,19	-
AM14-32*	0,54 ± 0,05	0,08 ± 0,00	0,35 ± 0,03	4,4
AM14-67*	1,10 ± 0,07	0,14 ± 0,08	0,59 ± 0,02	4,2
AM12-21*	1,28 ± 0,08	0,04 ± 0,00	0,30 ± 0,07	8,4
AM10-30*	0,52 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,81 ± 0,09	6,2

(*) "hit" en el ensayo HTS

(#) calculado respecto a amastigotes

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de la serie 2 en los que se han introducido dos grupos funcionales nuevos sobre el compuesto TN1-62 (la indenoisoquinolina de referencia con un sustituyente aminopropilo en posición N₆): un grupo NO₂ en posición 3 y un grupo variable en posición 9. En primer lugar encontramos que todos los compuestos de la serie fueron "hit" en el cribado HTS (1,7% del total) y todos ellos mostraron una fuerte actividad leishmanicida

semejante a la de TN1-62. De la misma manera que el compuesto de cabecera los valores de IS apenas variaron, con excepción de los compuestos AM12-21 y AM10-30, con halógenos (Br y F, respectivamente) en posición 9, que poseen IS de 8,4 y 6,2. Se puede afirmar, que las sustituciones en estas dos posiciones no suponen una mejoría sustancial en el perfil farmacológico de estos compuestos.

SERIE 3:

R ₁ :	R ₂ :	R ₃ :	ID:
	—NO ₂	H	AM-14-7
	—NO ₂	H	AM-10-63
	—NO ₂	H	AM-10-57
	—NO ₂	—OCH ₃	AM-14-21
	—NO ₂	—OCH ₃	AM-14-16
	—NO ₂	—OCH ₃	AM-14-19
	—NO ₂	—OCH ₃	AM-14-9
	—NO ₂	—F	AM-11-80
	—NO ₂	—I	AM-12-13

En la Tabla 4.4 se recogen los resultados del grupo 3 en los que se han introducido tres grupos funcionales distintos – un grupo NO₂ en posición 3, de la misma manera que los derivados del grupo 2; en posición 9 se ha introducido un grupo metoxi o bien un halógeno (F, I), y finalmente el grupo aminopropilo en posición N₆ del farmacóforo, ha sido sustituido por grupos hidroxietilaminopropil (compuesto AM14-7), dimetilaminopropil (compuesto AM14-21), morfolinopropil (compuestos AM10-63 y AM14-16) e imidazolil-propil (compuestos AM10-57 y AM14-19). Además, en esta posición se han realizado tres sustituciones adicionales: un grupo yodopropilo (compuesto AM14-9), un grupo bromopropilo (compuesto A12-13) y finalmente un grupo azidopropil (AM11-80).

De la observación de los resultados de la Tabla 4.4 se desprende que 5 compuestos de la serie fueron "hit" en el cribado HTS (1,7 % del total) con una potente actividad leishmanicida.

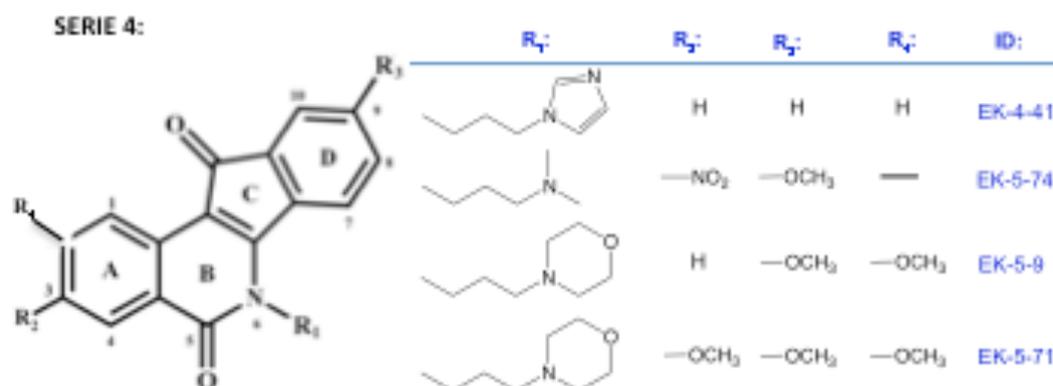
Tabla 4.4. Cálculo de CI_{50} a las 48 h de los derivados indenoisoquinolínicos de la serie 3 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum-iRFP*. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en macrófagos. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	CI_{50} (μ M) promastigotes	CI_{50} (μ M) amastigotes	CI_{50} (μ M) macrófagos	IS#
AM14-7*	1,45 \pm 0,06	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	1
AM10-63	> 10	0,60 \pm 0,42	17,99 \pm 5,30	30
AM10-57*	0,45 \pm 0,15	0,06 \pm 0,02	0,71 \pm 0,15	11
AM14-21*	0,17 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	0,30 \pm 0,09	15
AM14-16	> 10	1,86 \pm 0,29	0,59 \pm 0,08	-
AM14-19*	> 10	0,01 \pm 0,00	0,33 \pm 0,05	33
AM14-9*	1,17 \pm 0,29	0,06 \pm 0,00	0,26 \pm 0,06	4,3
AM11-80	1,40 \pm 0,14	0,04 \pm 0,00	0,34 \pm 0,15	7,8
AM12-13*	> 10	0,58 \pm 0,08	4,87 \pm 2,11	8,3

(*) "hit" en el ensayo HTS

(#) calculado respecto a amastigotes

Los compuestos con una sustitución imidazolil-propil en posición N_6 (compuestos AM10-57 y AM14-19) fueron significativamente más potentes que el compuesto de cabecera TN1-62, con valores de CI_{50} entre 10 y 60 nM. En este orden de potencia se encontró el compuesto AM14-9 con un grupo yodopropilo sustituido en posición N_6 . Lo que si produjo una mejoría sustancial de la sustitución en N_6 , fue el valor de IS. Los compuestos con un sustituyente imidazolil-propil fueron más seguros, con IS > 30. Se puede afirmar, que las sustituciones del grupo aminopropil por radicales imidazolil-propil suponen una mejoría sustancial en el perfil farmacológico de estos compuestos, no así la presencia del grupo morfolinopropil en semejante posición.



La Tabla 4.5 resume los resultados obtenidos con los compuestos de la serie 4 en los que la mayor modificación supone la sustitución del fenilo del grupo indeno por una piridina. A partir de ahí se realizaron sustituciones en las posiciones R₁ a R₄ que se muestran a continuación.

Tabla 4.5. Cálculo de Cl₅₀ a las 48 h de los derivados piridinoisoquinolínicos de la serie 4 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum*-iRFP. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en explantes no infectados. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM) promastigotes	Cl ₅₀ (μM) amastigotes	Cl ₅₀ (μM) macrófagos	IS#
EK4-41	2,89 ± 0,14	0,59 ± 0,60	2,40 ± 0,35	4,1
EK5-74*	0,33 ± 0,03	0,14 ± 0,08	0,63 ± 0,70	4,5
EK5-71	0,53 ± 0,07	0,13 ± 0,01	3,81 ± 0,51	29
EK5-9	2,92 ± 0,44	0,27 ± 0,08	7,84 ± 0,77	28

(*) "hit" en el ensayo HTS

(#) calculado respecto a amastigotes

En posición N₆ se introdujeron grupos dimetilaminopropil (compuesto EK5-74), morfolinopropil (compuestos EK5-9 y EK5-71) e imidazolil-propil (compuesto EK4-41) mientras que los sustituyentes en las posiciones restantes eran grupos metoxi y NO₂ que ya habían sido estudiados. Se encontró un único "hit" (compuesto EK5-74) en el cribado HTS (0,3 % del total) con una fuerte actividad leishmanicida de orden semejante a la del compuesto TN1-62. Este compuesto tenía una

sustitución diaminopropilo en posición N₆ de la misma manera que el compuesto AM14-21 de la serie 3 (que también había mostrado buenas cualidades leishmanicidas). La única diferencia entre ambos radicó en la inclusión del heterociclo de piridina, lo cual mejoró sus características leishmanicidas. De la misma manera que el compuesto usado como referencia a lo largo del estudio (compuesto TN1-62) el IS apenas varió (IS = 4,5).

SERIE 5:

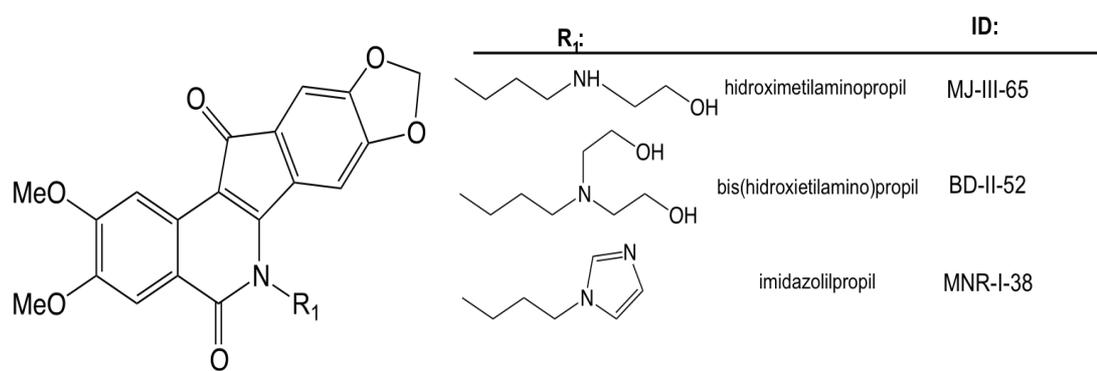


Tabla 4.5. Cálculo de Cl₅₀ a las 48 h de los derivados indenoisoquinolínicos de la serie 5 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum*-iRFP. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en explantes no infectados. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM) promastigotes	Cl ₅₀ (μM) amastigotes	Cl ₅₀ (μM) macrofagos	IS#
AM 4-42	0,06 ± 0,01	0,018 ± 0,008	0,05 0,01	2,8
MNR 1-38	1,85 ± 0,18	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00	3
DBII-52	0,38 ± 0,17	0,06 ± 0,07	0,22 ± 0,02	3,5
MJ III 65	>10	0,05 ± 0,04	0,56 ± 0,11	10

(#) calculado respecto a amastigotes

Los resultados con los tres derivados del 8,9-metilendioxi-5,12-dioxoindenoisoquinolinas de la Tabla 4.5 demuestran que sólo uno de ellos (compuesto

AM4-42) fue “hit” en el ensayo HTS (0,4% del total), pero que su IS era <1 lo que indicaba que su toxicidad era mayor para el macrófago que para los amastigotes.

SERIE 6:

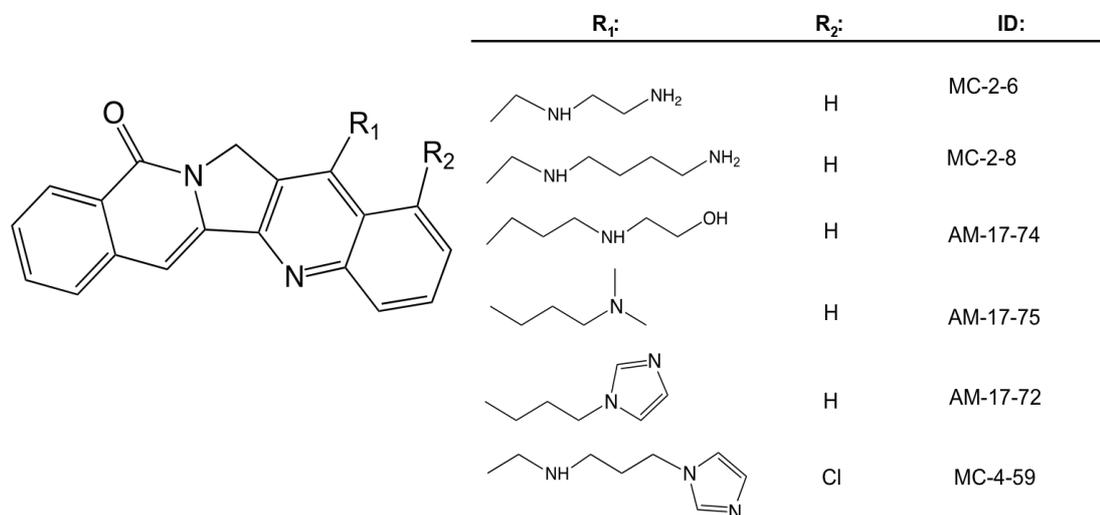


Tabla 4.6. Cálculo de CI_{50} a las 48 h de los derivados aromatecnicos de la serie 6 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum*-iRFP. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en explantes no infectados. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	CI_{50} (μ M) promastigotes	CI_{50} (μ M) amastigotes	CI_{50} (μ M) macrofagos	IS#
AM17-74	$4,99 \pm 0,31$	$0,99 \pm 1,17$	$4,96 \pm 0,52$	5
AM17-72	> 20	$0,44 \pm 0,03$	$2,31 \pm 0,72$	5,2
AM17-75	$6,27 \pm 0,70$	$0,45 \pm 0,14$	$4,41 \pm 1,07$	10
MC4-59	$3,33 \pm 0,17$	$0,19 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,12$	3,7
MC2-6	> 20	$0,81 \pm 0,05$	$2,17 \pm 0,27$	3,3
MC2-8*	$3,71 \pm 0,45$	$1,01 \pm 0,13$	$2,53 \pm 0,14$	2,5

(*) “hit” en el ensayo HTS

(#) calculado respecto a amastigotes

Este nuevo grupo de compuestos con estructura muy diferente a las indenoisoquinolinas, mostró dos estructuras que superaron el umbral de “hit” en el ensayo HTS. El compuesto AM14-7 con un sustituyente hidroxietilaminopropil en posición 14 tenía un efecto leishmanicida a una concentración de 120 nM pero era

fuertemente citocida (IS<1). Por su parte el compuesto MC2-8, con un sustituyente butanodiaminometil fue letal para los amastigotes de *Leishmania* a una concentración 1,01 μM , con un IS de 2,5.

SERIE 7:

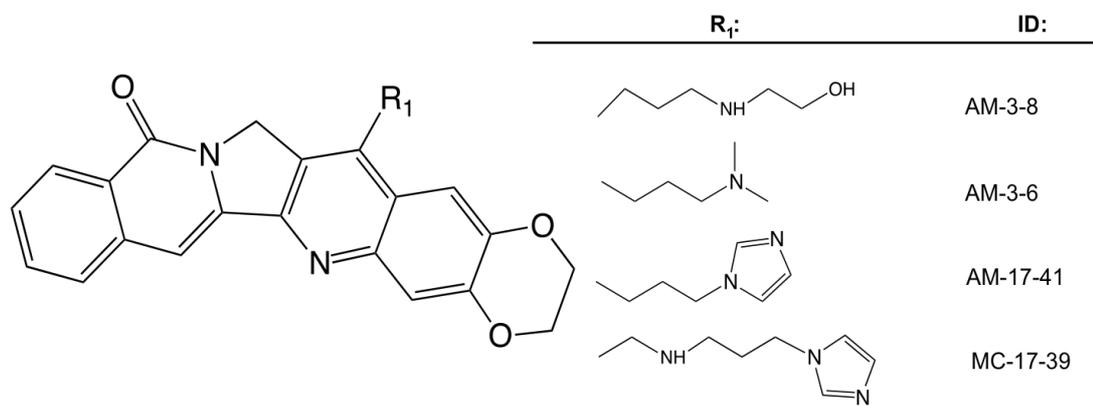


Tabla 4.7. Cálculo de Cl_{50} a las 48 h de los derivados aromatecnicos de la serie 7 en promastigotes y explantes murinos infectados con amastigotes *L. infantum*-iRFP. Los valores se han calculado a partir de las curvas dosis respuesta que figuran en el Anexo II y se comparan con la citotoxicidad en explantes no infectados. Los resultados representan el valor medio $x \pm \sigma$ de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Compuesto	Cl_{50} (μM) promastigotes	Cl_{50} (μM) amastigotes	Cl_{50} (μM) macrofagos	IS#
MC 3-8	$13,34 \pm 2,74$	$1,11 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,04$	0,3
MC 3-6	$3,03 \pm 0,45$	$0,37 \pm 0,03$	$3,04 \pm 1,06$	8
AM 17-41	$5,09 \pm 0,82$	$0,35 \pm 0,03$	$3,72 \pm 0,76$	10,6
AM17-39	> 20	$0,58 \pm 0,05$	$5,56 \pm 1,13$	9,3

(#) calculado respecto a amastigotes

El último grupo resultante de la adición de un anillo etilendideoxi a las estructuras anteriores, no mostró ningún compuesto con actividad leishmanicida relevante en los ensayos HTS.

A la vista de estos resultados se procedió a realizar un estudio de diana de todos los compuestos estudiados anteriormente, basada en su capacidad de inhibir la TopIB y producir rotura de doble cadena de DNA.

4.3. EXPRESIÓN DE LiTopIB EN LEVADURAS

La estructura de la TopIB de *Leishmania* spp. fue descrita en 2003 por nuestro laboratorio (Villa y col., 2003). La enzima funcional consiste en dos subunidades de diferente tamaño, una de 636 aminoácidos (masa molecular teórica de 73 kDa) codificada por el gen *LdTopIL*, situado en el cromosoma 34 y otra de 262 aminoácidos (masa molecular teórica de 28 kDa), codificada por el gen *LdTopIS* que se encuentra en el cromosoma 4 del genoma de *L. infantum*. Estas dos subunidades se pliegan y se asocian en el citoplasma en proporción 1:1 para reconstituir un heterodímero con actividad TopIB.

4.3.1. Obtención de TopIB recombinantes funcionales

Con el fin de tener una diana enzimática reproducible, preparamos un sistema heterólogo de producción de LiTopIB y de su homóloga humana en levaduras. A consecuencia de su naturaleza heterodimérica, LiTopIB se clonó en el vector bistrónico pESC-URA de expresión en levaduras. Este vector permitió introducir los dos genes constituyentes de LiTopIB y expresarlos de forma episomal en la cepa EKY3 de *S. cerevisiae* deficiente en TopIB. Se partió de la amplificación de ambos genes mediante PCR utilizando como molde DNA genómico de promastigotes de *L. infantum* con los cebadores correspondientes (Anexo I) que contenían los sitios de restricción de *BamHI* y *XhoI* (para expresar la subunidad grande) y *NotI* y *SpeI* (para expresar la subunidad pequeña). Los amplicones para ambos genes se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes así como el vector pESC-URA. El amplicón digerido que contenía el gen *LiTopIL* se clonó en el MCS que quedaba bajo el control del promotor GAL1. Por su parte el amplicón digerido que contenía el gen *LiTopIS* se clonó en el MCS que quedaba bajo el control del promotor GAL10. De esta forma se construyó el vector pESC-URA-LiTopIL-LiTopIS al que a partir de ahora nos referiremos como pESC-wt (Fig. 4.8).

Por su parte, *hTopIB* se expresó a partir del vector YCpGal1-hTop1 cuya ORF quedaba bajo el control del promotor inducible GAL1. Este vector fue creado por el Dr. Wang y amablemente cedido por la Dra. Paola Fiorani (Departamento de Biología Estructural, Universidad de Roma "Tor Vergata").

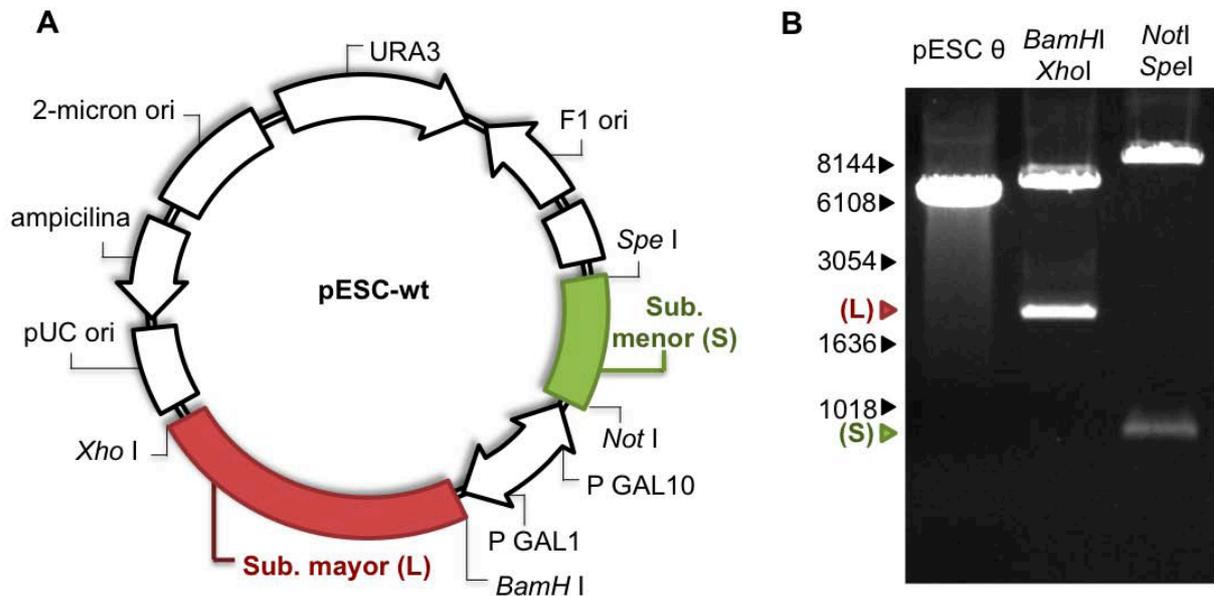


Figura 4.8. Clonado de los genes *LiTopIL* y *LiTopIS*. (A) Esquema del vector resultante de la inserción de los genes *LiTopL* y *LiTopS* en el vector de expresión para levaduras pESC-URA. (B) Gel de agarosa mostrando los tamaños obtenidos para los productos de la digestión del vector pESC-wt con los pares de enzimas *BamHI/XhoI* y *NotI/SpeI*, correspondientes a la subunidad grande y pequeña, respectivamente.

4.3.2. Expresión heteróloga de LiTopIB y purificación por cromatografía en columna

Las TopIB recombinantes humana y de *L. infantum*, tras su expresión y purificación, sirvieron para realizar el cribado de los derivados indenoisoquinolínicos estudiados en la presente Memoria.

Los extractos de levaduras EKY3 transformadas con el vector pESC-wt que sobreexpresan LiTopIB poseen la capacidad de relajar DNA superenrollado de la que carecía la cepa sin transformar. La purificación de la enzima se realizó mediante cromatografías de intercambio iónico e hidrofobicidad de la suspensión proteica precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para ello una colonia de EKY3 transformada con pESC-wt se inoculó en 1L de medio de cultivo URA- suplementado con glucosa al 2% (p/v). Tras 24 h de crecimiento, la glucosa fue eliminada del medio mediante la adición de rafinosa al 2% (p/v) para prevenir la represión de los promotores GAL1 y GAL10. Una vez que las células alcanzan una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ se añadió galactosa al 2% (p/v) para inducir los promotores y tras 6 h de incubación a 30 °C con agitación,

las células se centrifugaron y lavaron con PBS antes de preparar los extractos enzimáticos.

El precipitado de levaduras se resuspendió en PBS y se sometió a un ciclo de congelación/descongelación con N₂ líquido y posteriormente se destruyó con bolas de vidrio de 0,5 mm en frío, en presencia de inhibidores de proteasas (1x) (Roche) para evitar su degradación. El lisado obtenido se centrifugó a 3.000 x g y el sobrenadante se precipitó con (NH₄)₂SO₄ en un rango entre el 35 al 75% de saturación.

El precipitado del 75% de (NH₄)₂SO₄ del extracto de levaduras fue resuspendido en tampón suplementado con inhibidores de proteasas (1x), se purificó mediante dos procesos consecutivos de cromatografía de baja presión. El primero de ellos consistió en la elución a través de una matriz de intercambio iónico P11 de fosfocelulosa (Whatman). La elución se realizó mediante la aplicación de un gradiente ascendente discontinuo de KCl (de 0,2 a 1 M) y se recogieron alícuotas de 0,5 mL de cada una de las fracciones. Éstas fueron analizadas en ensayos de relajación de DNA superenrollado, comprobando que las fracciones más activas se correspondían con las que eluyeron con una concentración de 0,6M KCl. Las fracciones con actividad TopIB y sin actividad endonucleasa fueron sometidas a una segunda purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna empaquetada con una resina de Phenyl Sepharose CL-4B (Sigma/Aldrich). Después de aplicar un gradiente discontinuo de KCl (desde 0,2 a 1 M) se comprobó que las fracciones que poseían actividad TopIB eluían con una concentración de 0,4 M KCl. Una vez identificadas las fracciones se procedió a su concentración mediante ultrafiltración centrífuga con Amicon Ultra-4 50K (Millipore).

4.3.3. Caracterización de la actividad LiTopIB

Las actividad de relajación de ambas enzimas se expresó en Unidades de relajación (U/μL). Con el fin de determinar las unidades de enzima presentes en las muestras, se realizaron ensayos de relajación de DNA superenrollado añadiendo 0,5 μg de proteína total purificada y concentrada en diluciones seriadas 1/3 (Fig. 4.9). Como sustrato de la enzima se utilizaron 0,5 μg de DNA del vector pSK cuyo grado de superenrollamiento era al menos del 90%. Las diferentes diluciones de la

enzima se incubaron en presencia de este sustrato durante 30 min a 37°C. Finalizado este tiempo la reacción se paró con SDS y los diferentes topoisómeros se observaron mediante electroforesis en agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE, en los que los diferentes grados de superenrollamiento del DNA (topoisómeros) se separaron fácilmente los unos de los otros y se visualizaron con un solución de BrEt. Este procedimiento permitió definir la Unidad de relajación TopIB (U/ μ L) como la cantidad de enzima necesaria para relajar 0,5 μ g de DNA superenrollado en 30 min a 37°C. De esta manera se normalizaron todos los ensayos tanto de la enzima humana como de la de *Leishmania* realizados con proteínas recombinantes.

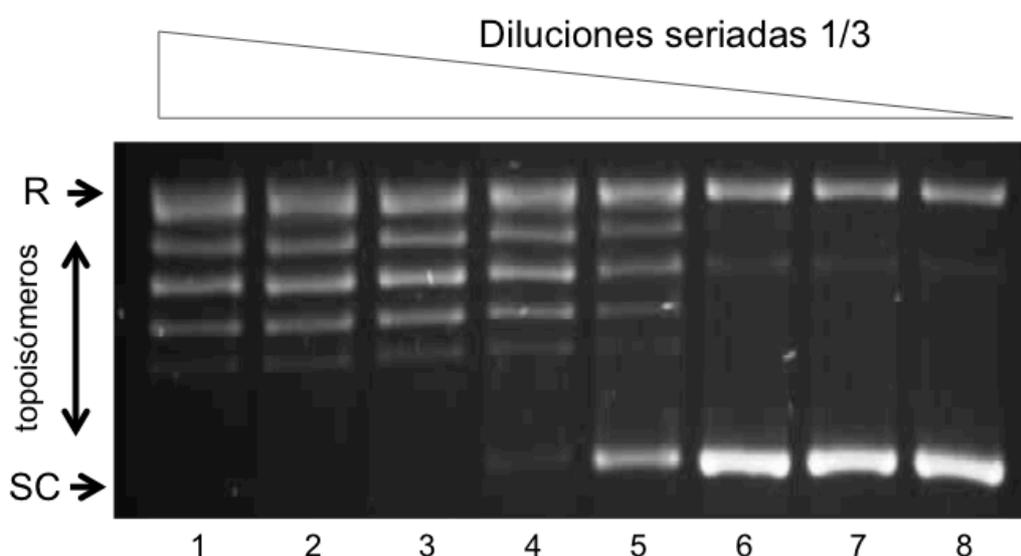


Figura 4.9. Ejemplo de cuantificación de la actividad de la relajación mediante diluciones seriadas 1/3. R: DNA relajado; SC: DNA superenrollado. Como criterio general se entiende que el DNA está totalmente relajado cuando no se encuentra presente la banda de DNA correspondiente al DNA SC.

4.3.4. Inhibición de la actividad de relajación y “cleavage”

En este Memoria hemos estudiado el efecto de 37 moléculas con estructura de indenoisoquinolina sobre la TopIB mediante un procedimiento sistemático de cribado. Además el efecto inhibitorio potencial de cada compuesto se ha estudiado en las enzimas recombinantes humana y de *Leishmania* con el fin de encontrar diferencias entre ambas que permitieran definir una selectividad ventajosa hacia la diana del patógeno.

El método utilizado para el estudio de la inhibición de la actividad de relajación de la TopIB por indenoisoquinolinas se basa en la estabilización transitoria de los complejos CL entre el DNA y la TopIB lo que provoca una ralentización del paso de religación. Esto permite estudiar con detalle los pasos concretos que conforman el proceso global de relajación. En el presente trabajo se decidió utilizar la CPT como fármaco de referencia, ya que es la molécula más estudiada y nuestro laboratorio tiene experiencia acumulada con este compuesto.

Para ello se incubaron 0,5 μg de DNA circular superenrollado en presencia de concentraciones crecientes de CPT (0,01 - 100 μM , en diluciones \log_{10}) en presencia de 1 U de cada una de las enzimas, de acuerdo las condiciones de ensayo descritas en Materiales y Métodos. En la Fig. 4.10 se muestra como la CPT era capaz de producir complejos CL con LiTopIB a partir de una concentración de 1 μM en las condiciones estándares de ensayo.

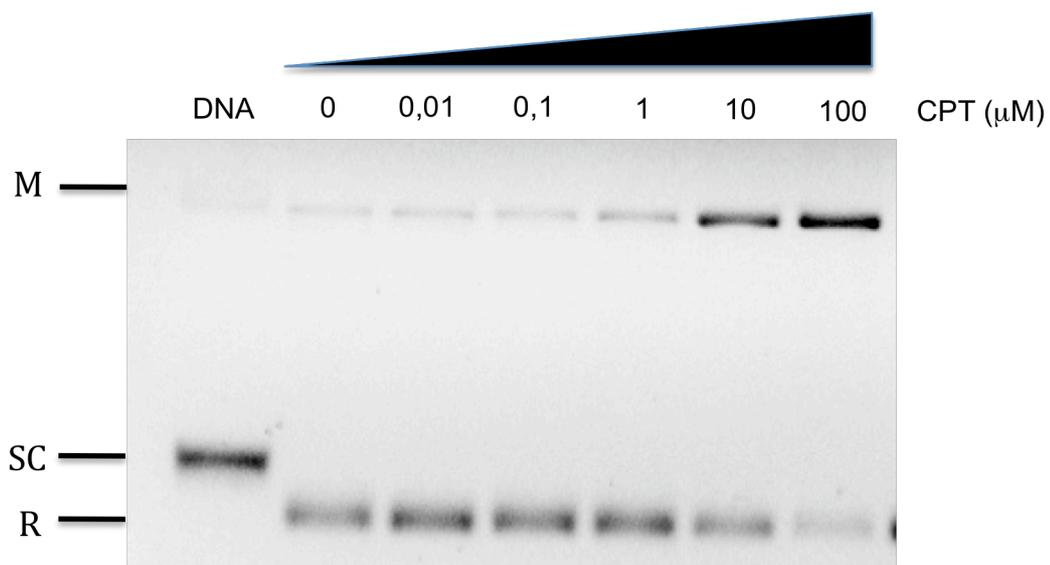


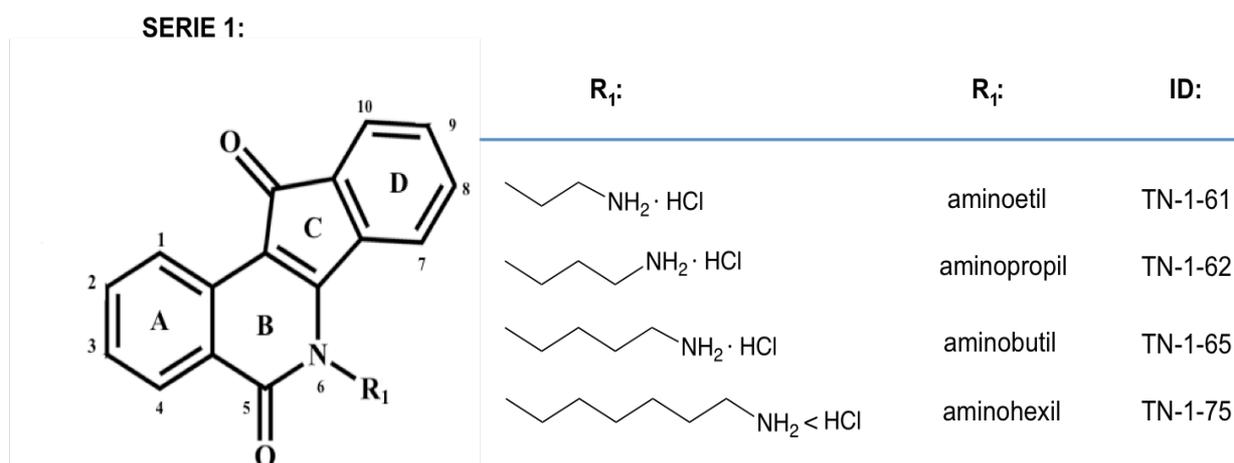
Figura 4.10. Formación de complejos CL a distintas concentraciones de CPT. Relación dosis/respuesta de la inhibición de la actividad LiTopIB: M: DNA mellado; Sc: DNA superenrollado; R: DNA relajado.

4.4. INHIBICIÓN DE LA LiTopIB POR INDENOISOQUINOLINAS

Se ha realizado un estudio sistemático de los compuestos con estructura indenoisoquinolínica sobre las TopIB recombinantes de origen humano y de *L. infantum*, con el fin de adjudicar un potencial mecanismo de acción a estas moléculas. Los resultados aparecen por series y se vuelven a incluir las estructuras de cada compuesto para el mejor seguimiento de este apartado.

4.4.1 Serie 1: derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (--) diona

La primera serie de compuestos consistía en derivados del núcleo de la isoquinolina-5-11 (--) diona, con sustituciones en el N₆ de cadenas aminoalquílicas de diferente longitud (aminoetil, aminopropil, aminobutil y aminohexil). Los compuestos analizados se muestran debajo.



A continuación se realizaron estudios dosis respuesta comparativos entre la enzima recombinante de *Leishmania* (panel izquierdo) con respecto a la humana (panel derecho), en un ensayo de inhibición de la relajación a diferentes concentraciones log₁₀ de cada compuesto en presencia de 1U/μL de cada enzima y 30 min de incubación.

Los gels de agarosa de la Fig. 4.11 muestran el efecto del compuesto TN1-61 (N-aminoetil derivado) sobre ambas enzimas. Mientras que hTopIB había perdido la capacidad de relajar el DNA superenrollado a una concentración de 10 μM, su homóloga LiTopIB estaba ya parcialmente inhibida a concentraciones inferiores a 1 μM en idénticas condiciones de ensayo.

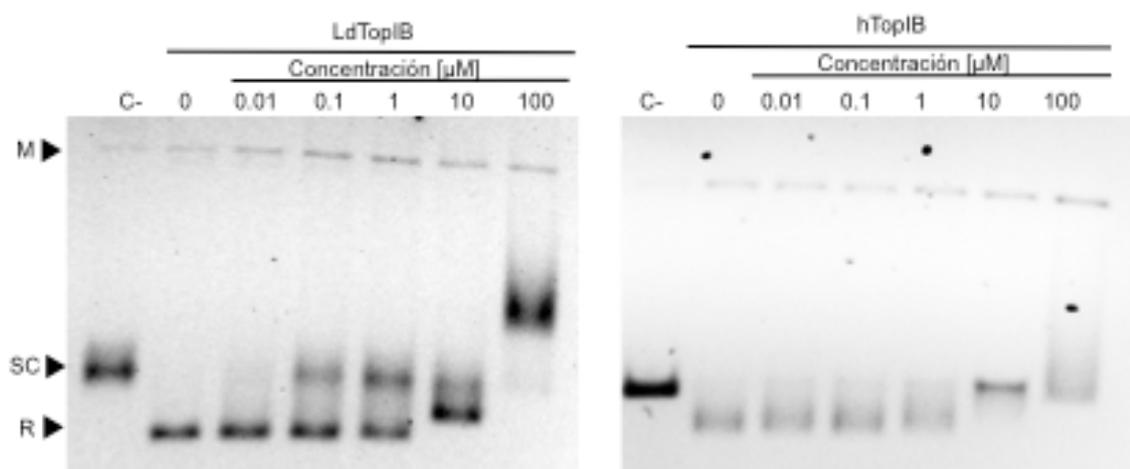


Fig. 4.11. Comparación de la inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) y humana (derecha) por TN1-61. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes de TN1-61 y 0,5 µg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C. R: DNA relajado; SC: DNA superenrollado; M: DNA mellado.

Esta mayor sensibilidad de LiTopIB se observó también para el compuesto TN1-62 que lleva sustituido un grupo aminopropilo en posición N₆ (Fig 4.12). En esta figura se puede observar que la inhibición de la LiTopIB comienza a partir de una concentración del compuesto inferior a 0,01 µM pero no con la enzima humana cuya sensibilidad no ha cambiado con respecto al compuesto anterior.

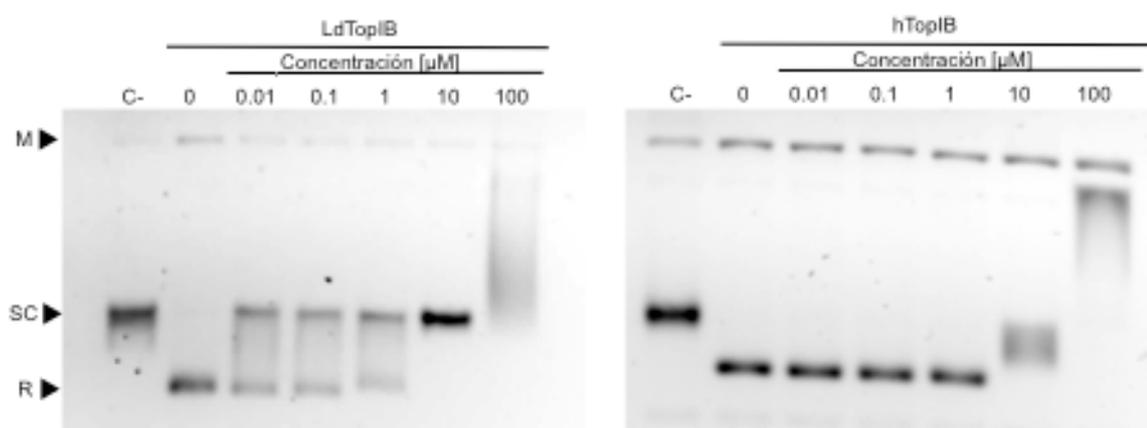


Fig. 4.12. Comparación de la inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) y humana (derecha) por TN1-62. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes de TN1-62 y 0,5 µg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Sin embargo, la prolongación de la cadena lateral comienza a tener efectos sobre la enzima humana donde la sustitución del grupo aminopropil en posición N₆ por un aminobutil (compuesto TN1-65) inhibió la relajación del DNA superenrollado a concentraciones mucho menores y cercanos a los de LiTopIB (Fig. 4.13).

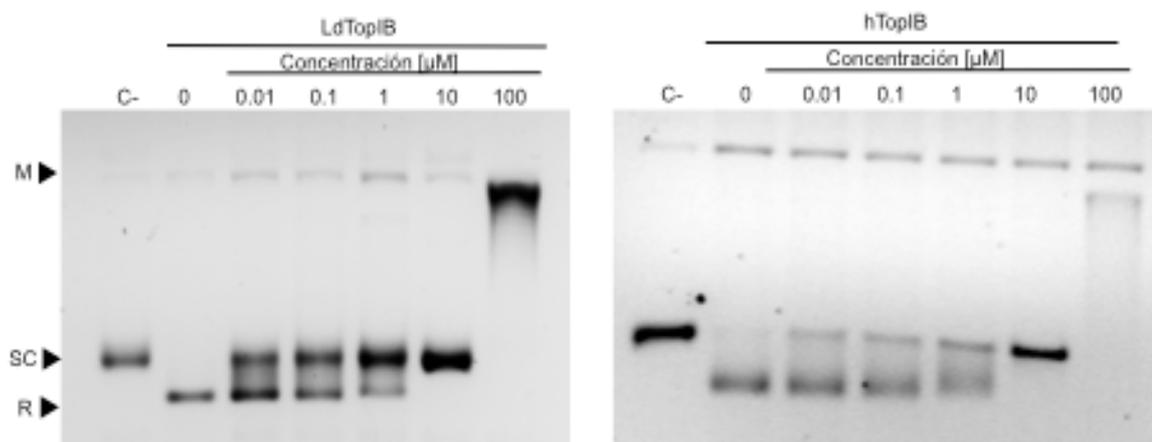


Fig. 4.13. Comparación de la inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) y humana (derecha) por TN1-65. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes de TN1-65 y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Con este compuesto realizamos un estudio de inhibición de la actividad de relajación LiTopIB a concentraciones submicromolares (Fig. 4.14) en el que se pudo observar que la IC₅₀ = 5 nM.

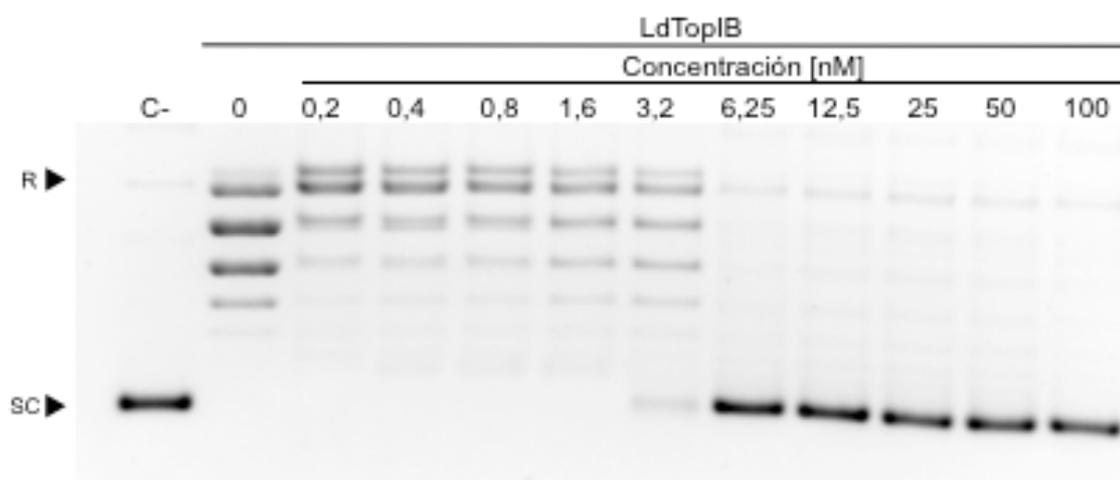


Fig. 4.14. Inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) por TN1-65. Se incubó 1U de LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes (rango nanomolar) de TN1-65 y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Finalmente, el sustituyente aminohexil en posición N₆ del compuesto TN1-75 originó un compuesto que perdía prácticamente la capacidad de inhibición de la relajación del DNA superenrollado de LiTopIB, resultando que su potencial inhibitorio era prácticamente el mismo que el de la enzima humana (Fig. 4.15).

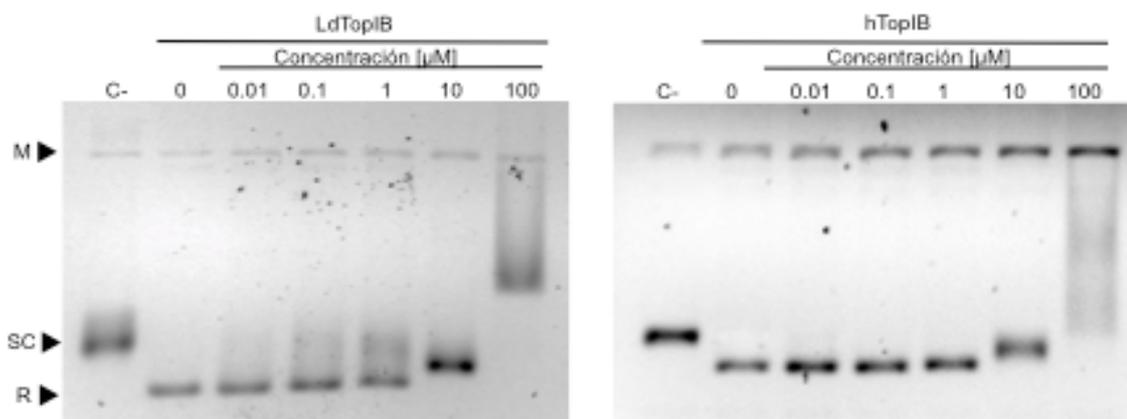


Fig. 4.15. Inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) y humana (derecha) por TN1-75. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de TN1-75 y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

El compuesto bis-1,3{(5,6-dihidro-5,11H-indeno[1,2-c]isoquinolina-6-propil-amino} propano (AM8-3), constituido por dos heterociclos indenoisoquinolinicos separados por una estructura bis-aminopolipropílica en posición N₆, se ha estudiado frente a ambas enzimas, dando los resultados de la Fig 4.16.

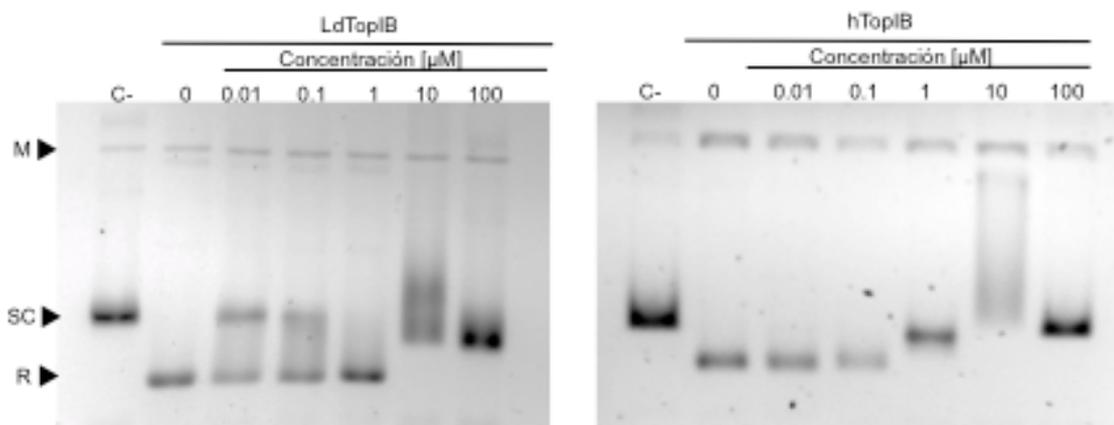


Fig. 4.16. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM8-3. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes de AM8-3 y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

El compuesto inhibió la relajación del DNA a concentraciones $< 0,1 \mu\text{M}$ frente a LiTopIB, pero no con la enzima humana que mantuvo su actividad hasta $1 \mu\text{M}$. Este compuesto podía tener un efecto bis-intercalante entre pares de bases adyacentes ya que fue necesario un tratamiento extra de la muestra para separar el compuesto del ADN antes de poder cargar las muestras en el gel de agarosa, según se observa en el ensayo de relajación de la Fig.4.17.

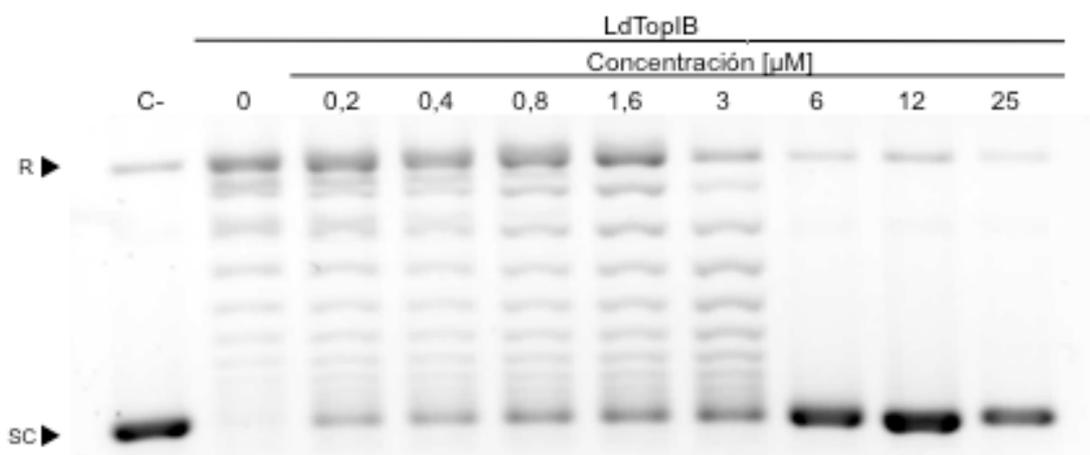


Fig. 4.17. Inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) por AM8-3. Se incubó 1U de LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes de AM8-3 y $0,5 \mu\text{g}$ de DNA pSK durante 30 min a 37°C .

4.4.2 Serie 2: 3-Nitro derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (--) diona

La serie 2 de compuestos derivados del núcleo de la isoquinolina 5-11 diona, resultó de introducir un grupo NO_2 en posición C_3 y un sustituyente halógeno (F, Br) o alquilo (metoxi, etoxi ó acetoxi) en posición C_9 al compuesto TN1-62 de la serie 1 que tenía un radical aminopropilo sustituido en N_6 . Todos los compuestos de esta serie fueron “hits” en el estudio HTS con una elevada potencia leishmanicida.

Los estudios dosis/respuesta comparados entre la enzima recombinante de *Leishmania* (panel izquierdo) con respecto a la humana (panel derecho), en un ensayo de inhibición de la relajación muestran, en primer lugar, el efecto del compuesto AM14-58 (3- NO_2 , 9- OCH_3) sobre ambas enzimas. Sorprendentemente, no se observaron cambios en la actividad de relajación en las dos enzimas salvo a

concentraciones superiores a 1 μM . Sin embargo, sí se pudo observar acumulación de DNA mellado dependiente de la concentración para ambas enzimas (Fig. 4.18).

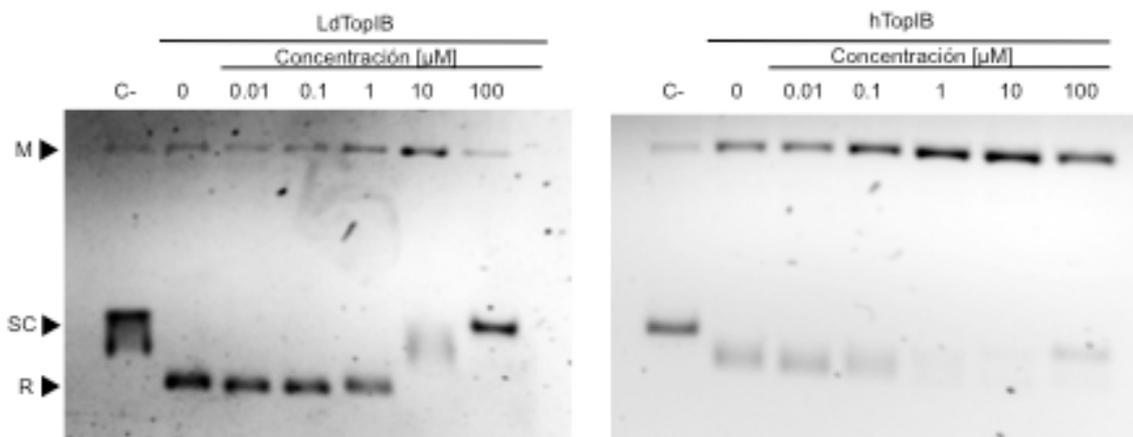


Fig. 4.18. Inhibición de la relajación de la TopIB de *Leishmania* (izquierda) y humana (derecha) por AM14-58. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

La pérdida de la capacidad inhibitoria de estos compuestos se observó también con los otros dos integrantes de la serie que tenían un grupo alquilo en C_9 . AM14-32, procedente de sustituir el grupo metoxi en C_9 por un grupo etoxi, careció igualmente de actividad inhibitoria por debajo de 1 μM . En este caso, la acumulación de DNA mellado sólo se observó con hTopIB a partir de 0,1 μM (Fig 4.19).

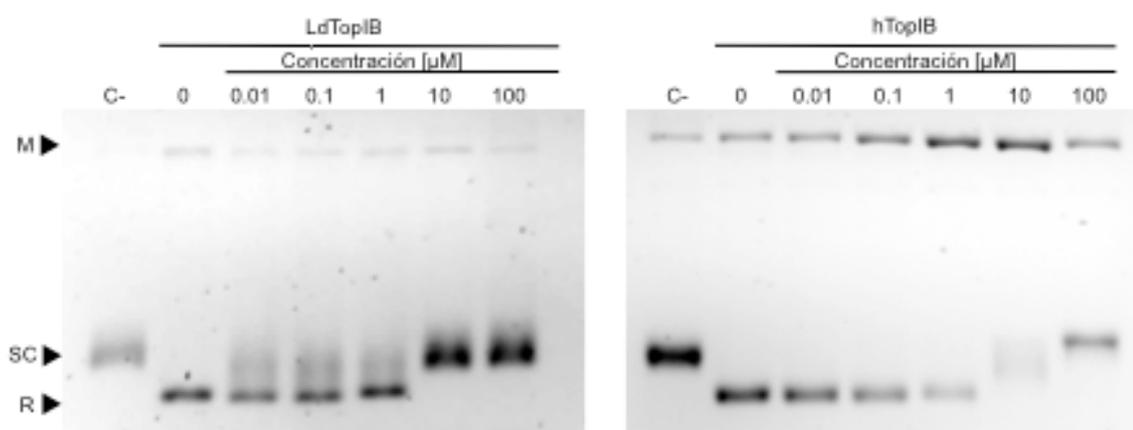


Fig. 4.19. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM14-32. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Un efecto semejante ocurrió con AM14-67 resultado de la sustitución del grupo metoxi por un acetoxi en C₉. En este caso no se observaron cambios en la actividad de relajación de la enzima pero sí un incremento de la banda de DNA mellado a partir de 1 μ M en LiTopIB y de 0,1 μ M en la enzima humana (Fig. 4.20).

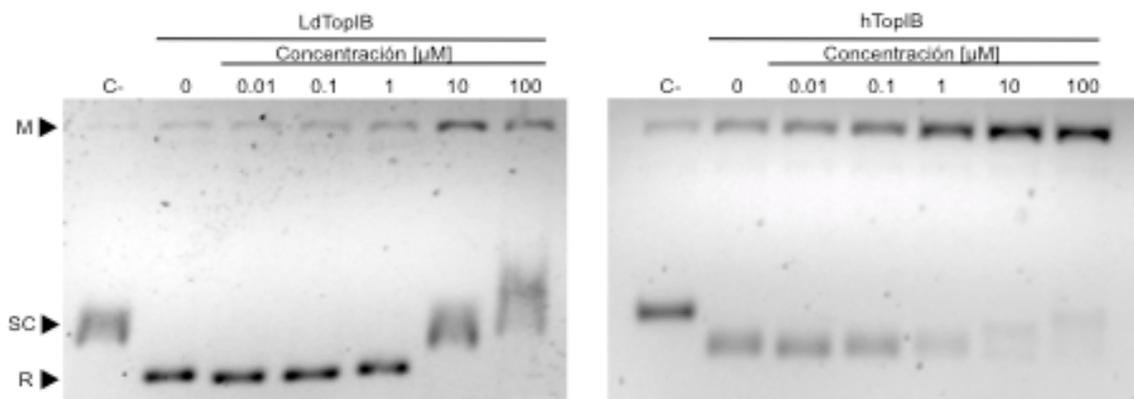


Fig. 4.20. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM14-67. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μ g de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

La situación cambia de forma significativa con los dos representantes del grupo con sustituyentes halógenos en posición C₉. El compuesto AM12-21, 3-NO₂ indenoisoquinolina con un átomo de F en posición C₉, originaba topoisómeros visibles a una concentración < 1 μ M cuando se incubaba con LiTopIB, y una acumulación evidente de DNA mellado con hTopIB a partir de 0,1 μ M (Fig 4.21).

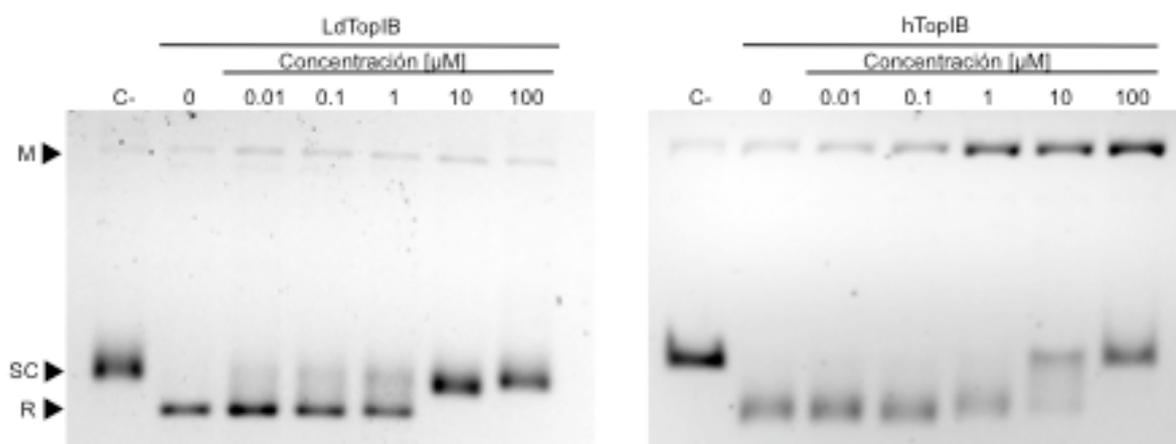


Fig. 4.21. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM14-32. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μ g de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Este efecto se evidenció aún más con el compuesto AM10-30 con un átomo de Br en posición C₉, cuyo efecto inhibitorio sobre LiTopIB apareció a concentraciones inferiores a 0,01 μM , y en la que se observaba un efecto selectivo sobre hTopIB, donde se observó acumulación de DNA mellado a partir de 0,1 μM (Fig. 4.22).

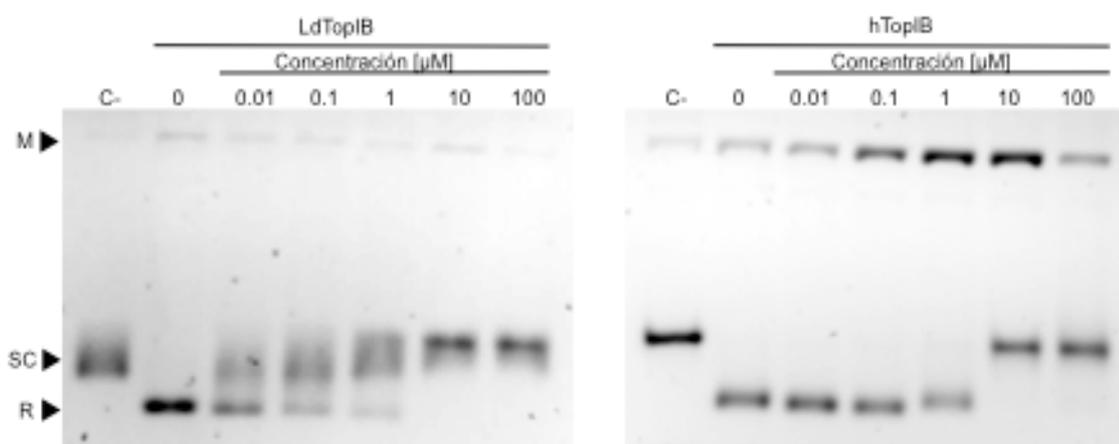


Fig. 4.22. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM10-30. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

4.4.3 Serie 3: 3-Nitro, 9-metoxi-derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (--) diona

La serie 3 de compuestos derivados del núcleo de la 3-NO₂, 9-OCH₃ indenoisoquinolina-5-11(--)diona estaba constituida por varios subgrupos de compuestos. En primer lugar, se estudió el papel de la sustitución de grupos dimetilaminopropil (compuesto AM14-21), morfolino-propil (compuesto AM14-16), imidazolil-propil (compuesto AM14-19) y yodopropil (compuesto AM14-9) en posición N₆ por el grupo aminopropil del compuesto TN1-62 que servía de referencia. Con excepción del compuesto AM14-16, todos ellos se habían revelado como “hits” en el cribado fenotípico HTS.

El compuesto AM14-21 (N₆-dimetilaminopropil) presentó un potente efecto inhibitorio de la hTopIB (Fig. 4.23, panel derecho) en la que se observaba que a concentraciones tan bajas como 0,01 μM , la enzima era incapaz de relajar DNA superenrollado. No ocurría lo mismo con la enzima de *Leishmania* (panel

izquierdo), donde el efecto no se observaba hasta concentraciones superiores a 1 μM . Igualmente, la acumulación de DNA mellado era mucho mayor y empezaba a concentraciones menores cuando se usaba la enzima humana.

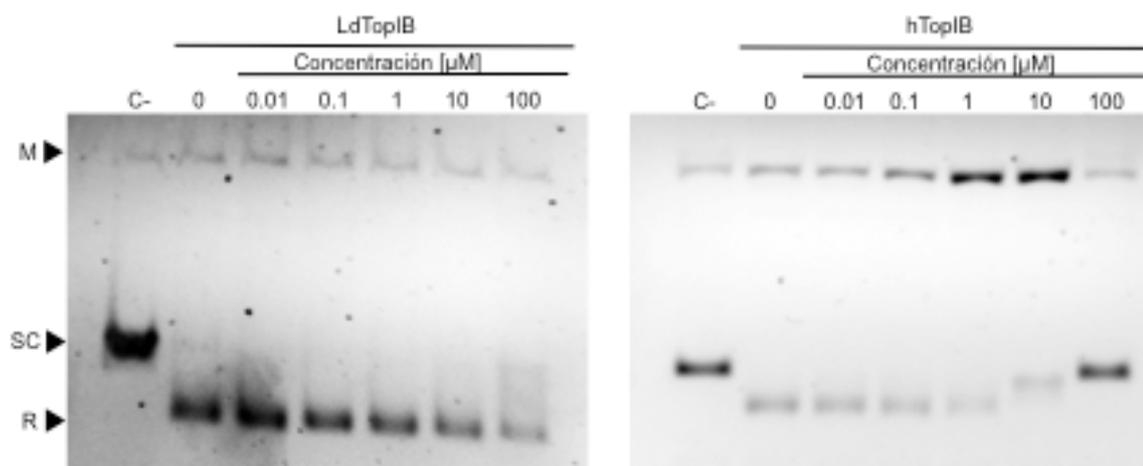
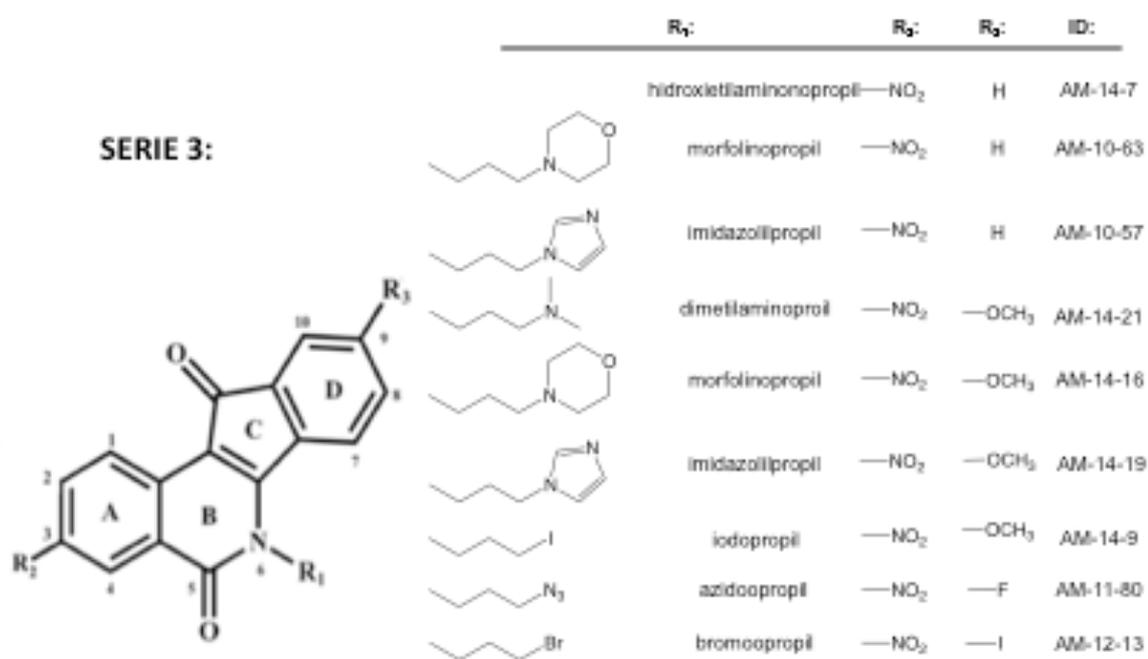


Fig. 4.23a. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM14-9. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

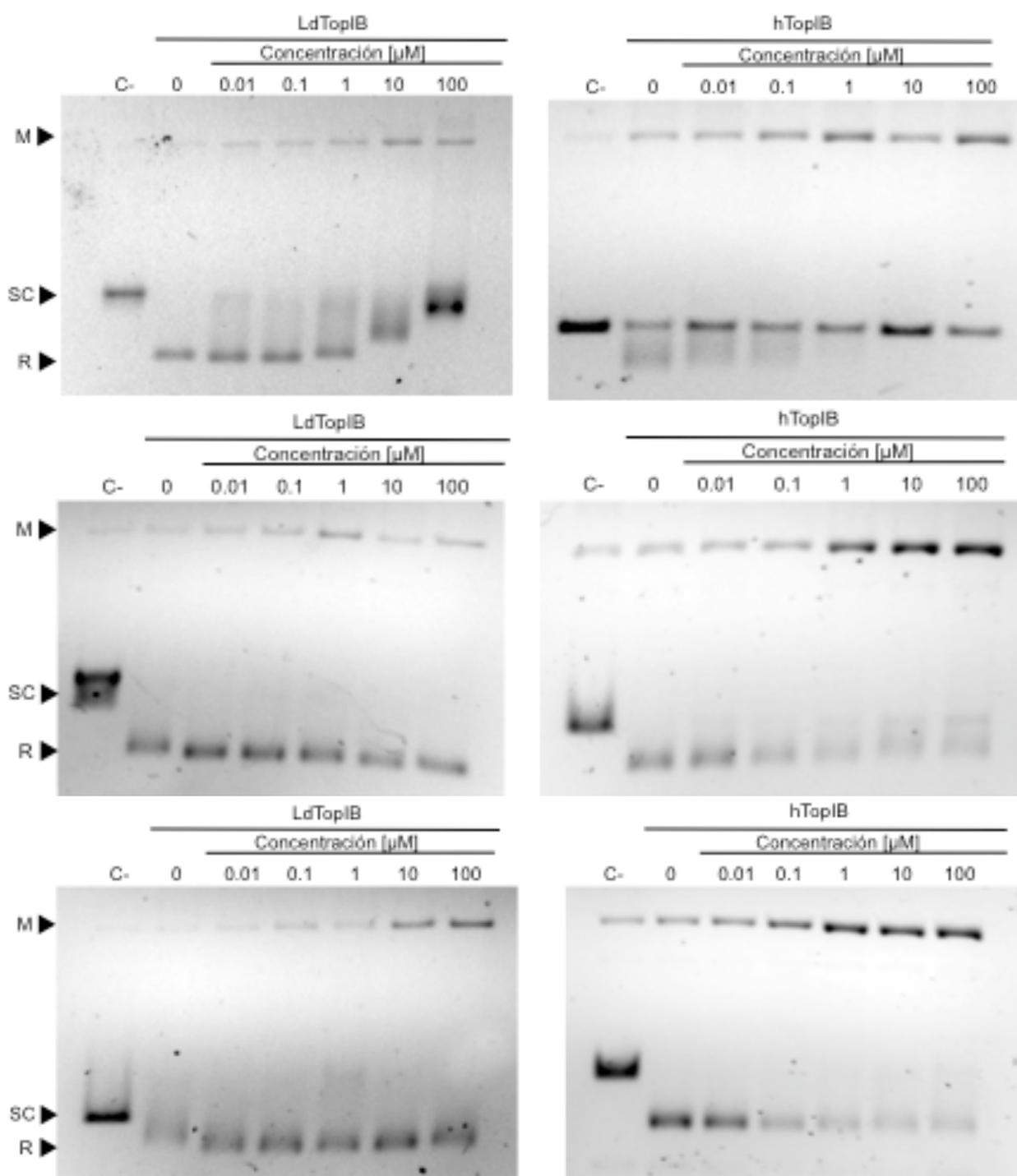


Fig. 4.23b. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM14-21 (panel de arriba), AM14-16 (panel de en medio) y AM14-19 (panel de abajo). Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Sorprendentemente, los compuestos AM14-16 (N_6 -morfolinoaminopropil), AM14-19 (N_6 -imidazolil-propil) y AM14-9 (N_6 -yodopropil) no mostraron una tendencia clara de inhibir la relajación de DNA superenrollado a las concentraciones estudiadas (Figs. 4.23a y b), aunque sí se pudo observar en los tres casos cómo se producía una clara acumulación de DNA mellado a partir de 0,1 μ M con la enzima humana.

Un segundo subgrupo de esta serie consistía en derivados 3- NO_2 indenoisoquinolina 5-11 diona, con un halógeno (F ó I) en posición C_9 y con sustituyentes 3-azidopropil (compuesto AM11-80), o bromopropil (compuesto AM12-13) en posición N_6 . Ninguno de los dos compuestos fue seleccionado como “hit” en el cribado fenotípico HTS.

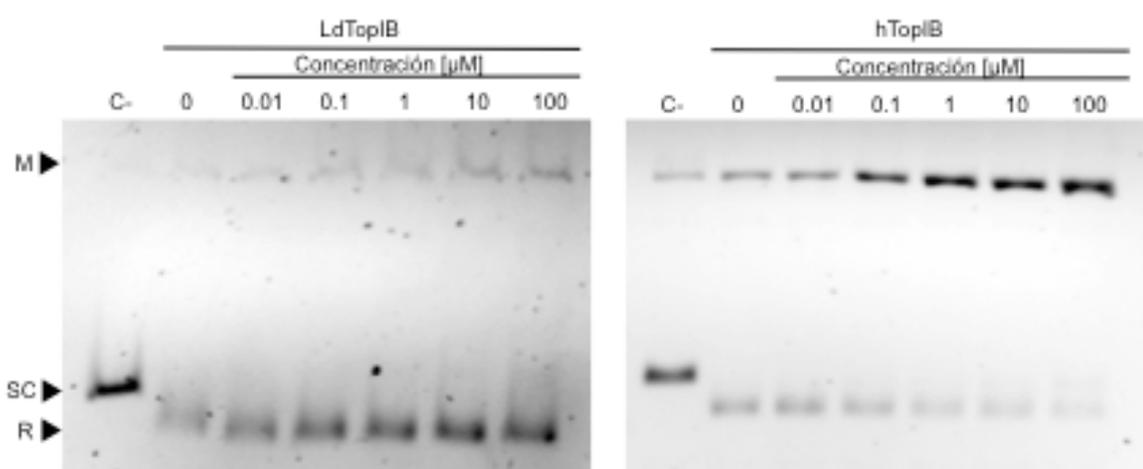


Fig. 4.24. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM11-80. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μ g de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Las Figs. 4.24 y 4.25 muestran que ninguno de los dos compuestos previno la relajación del DNA superenrollado a ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, los dos fueron capaces de acumular DNA mellado de forma muy significativa con la enzima humana (paneles de la derecha de las dos Figs.) pero no con la de *Leishmania*.

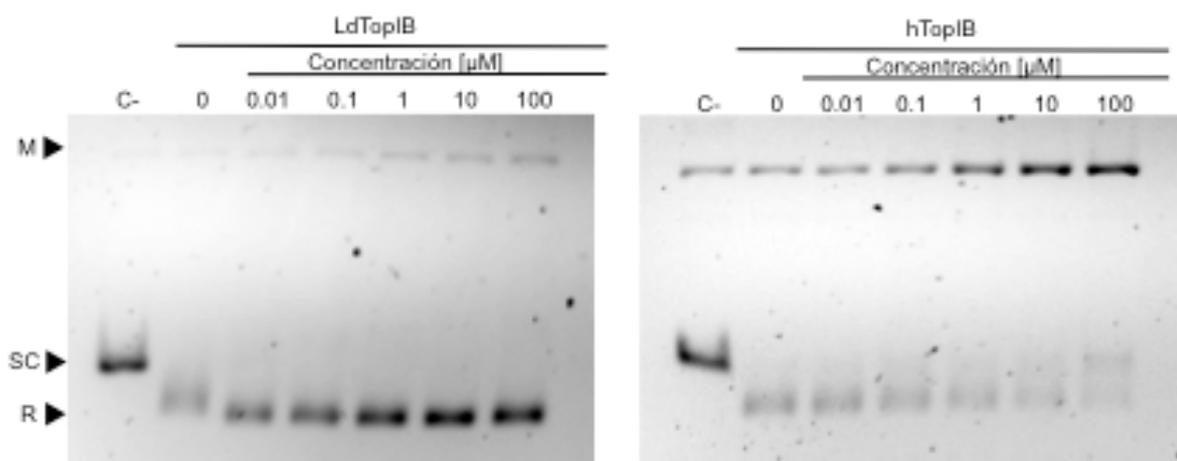
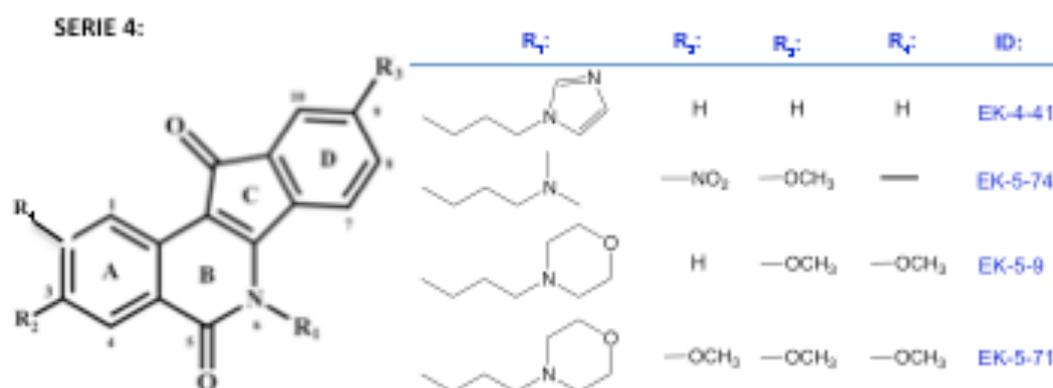


Fig. 4.25. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM12-13. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

4.4.4 Serie 4: 3-Nitro-derivados de la piridino [1,2] isoquinolina – 5,11 (–) diona

Los compuestos de la serie 4 incluyen la modificación de sustituir el grupo fenilo de la indeno 1,6 diona por una piridina. A partir de este nuevo farmacóforo se realizaron sustituciones en N_6 (dimetilpropilamino, morfolinopropil e imidazolilpropil). Sólo el compuesto EK5-74 de esta serie fue seleccionado como “hit” en el estudio HTS.



Los estudios dosis respuesta comparados entre la enzima recombinante de *Leishmania* (panel izquierdo) con respecto a la humana (panel derecho), en un ensayo de inhibición de la relajación muestran, en primer lugar, que el compuesto EK5-9 con un grupo morfolinopropil en posición N_6 (Fig. 4.26) era el único de la serie en el que se observaba una acumulación de DNA superenrollado en los geles

a concentraciones por debajo de 0,1 μM . Este efecto era selectivo, ya que no se observó con hTopIB, en la que por el contrario (panel derecho de las tres figuras) se observa la acumulación de DNA mellado dependiente de la concentración de fármaco añadido. Esta acumulación de DNA mellado apenas es visible con LiTopIB, con excepción de EK5-74 donde se pudo observar cierta acumulación a partir de 10 μM .

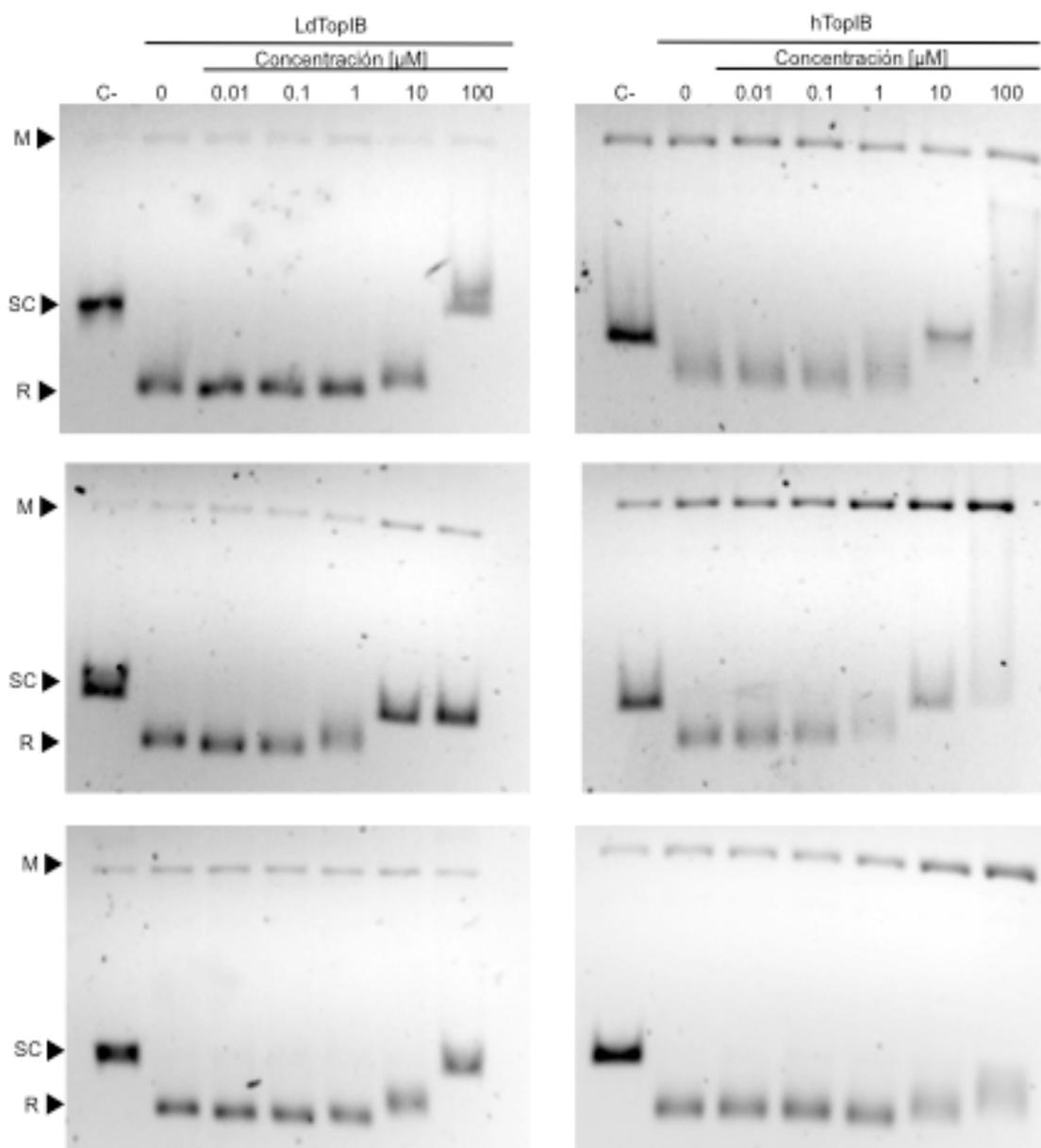


Fig. 4.26. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por EK4-41 (panel de arriba), EK5-74 (panel de en medio) y EK5-71 (panel de abajo). Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Merece la pena indicar que la capacidad de inhibición de la actividad de relajación del compuesto EK5-9 se pierde drásticamente al introducir un grupo metoxi en posición C₉ (compuesto EK5-71) donde se observa claramente la desaparición de las bandas de DNA superenrollado (Fig. 4.27).

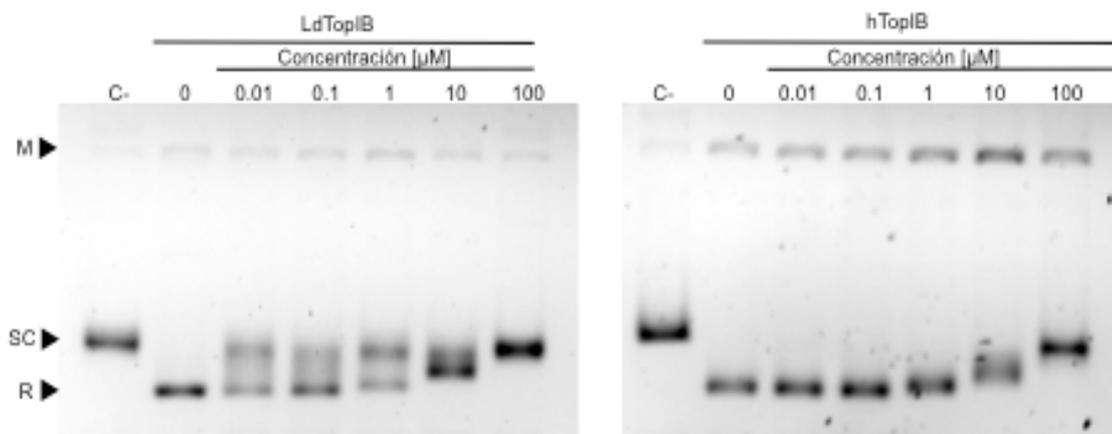
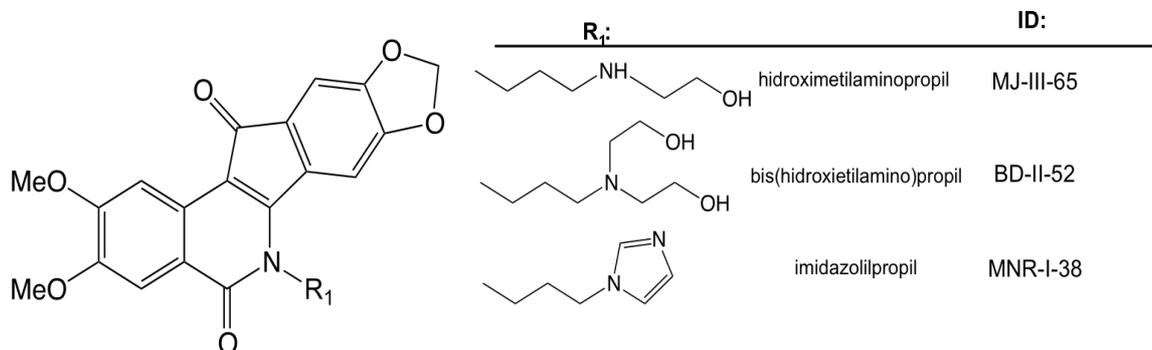


Fig. 4.27. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por EK5-9. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

4.4.5 Serie 5: Derivados de 8,9-metilendioxi-indenoisoquinolina–5,11 (--) diona

Los compuestos del grupo 5 suponen la introducción de un puente metilendioxi en las posiciones C₈ y C₉ del farmacóforo de indenoisoquinolina. Además se han introducido dos grupos metoxi en posiciones C₂ y C₃ y un sustituyente variable en posición N₆. Ninguno de estos compuestos se habían revelado como “hits” en el cribado fenotípico HTS de *L. infantum*.

SERIE 5:



El compuesto progenitor de la serie (AM4-42) posee un grupo NO₂ en posición C₃ y un sustituyente aminopropil en N₆. Este compuesto mostró una potente actividad inhibidora de la enzima de *Leishmania* a partir de concentraciones por debajo de 0,1 μM. Un ensayo dosis/respuesta a concentraciones crecientes (desde 0,4 a 200 nM) permite calcular una IC₅₀ = 20 nM. Esta actividad parece observarse igualmente con la enzima humana, aunque lo que sí es sobresaliente es la aparición de DNA mellado a partir de 0,1 μM (Fig. 4.28 A y B).

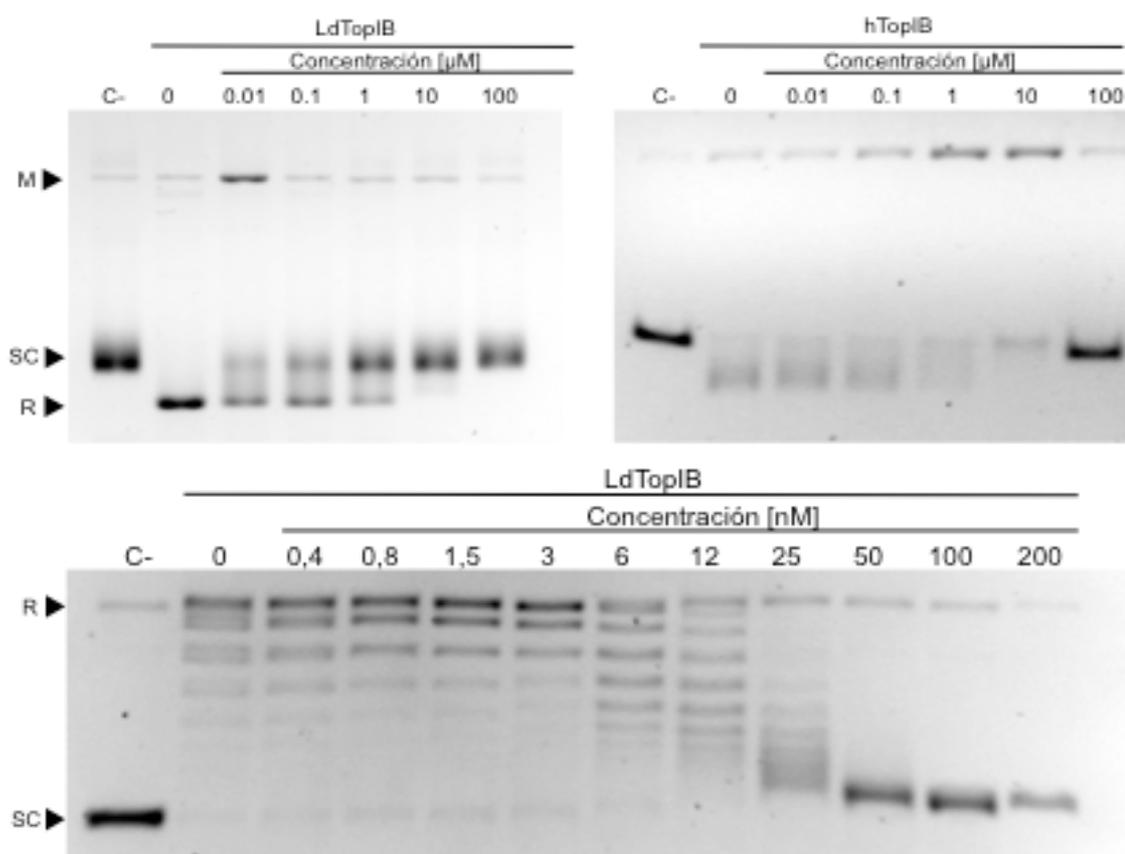


Fig. 4.28. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM4-42. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de ADN pSK durante 30 min a 37 °C.

Con el fin de confirmar la banda de DNA mellado que aparecía como consecuencia del tratamiento de LiTopIB con AM4-42, se realizó un ensayo de equilibrio de escisión/religación con un fragmento lineal de DNA de 202 pb marcado radiactivamente en su extremo 3' que incluye secuencias específicas de corte para la TopIB (Dexheimer y Pommier, 2008). La reacción se llevó a cabo incubando un

exceso de LiTopIB y 150.000 cpm de DNA pSK-202 en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de AM4-42, y otros dos compuestos que no habían mostrado dicho efecto en geles de agarosa: TN1-65 y AM14-67, usando gimatecan como control positivo. En ausencia de venenos, la TopIB es totalmente efectiva religando el DNA sustrato. De hecho, el equilibrio entre las dos reacciones opuestas de trans-esterificación (escisión/religación) favorece de forma sustancial el estado religado, ya que en condiciones normales la fracción de enzima que permanece unida covalentemente al DNA es indetectable.

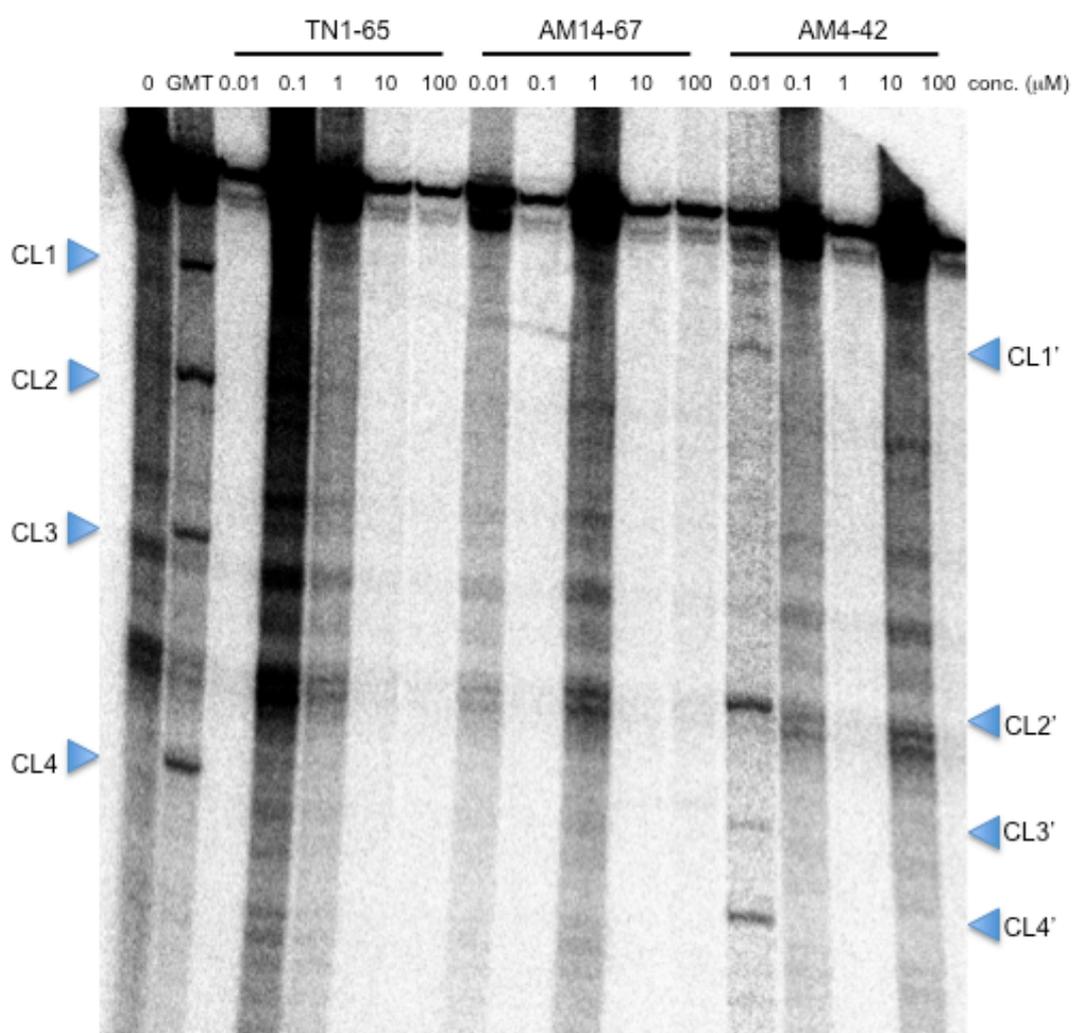


Fig. 4.29. Gel de secuenciación al 16 % en el que se observa el patrón de complejos de CL obtenido para la LiTopIB. U/R: ADN no escindido o ya religado; CL: banda correspondiente al complejo ternario ADN-LiTopIB-GMT estabilizado. Los patrones de bandas CL para el GMT (1 μM) y AM4-42, se muestran a la izquierda y derecha de la autorradiografía, respectivamente

Resulta singular que el patrón de mellado del fragmento de DNA usado como cebo sea diferente para el AM4-42 respecto al gimatecan. También llama la atención que, de la misma manera que ocurre con el gel de agarosa de la Fig. 4.28, no se obtuvieron bandas específicas a concentraciones superiores a 0,01 μM

El siguiente compuesto MJ-III-65, un potente antitumoral, presentaba una modificación en N_6 (hidroxietil-aminopropil) y los dos metoxi en posición C_2 y C_3 . En el panel izquierdo de la Fig. 4.30 se muestra la inhibición de la enzima de *Leishmania* en la que se observa acumulación de DNA superenrollado por encima de 1 μM . Estos resultados se repitieron con la enzima humana, aunque se observó una mayor sensibilidad.

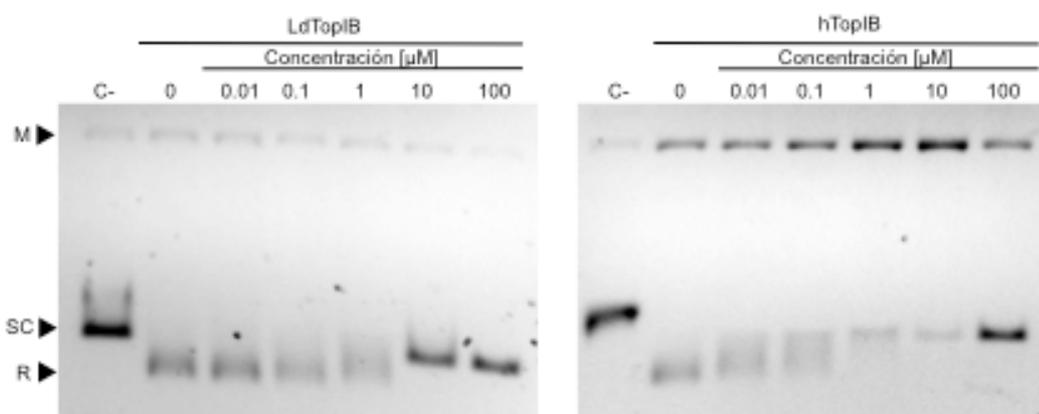


Fig. 4.30. Inhibición de la relajación de la LITopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por MJIII-65. Se incubó 1U de hTopIB/LITopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Con objeto de poder determinar el efecto inhibitorio de MJ-III-65 sobre LiTopIB de forma más precisa, se realizó una curva dosis/respuesta en el rango de concentraciones de 0,025 a 12,5 μM (Fig. 4.31). Estos ensayos permitieron calcular una $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ para la enzima de *Leishmania* y una $\text{IC}_{50} = 0.3 \mu\text{M}$ (datos no mostrados) para la enzima humana. Lo que sí es significativamente distinto es la acumulación de ADN mellado, proceso que únicamente ocurrió usando hTopIB a concentraciones por debajo de 0,01 μM que no se observó con LiTopIB en ningún rango de concentración.

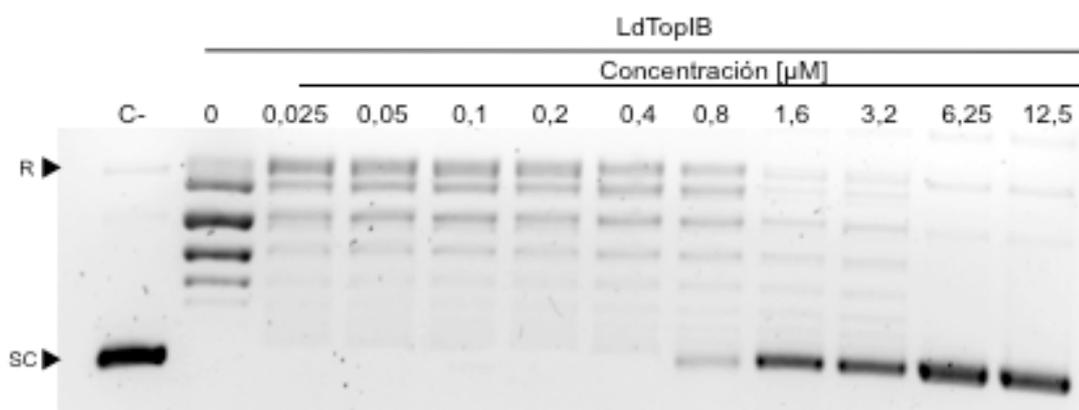


Fig. 4.31. Inhibición de la relajación de la LiTopIB por MJIII-65, en ausencia. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 µg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Sorprendentemente, la sustitución en N₆ de un grupo bis-hidroximetilamino-1-propil (compuesto DB-II-52) originó un compuesto sin aparente actividad inhibitoria sobre LiTopIB, aunque mantenía en parte su efecto sobre hTopIB, y originaba una cantidad significativa de DNA mellado dependiente de la concentración a partir de 0,1 µM (Fig. 4.32).

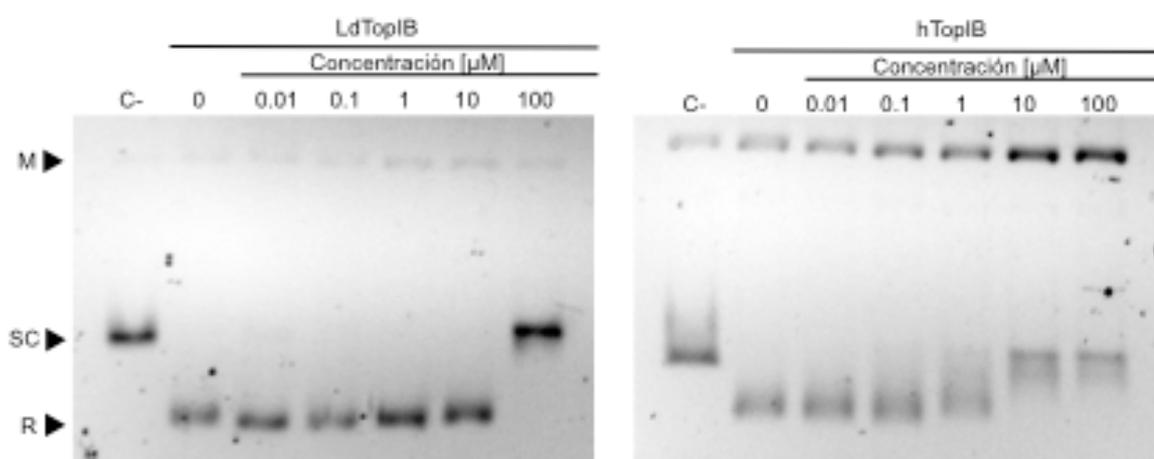


Fig. 4.32. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por DBII-52. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 µg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

Finalmente, el resultado de sustituir el grupo aminopropilo en N₆ por un imidazolil-propil (compuesto MNR1-38; indimitecan) produjo la pérdida completa de actividad inhibitoria sobre LiTopIB, pero, por el contrario, se exacerbó la capacidad

de mellar el DNA a concentraciones tan bajas como 0,1 μM con la enzima humana (Fig. 4.33).

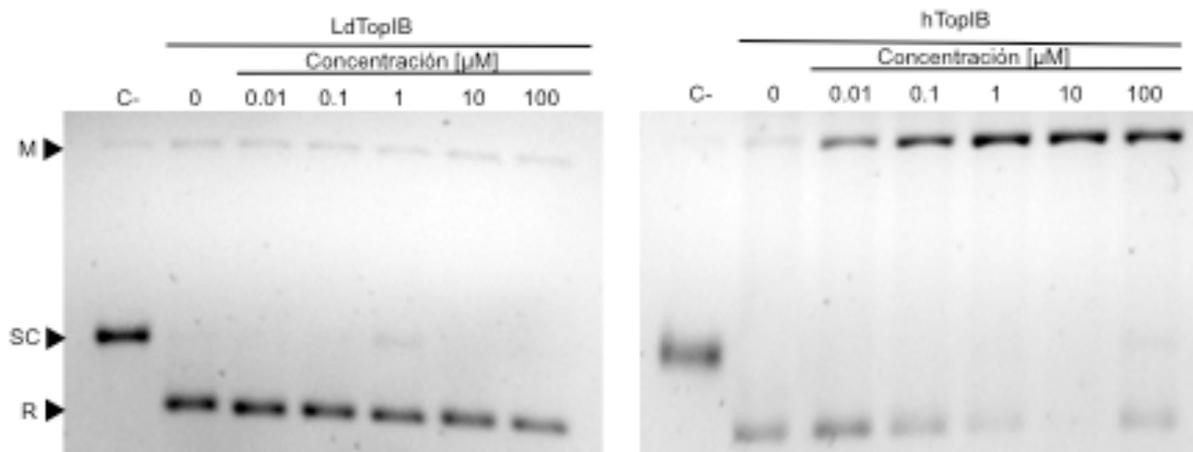


Fig. 4.33. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por MNRI-38. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

4.4.6 Serie 6: Derivados 12H-5, 11a-diaza-dibenzo [b,h] fluoren 11-ona (aromatecinas)

Los derivados del dibenzofluoreno reciben el nombre de aromatecinas. En este farmacóforo se realizaron sustituciones en C_{14} consistentes en la incorporación de cadenas aminopropílicas de diferente longitud y heterociclos.

SERIE 6:

	R_1 :	R_2 :	ID:
		H	MC-2-6
		H	MC-2-8
		H	AM-17-74
		H	AM-17-75
		H	AM-17-72
		Cl	MC-4-59

A pesar de que sólo una de estas moléculas (compuesto MC2-8) se había revelado como “hits” en el cribado fenotípico HTS en amastigotes de *L. infantum*, se realizaron los ensayos estándar de inhibición y rotura del DNA circular superenrollado que se muestran a continuación.

El primer elemento de la serie (compuesto MC2-6) que presentaba un grupo etanodiaminoetil en posición C₁₄ careció de actividad inhibitora sobre las dos enzimas según se observa en los ensayos de actividad de relajación de la Fig 4.34. Con estos compuestos, la longitud de la cadena sustituida en posición C₁₄ parece ser crítica ya que el compuesto MC2-8 que presenta un grupo butanodiaminometil en esta posición, inhibió significativamente LiTopIB a partir de 0,1 μ M. Este efecto no se observó con hTopIB y tampoco un incremento significativo del DNA mellado por debajo de 10 μ M (Fig. 4.34 abajo).

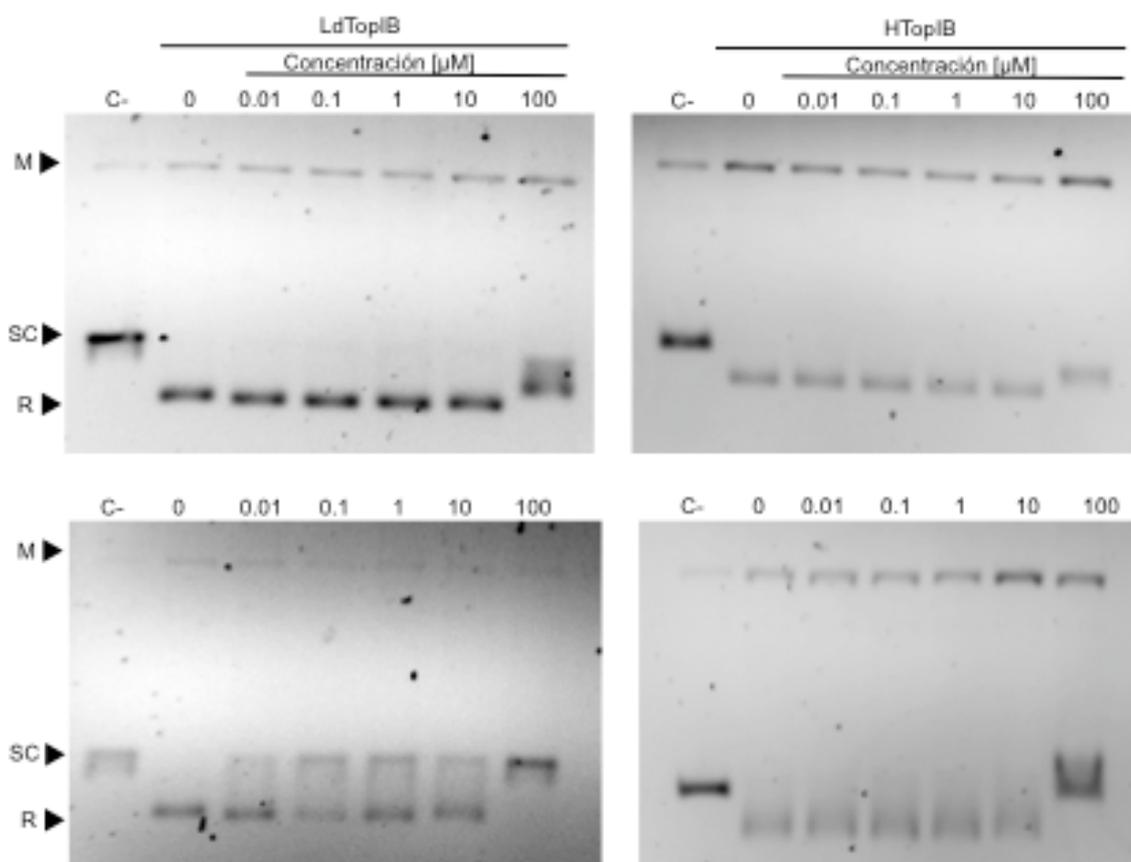


Fig. 4.34. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por MC2-6 (panel de arriba) y MC2-8 (panel de abajo). Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μ g de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

La adición de un grupo polar en la cadena lateral (compuesto AM17-74) redujo la capacidad inhibitoria sobre LiTopIB con efectos en el mellado del DNA en la enzima humana por encima de 10 μM . (Fig. 4.35 arriba). Sólo aquellos compuestos que mostraban radicales alquílicos hidrofóbicos (compuesto AM17-75) o un grupo imidazolil-propil (compuesto AM17-72) fueron capaces de inhibir la relajación del DNA superenrollado en LiTopIB con apenas efectos en hTopIB a concentraciones equivalentes (Figs. 4.35).

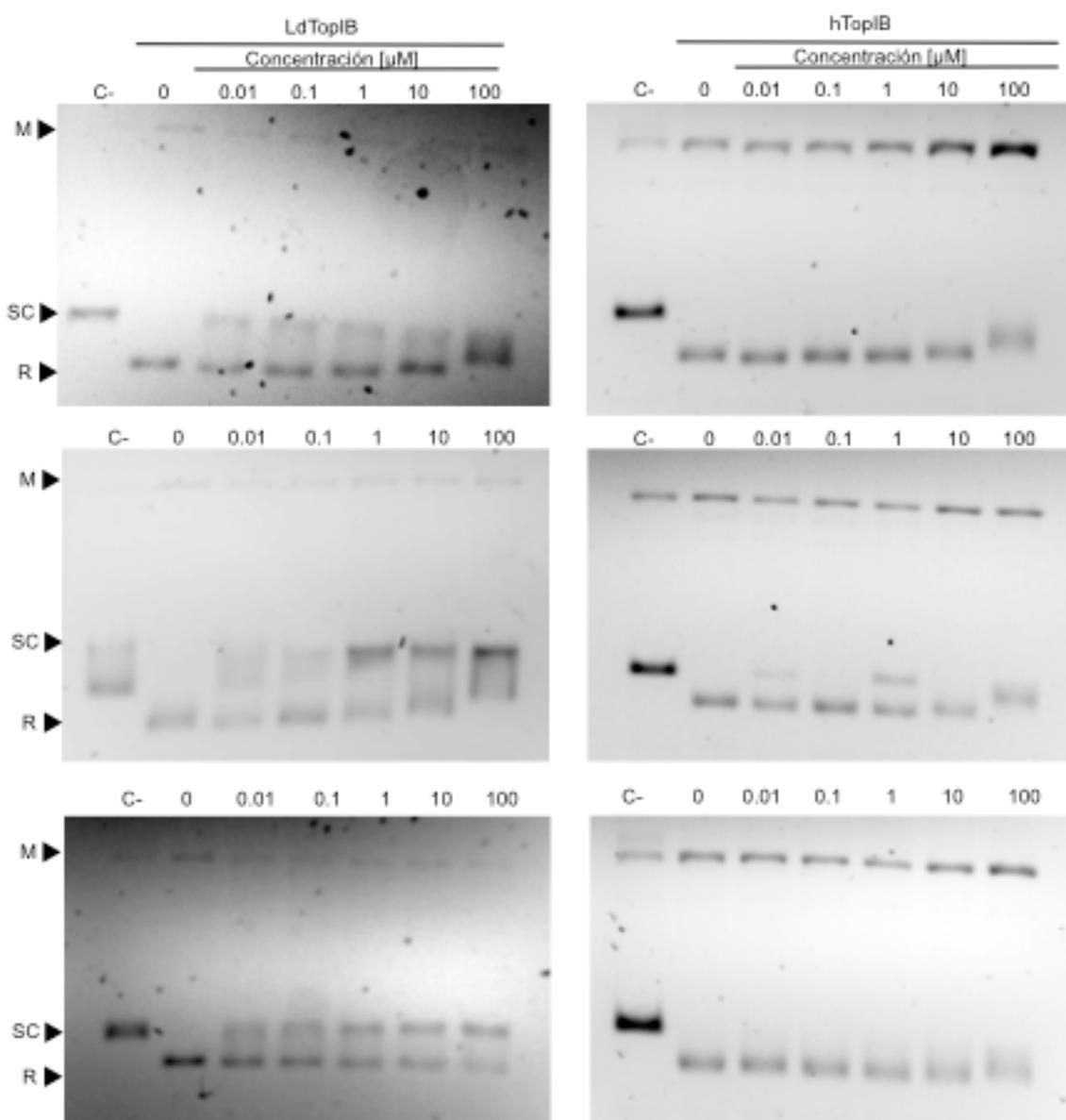


Fig. 4.35. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por AM17-74 (arriba), AM17-75 (medio) y AM17-72 (abajo). Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Sin embargo, se observó una pérdida total de la capacidad inhibitoria sobre LiTopIB tras la introducción de un átomo de Cl en posición C₁ (compuesto MC4-59) (Fig. 4.36).

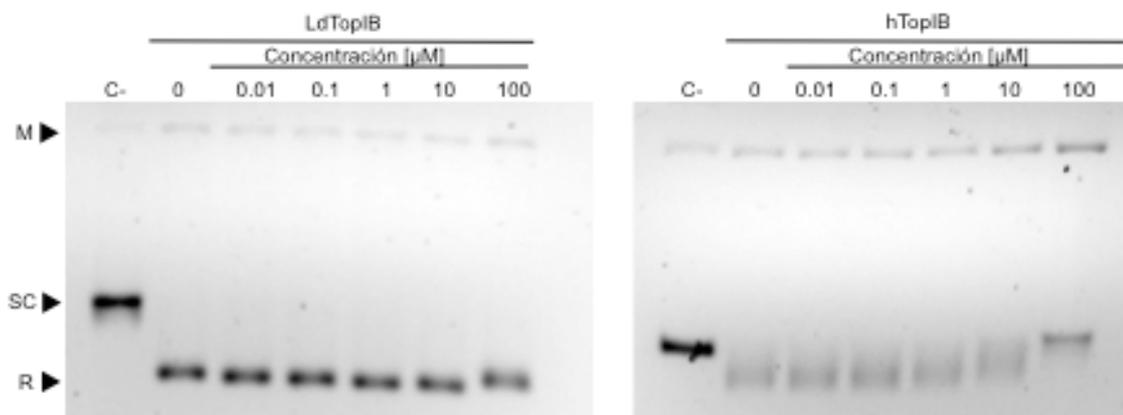
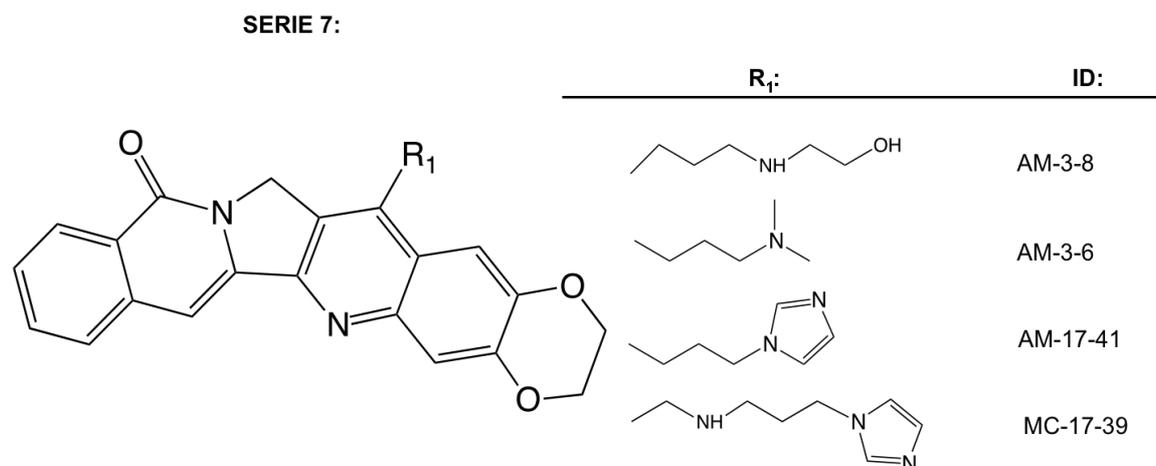


Fig. 4.36. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por MC4-59. Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μg de DNA pSK durante 30 min a 37 °C.

4.4.7 Serie 7: Derivados 2,3-etilendioxi-12H-5, 11a-diaza-dibenzo [b,h] fluoren 11-ona

La adición de un puente etilendioxi en posición 2,3 originó la última serie de derivados de las aromatecinas. Estos compuestos tuvieron sustituciones aminoalquílicas de diferente longitud en posición C₁₄. Ninguno de estos compuestos se revelaron como “hits” en el cribado fenotípico HTS de *L. infantum*.



Los compuestos AM17-41 y MC3-6, con sustituyentes dimetilaminoetil y dimetilaminopropil, respectivamente en posición C_{14} , no daban lugar a topoisómeros visibles con ninguna de las dos enzimas a concentraciones $> 1 \mu\text{M}$. Se pudo observar una ligera acumulación de DNA mellado con el primero de ellos utilizando hTopIB a partir de $10 \mu\text{M}$ (Figs 4.37).

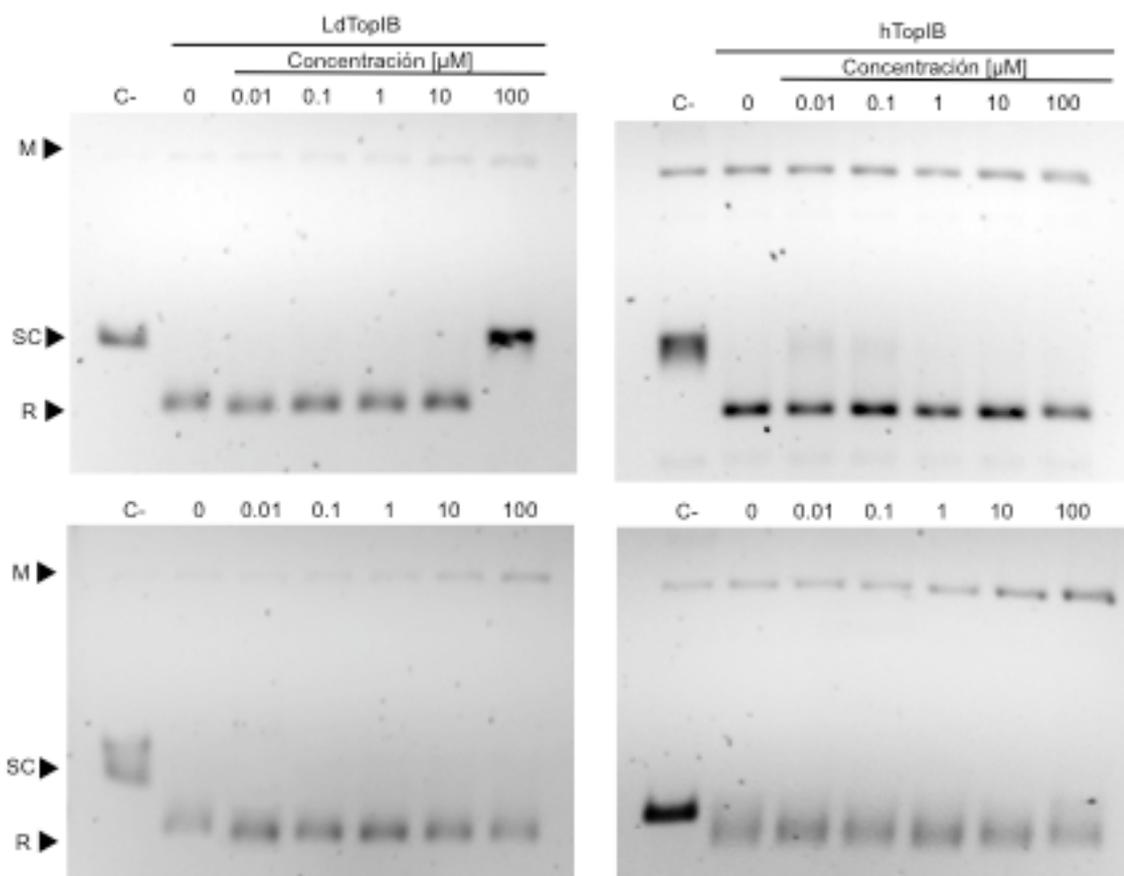


Fig. 4.37. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por MC3-6 (panel de arriba) y MC17-41 (panel de abajo). Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y $0,5 \mu\text{g}$ de ADN pSK durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por su parte, el compuesto MC3-8 que presentaba un sustituyente aminopropilo en posición C_{14} , tenía un pequeño efecto sobre la enzima del patógeno que no se evidenciaba sobre su homóloga humana. Este efecto no parecía incrementarse con la concentración y únicamente a $100 \mu\text{M}$ la enzima parecía estar completamente inhibida (Fig. 4.38 arriba). Este efecto no se observó con el compuesto AM17-39, resultado de sustituir un grupo imidazolilmetil en

posición C₁₄. Ninguna de las dos enzimas se vio afectada a las concentraciones utilizadas (Fig. 4.38 abajo).

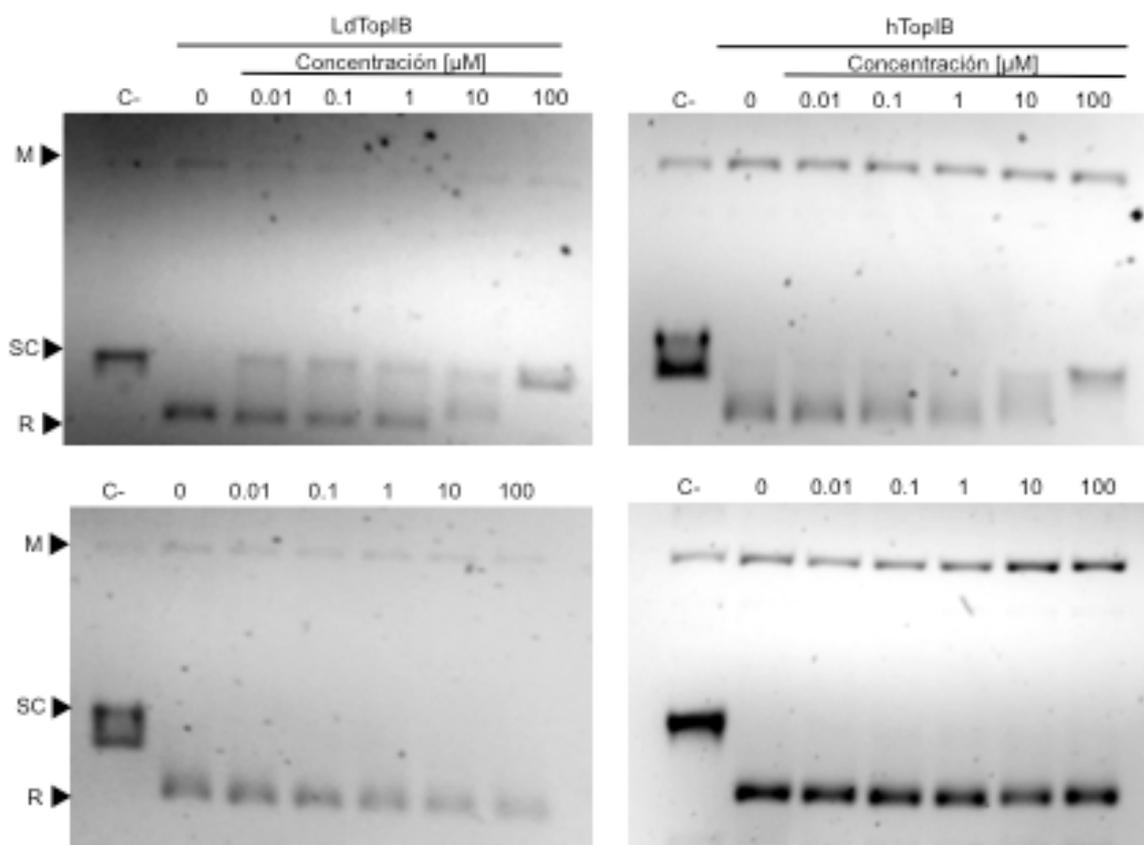


Fig. 4.38. Inhibición de la relajación de la LiTopIB (izquierda) y hTopIB (derecha) por MC3-8 (panel de arriba) y MC17-39 (panel de abajo). Se incubó 1U de hTopIB/LiTopIB en presencia de concentraciones crecientes del compuesto y 0,5 μ g de ADN pSK durante 30 min a 37 °C.

4.5. ENSAYOS DE COMPETICIÓN CON CPT

Con el fin de comprender de una forma más precisa la forma en que las indenoisoquinolinas inhiben la LiTopIB, se decidió comparar su mecanismo de acción con el de la CPT. Para ello se eligieron compuestos de las distintas series en presencia de CPT y la enzima de *Leishmania*, comparándose en todo momento su efecto sobre la enzima humana a una concentración fija de 10 μ M. Los experimentos de competición con CPT se realizaron de tres formas diferentes: i) preincubando el compuesto 10 min antes que la CPT; ii) preincubando la CPT 10 min antes; iii) incubando ambos compuestos simultáneamente.

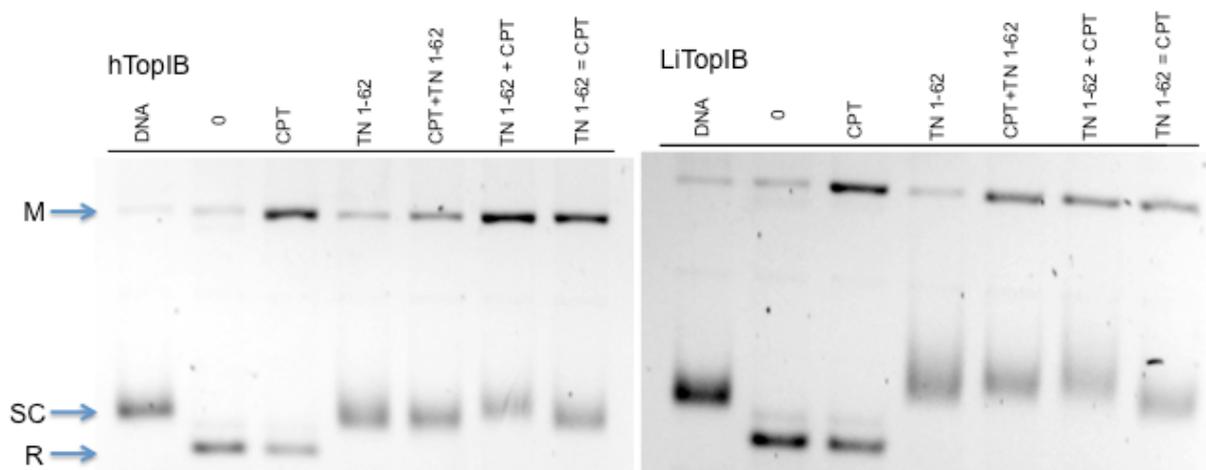


Fig. 4.39. Ensayo de inhibición competitiva entre TN1-62 y la CPT sobre hTopIB (izquierda) y LiTopIB (derecha). M: DNA mellado, SC: DNA superenrollado, R: DNA relajado.

El compuesto TN1-62, representante de la serie 1 que porta un radical aminopropil en posición R_1 del farmacóforo básico de la indenoisoquinolina, inhibía la relajación del DNA superenrollado a concentraciones menores a $0,01 \mu\text{M}$ con la enzima de *Leishmania* pero no con la enzima humana (ver figura 4.12). Los resultados demuestran que TN 1-62 previno significativamente el efecto de rotura (“cleavage”) de la CPT sobre la enzima de *Leishmania* pero mantuvo la capacidad de inhibir la relajación del DNA superenrollado tanto en la enzima humana como en la del patógeno. Merece la pena señalar que la banda de DNA relajado que aparece con la dos enzimas en presencia de cantidades saturantes de CPT, desaparece con la indenoisoquinolina que tiene la capacidad de prevenir la relajación aún en presencia de CPT.

Entre los compuestos de la serie 2 se seleccionaron aquellos que habían mostrado un efecto de prevención de la relajación del DNA a concentraciones por encima de $10 \mu\text{M}$ en ensayos previos, con una tendencia muy marcada en AM 10-57 (el compuesto con un sustituyente hidroxietil aminopropil en posición N_6) y AM 14-7 (con sustituyente imidazolil-propil en la misma posición). Ninguno de los dos compuestos, sin embargo, previno significativamente el efecto de rotura del DNA (“cleavage”) de la CPT con la enzima de *Leishmania* pero mantuvieron la

capacidad de inhibir la relajación del DNA superenrollado tanto de la enzima humana como de la del patógeno (Fig. 4.40).

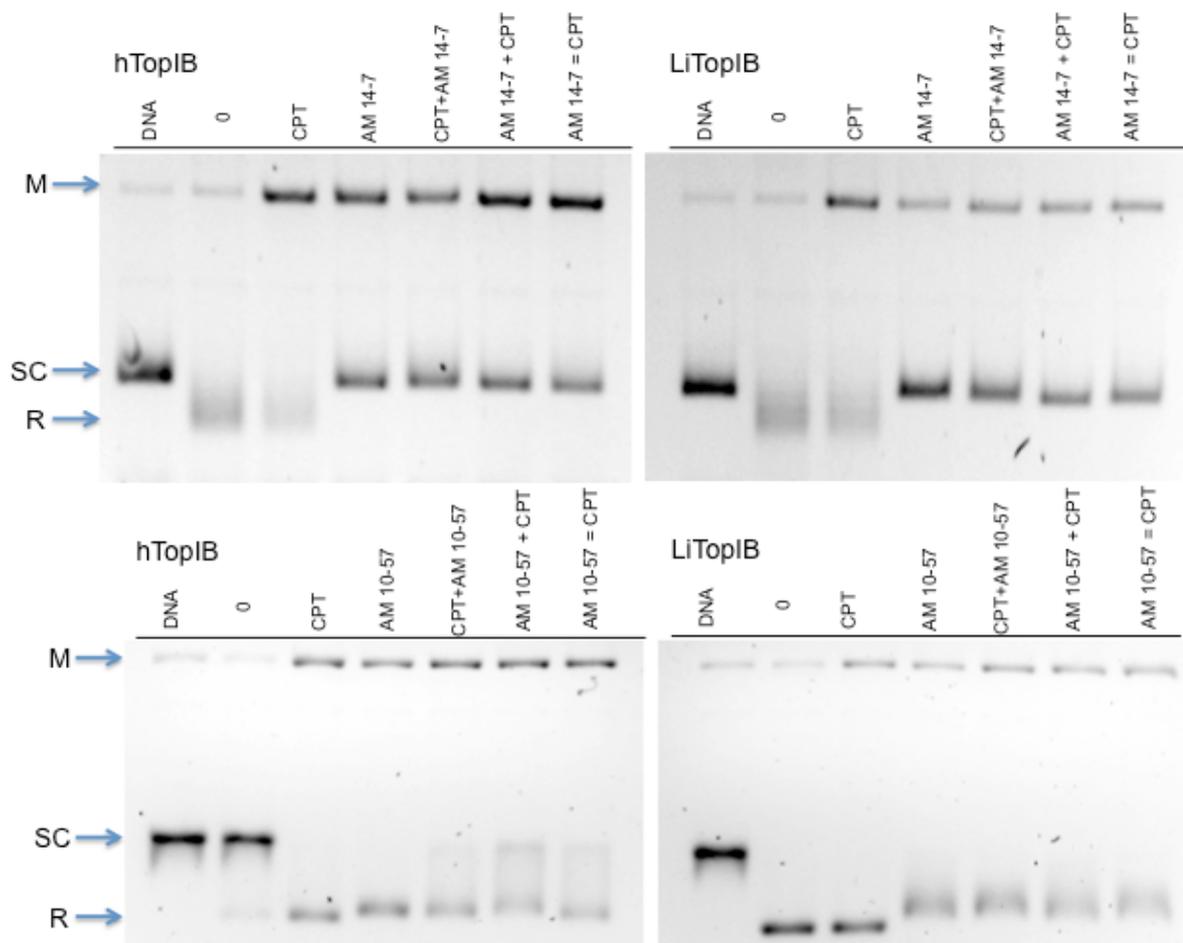


Fig. 4.40. Ensayo de inhibición competitiva de los compuestos de la serie 2 de indenoisoquinolinas: AM 14-7 (imidazolil-propil: arriba) y AM 10-57 (hidroxietil aminopropil, abajo) con la CPT sobre hTopIB (izquierda y LiTopIB (derecha).

El compuesto AM 14-58, representante de la tercera serie de compuestos (con sustituyentes en posición 9 del anillo de la indenoisoquinolina) y que porta un radical aminopropil en posición R₁ del farmacóforo básico, había mostrado un efecto de rotura selectivo del DNA en presencia de la enzima humana y una inhibición de la relajación del DNA superenrollado con la enzima de *Leishmania* (ver figura 4.18). Los resultados demuestran que AM 14-58 mantuvo la capacidad de inhibir la relajación del DNA superenrollado tanto de la enzima humana como de la del patógeno. Merece la pena señalar que la banda de DNA relajado que aparece con la dos enzimas en presencia de cantidades saturantes de CPT,

desaparece con la indenoisoquinolina que tiene la capacidad de prevenir la relajación aún en presencia de CPT (Fig. 4.41).

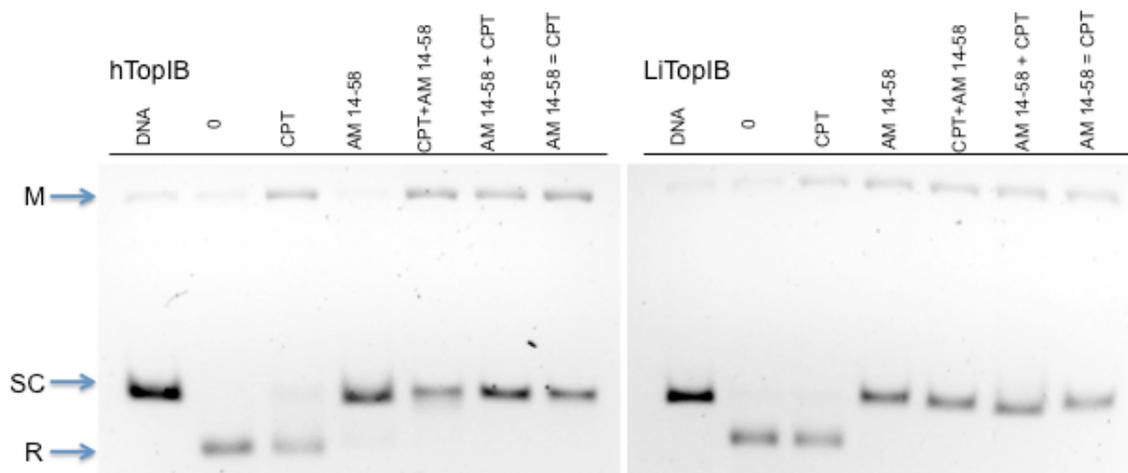


Fig. 4.41. Ensayo de inhibición competitiva del compuesto de la serie 3 de indenoisoquinolinas: AM 14-58 (R_1 = aminopropil; R_3 = metoxi) con la CPT sobre hTopIB (izquierda) y LiTopIB (derecha).

El compuesto AM 11-80 perteneciente a la serie 3, presenta un grupo azidopropil en posición N_6 y un átomo de F en posición R_9 . Este compuesto no había tenido efectos inhibidores sobre la relajación del DNA superenrollado con ninguna de las dos enzimas, aunque se observó un claro efecto de mellado cuando se utilizó la enzima humana.

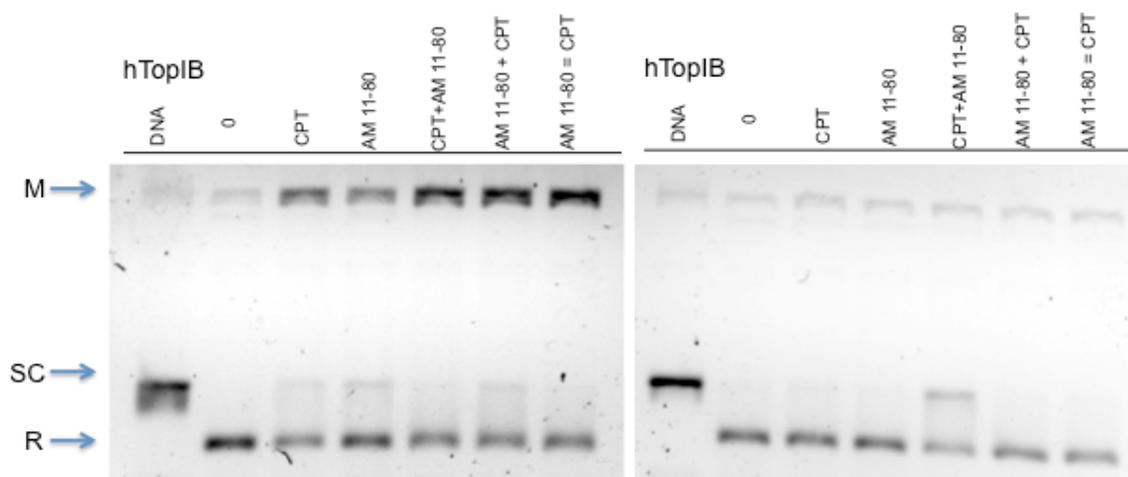


Fig. 4.42. Ensayo de inhibición competitiva del compuesto de la serie 3 de indenoisoquinolinas: AM 11-80 (R_1 = azidopropil; R_3 = F) con la CPT sobre hTopIB (izquierda) y LiTopIB (derecha).

Los gels de la Fig. 4.42 demuestran que AM 11-80 producía la formación de complejos CL sobre la enzima humana (no sobre la de *Leishmania*) que venía a agravar el ya producido por la CPT, sin que por ello se observase inhibición de la actividad de relajación.

Finalmente hemos realizado un ensayo de competición con el compuesto MJ III-65, una indenoisoquinolina 1,6 diona de la serie 5 cuyos efectos antiproliferativos en células tumorales han sido descritos ampliamente en la literatura. Este compuesto dimetoxilado en posiciones R₂ y R₃ y con un grupo hidroxietil aminopropil en N₆, mostró un profundo efecto de mellado con la enzima humana pero no con la de *Leishmania*.

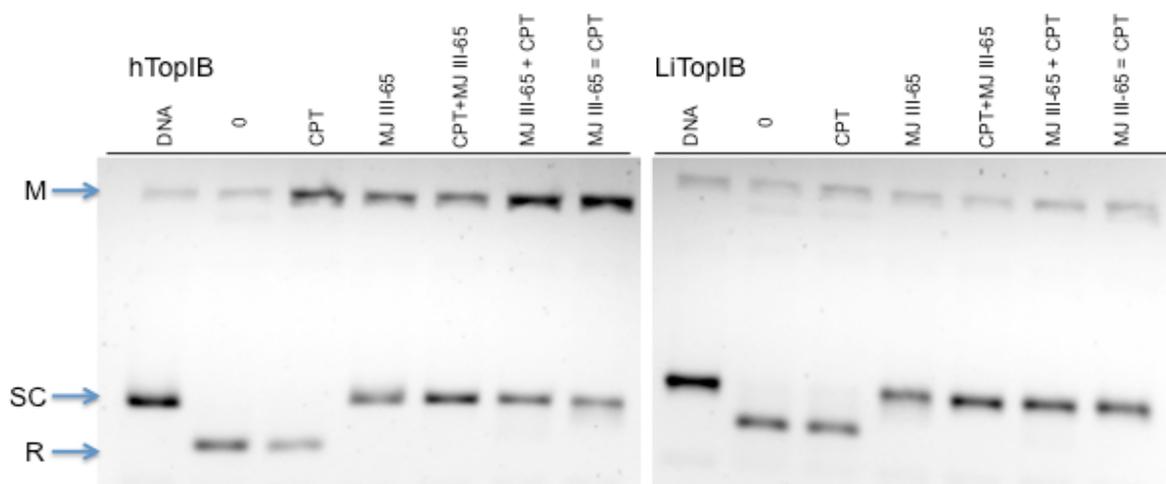


Fig. 4.43. Ensayo de inhibición competitiva del compuesto de la serie 6 de indenoisoquinolinas 1,6 diona: MJ III-65 (R_{2,3} = metoxi; R₆ = hidroxietil aminopropil) con la CPT sobre hTopIB (izquierda) y LiTopIB (derecha). M: ADN mellado, SC: ADN superenrollado, R: ADN relajado.

Del análisis de estos gels se deducen dos aspectos importantes: i) MJ III-65 produjo un efecto de mellado semejante y aditivo con el de la CPT sólo con la enzima humana; ii) MJ III-65 a la concentración de 20 μ M, produjo una inhibición de la relajación del DNA superenrollado con ambas enzimas.

Finalmente, dado que las aromatecinas no tenían un efecto claro sobre las TopIB, no se hicieron estudios de competición con CPT con estos compuestos.

4.6. ESTUDIOS DE FOSFORILACIÓN DE LA HISTONA γ H2A

Con el fin de comprender de una forma más precisa la forma en que las indenoisoquinolinas inducen daño en el DNA mediado por la formación de roturas de doble cadena en el DNA por la LiTopIB, se decidió realizar un estudio de fosforilación de la histona γ H2A en cultivos de promastigotes de *L. infantum*. En estudios previos realizados con la histona γ H2A de *T. brucei*, Glover y Horn (2012) reconocieron la existencia de un sitio de fosforilación putativo de la histona γ H2A de tripanosomátidos. Los autores mostraron que la Ser-139 de la histona γ H2A humana se correspondía con un residuo de Thr en *T. brucei* y otros tripanosomátidos. Este aminoácido era susceptible de ser fosforilado por enzimas pertenecientes a la familia de las fosfoinositido kinasas (Fig. 4.44). Con el fin de determinar el grado de fosforilación de la histona γ H2A mediado por indenoisoquinolinas, preparamos anticuerpos policlonales contra el nonapéptido sintético $^{125}\text{KKGKA [pT] PSA}_{133}$, fosforilado en la Thr-130, para poder detectarlos mediante análisis de Western.

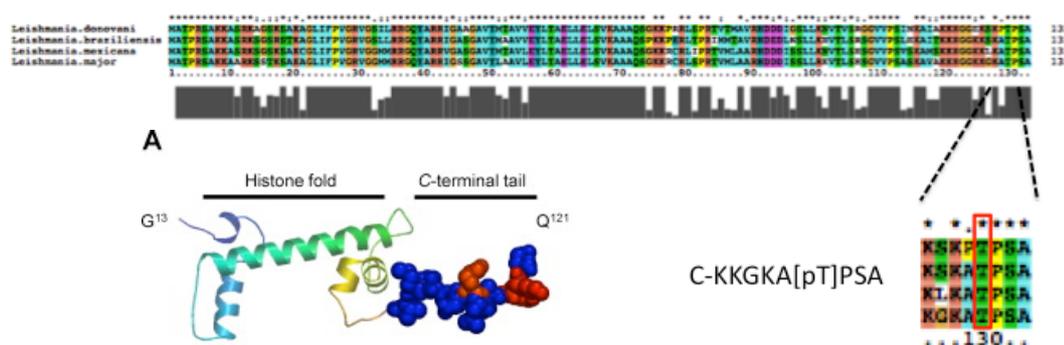


Fig. 4.44. Alineamiento del motivo de fosforilación de la histona γ H2A en diferentes especies. A) estructura terciaria del motivo de fosforilación. B) secuencia conservada mostrando la Thr-130 de *Leishmania* susceptible de ser fosforilada y que se conserva en otros tripanosomátidos (modificado de Glover y Horn, 2012).

4.6.1. Efecto de inhibidores de TopIB sobre la fosforilación de la histona γ H2A

Para confirmar la validez de este marcador de daño, se diseñó un experimento previo con CPT y sus derivados de uso clínico TPT, SN-38 y GMT a una concentración fija de 10 μM , incubando el cultivo de promastigotes en fase logarítmica en presencia de cada compuesto y recogiendo las células a los tiempos indicados de 0, 15, 60 y 120 min para su procesamiento. El lisado y posterior

análisis de Western de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se muestra en la (Fig. 4.45).

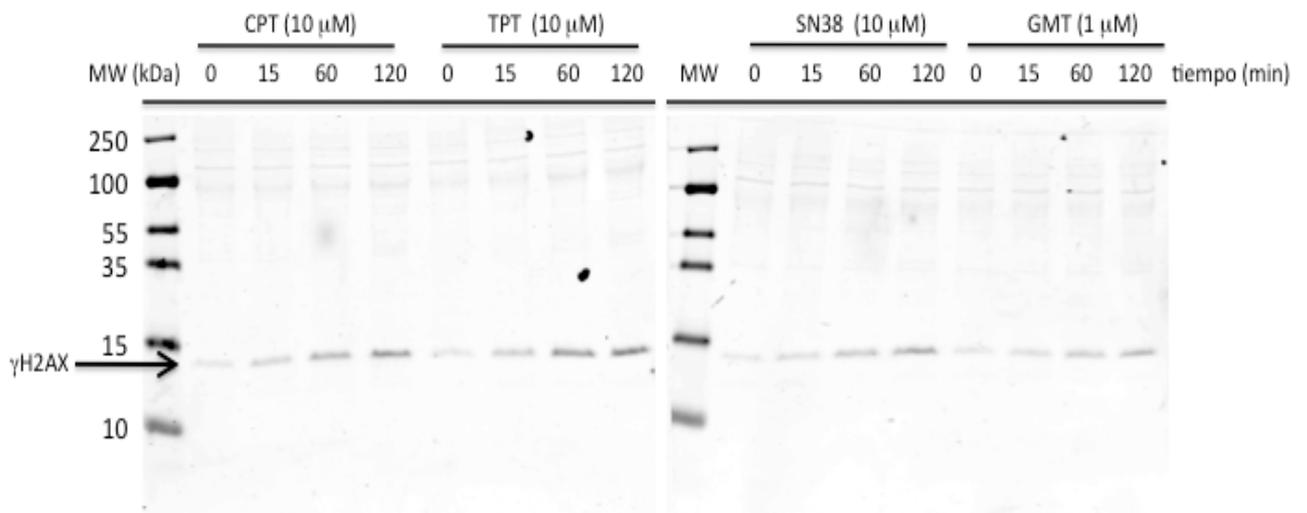


Fig. 4.45. Análisis de Western de la fosforilación de la histona γ H2A de *L. infantum* inducida por CPT, TPT (gel de la izquierda), SN38 y GMT (gel de la derecha) a concentración única de 10 μ M (con excepción del GMT que se usó a 1 μ M) y a los tiempos indicados. La hibridación específica originó una banda de 14 kDa que se corresponde con la histona γ H2A.

En células de mamífero, la fosforilación de la histona γ H2A inducida por daño de doble cadena, se produce en un residuo de Ser colocado dentro de una región de 1 Mb que flanquea el nucleosoma. Este proceso está mediado por miembros de la familia de las fosfoinositol 3-quinazas (PI3-K), como ATM, Atr-, y de proteínas quinazas dependientes de DNA, cuya presencia ha sido dilucidada en otros tripanosomátidos.

A fin de estudiar la relación posible de estas enzimas en la fosforilación de la histona γ H2A de *L. infantum*, preparamos un experimento preincubando 30 min con 20 μ M del inhibidor de PI3-K wortmanina y con 4 mM cafeína, cuyos efectos apuntan a la inhibición de la ruta PI3K/Akt/mTOR/p70S6K (Fig. 4.46). Se pudo observar que la presencia de wortmanina en el medio de cultivo previno parcialmente la fosforilación de la histona γ H2A inducida por CPT y SN 38 a una concentración única de 10 μ M en promastigotes de *L. infantum*. Este efecto se produjo igualmente por la adición de cafeína 4 mM en el medio de cultivo. En ninguno de los dos casos se obtuvo una prevención completa de la modificación del

péptido por lo que parece evidente que existen otros mecanismos responsables de la fosforilación de la histona γ H2A en tripanosomátidos que no han sido descritos hasta el momento.



Fig. 4.46. Inhibición de la PI3-K por wortmanina y cafeína. Análisis de Western de la fosforilación de la histona γ H2A de *L. infantum* inducida por CPT (ventana de arriba) y SN38 (ventana de abajo) a la concentración única de 10 μ M en presencia de los dos inhibidores de PI3-K a las concentraciones indicadas.

4.6.2. Efecto de las indenoisoquinolinas sobre la fosforilación de la Histona γ H2A y el ciclo celular

De la misma manera que los cuatro compuestos camptotecínicos estudiados previamente, es previsible que otros inhibidores con estructura indenoisoquinolínica puedan inducir rotura de DNA de doble cadena y por consiguiente la fosforilación de la histona γ H2A antes de la aparición de los mecanismos de reparación. Hemos hecho un cribado de todas las series de indenoisoquinolinas incluidas en el estudio en promastigotes de *L. infantum* con el fin de observar su capacidad de producir roturas de cadena doble en el DNA. Ya que la fosforilación de la histona γ H2A es un marcador reversible y que la mayoría de los inhibidores de la TopIB producen una demora en el proceso de religación del DNA que puede ser eficientemente reparado por los mecanismos de recombinación homóloga, los tiempos de incubación con los compuestos químicos fueron de hasta 120 min con el fin de observar el máximo daño antes de que la célula lo pueda

reparar. Simultáneamente hemos observado mediante citometría de flujo, el efecto de estos compuestos sobre el ciclo celular de los promastigotes de *L. infantum*.

Serie 1: derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (--) diona

El efecto de la primera serie de compuestos derivados del núcleo de la isoquinolina 5-11 diona, sustituidos en N₆ con una cadena aminoalquil de diferente longitud (aminoetil, aminopropil, aminobutil y aminohexil) sobre la fosforilación de la histona γ H2A se muestra en la Fig. (4.47).

SERIE 1

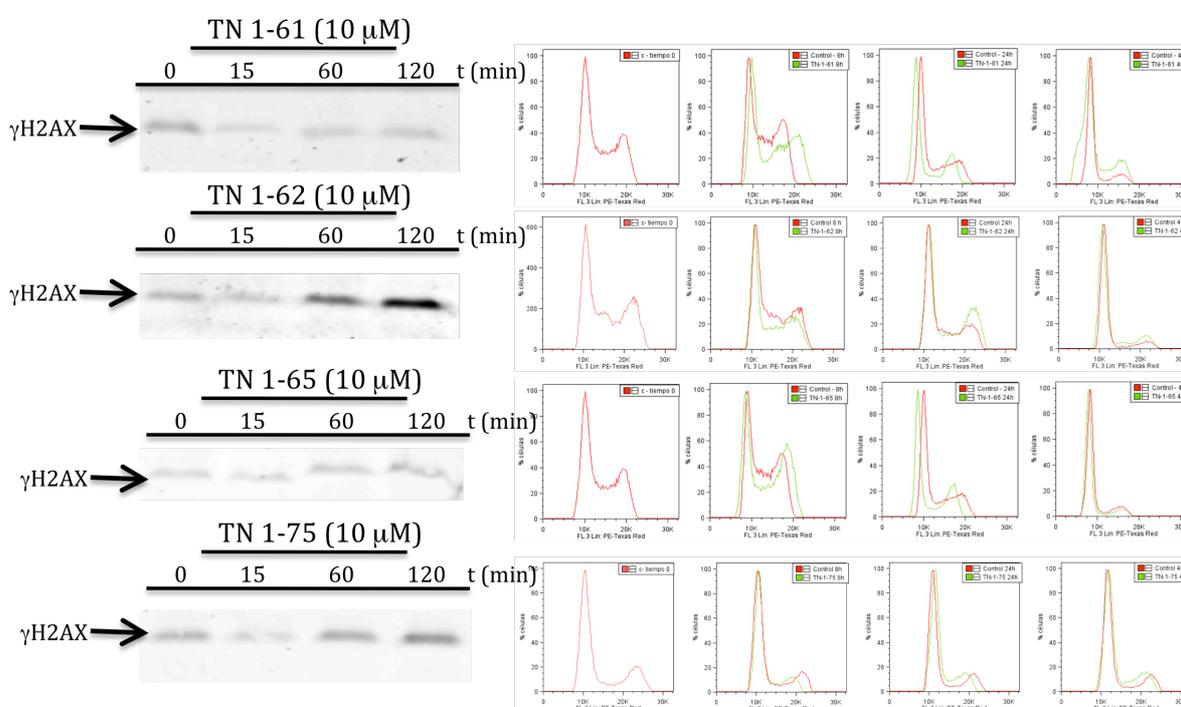


Fig. 4.47. Efecto de las indenoisoquinolinas de la serie 1 a una concentración fija de 10 μ M sobre la fosforilación de la histona γ H2A de *L. infantum* a diferentes tiempos. La hibridación específica con el anticuerpo policlonal originó una banda de 14 kDa que se corresponde con la histona γ H2A. En los paneles de la derecha aparece el ciclo celular de los promastigotes tratados (verde) y sin tratar (rojo) a 0, 8 h, 24 h y 48 h después de la adición del compuesto.

De los análisis de Western realizados con los extractos de promastigotes expuestos a los cuatro compuestos se pudo observar un efecto muy significativo sobre la fosforilación de la histona γ H2A sólo con TN1-62 una indenoisoquinolina que lleva sustituido un grupo aminopropilo en posición N₆. En esta figura se puede observar que el daño de doble cadena sobre el DNA eran inexistentes para los

compuestos TN1-61 (amino-etil en N₆) y TN1-65 (aminobutil en N₆) pero podían observarse – aunque en una menor intensidad – con el compuesto TN1-75 (aminohexil en N₆). Ninguno de los compuestos indujo cambios en el ciclo celular a los tiempos observados.

Serie 2: 3-Nitro derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (--) diona

El efecto de la serie 2 derivados del núcleo de la isoquinolina 5-11 diona, que introducían un grupo NO₂ en posición C₃ y un sustituyente halógeno (F, Br) o alquilo (metoxi, epoxi o acetoxi) en posición C₉ en el compuesto TN1-62 sobre la fosforilación de la histona γ H2A se muestra en la Fig. (4.48). De la misma forma que los compuestos de la serie anterior, todos los compuestos de este grupo fueron “hits” en el estudio HTS con una elevada potencia leishmanicida.

SERIE 2

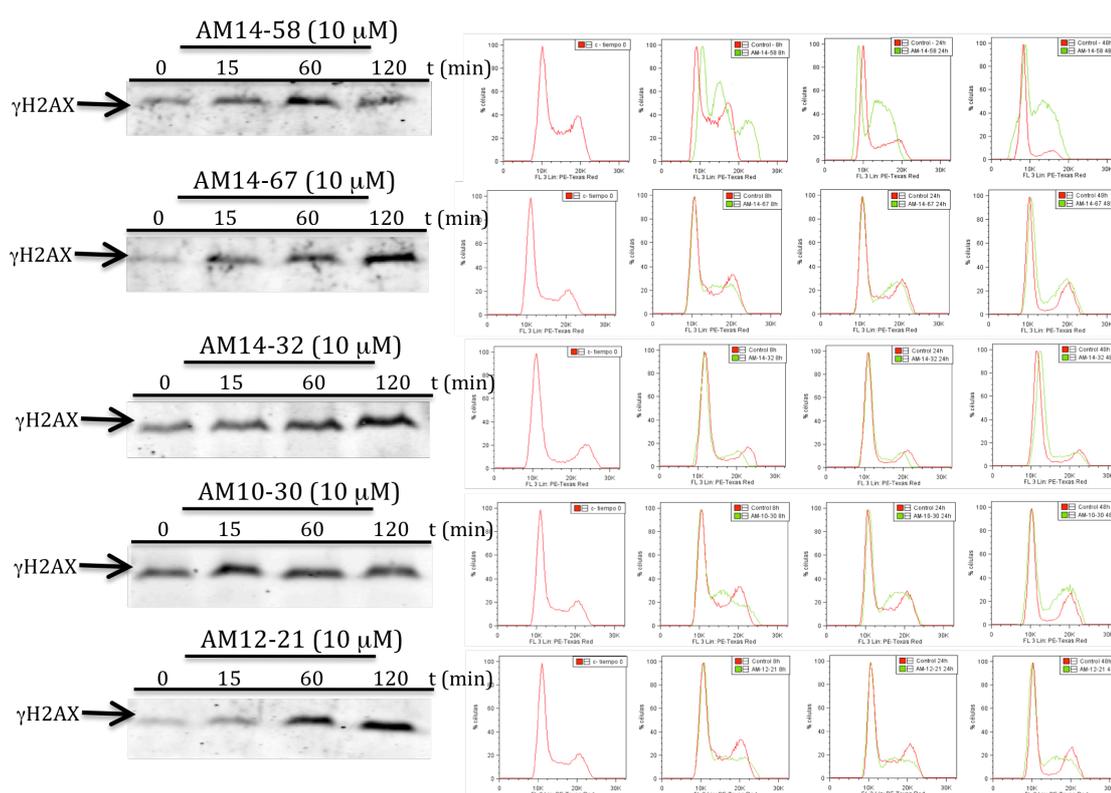
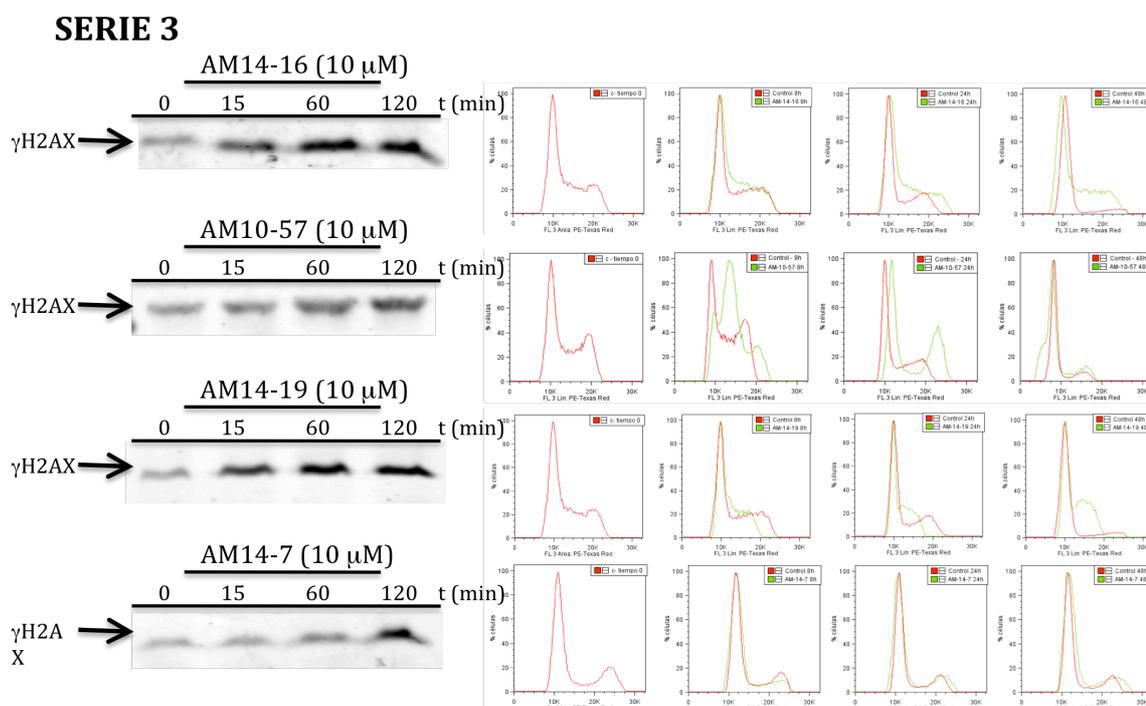


Fig. 4.48. Efecto de las indenoisoquinolinas de la serie 2 a una concentración fija de 10 μ M sobre la fosforilación de la histona γ H2A de *L. infantum* a diferentes tiempos. En los paneles de la derecha aparece el ciclo celular de los promastigotes tratados (verde) y sin tratar (rojo) a 0, 8 h, 24 h y 48 h después de la adición del compuesto.

Se puede observar en todos los casos que las dos sustituciones realizadas en posición C₃ y C₉ del farmacóforo de referencia TN1-62 daban moléculas activas que introducían daños de cadena doble en el DNA. Algunas de estas moléculas: AM14-58 (OCH₃ en C₉), AM14-32 (OEt en C₉) y AM10-30 (Br en C₉) producían el daño máximo en el DNA en apenas 15 min. A pesar del daño inducido, sólo AM14-58 y en menor medida AM12-21 indujeron arresto en fase M – que no pudo ser recuperado con el primero de los compuestos – 8 h después de su adición al cultivo.

Serie 3: 3-Nitro, 9-metoxi-derivados de la indeno [1,2] isoquinolina – 5,11 (-)-diona

La serie 3 de compuestos derivados del núcleo de la 3-nitro, 9-metoxi indenoisoquinolina 5-11 diona, estaba constituida por varios subgrupos de compuestos. En primer lugar se estudió el papel de la sustitución de grupos dimetilaminopropil (compuesto AM14-21), morfolino-propil (compuesto AM14-16), imidazolil-propil (compuesto AM14-19) y yodopropil (compuesto AM14-9) en posición N₆ por el grupo aminopropil del compuesto TN1-62 que servía de referencia.



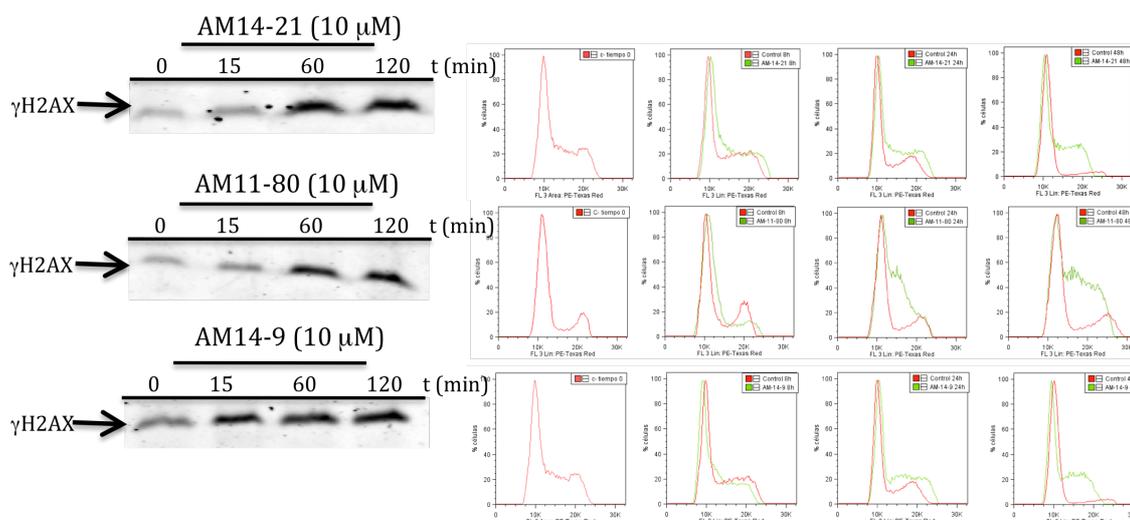


Fig. 4.49. Efecto de las indenoisoquinolinas de la serie 3 a una concentración fija de 10 μM sobre la fosforilación de la histona γH2A de *L. infantum* a diferentes tiempos. La hibridación específica con el anticuerpo policlonal originó una banda de 14 kDa que se corresponde con la histona γH2A. En los paneles de la derecha aparece el ciclo celular de los promastigotes tratados (verde) y sin tratar (rojo) a 0, 8 h, 24 h y 48 h después de la adición del compuesto.

En la misma tónica que con los compuestos de la serie anterior, la serie 3 daba moléculas activas que introducían daños de cadena doble en el DNA y originaba arresto del ciclo celular. Algunas de estas moléculas: AM14-16, AM10-57, AM14-19 y AM14-9 producían el daño máximo en el DNA en apenas 15 min, e inducían arresto en fase M – 8 h después de la adición del compuesto, que en la mayoría de los casos se recuperaba a las 48 h (con excepción de AM11-80 y AM14-21, que además producían el daño en el DNA a partir de los 60 min).

Serie 4: 3-Nitro-derivados de la piridino [1,2] isoquinolina – 5,11 (--) diona

Los compuestos de la serie 4 incluyen la modificación de sustituir el grupo fenilo de la indeno 1,6 diona por una piridina. A partir de este nuevo farmacóforo se realizaron sustituciones en N₆ (dimetilpropilamino, morfolinopropil e imidazolilpropil) en N₆. Estos compuestos se analizaron en promastigotes de *L. infantum* a la concentración única de 10 μM, estudiándose a continuación el daño provocado en el DNA y las alteraciones en el ciclo celular a los tiempos indicados, de manera semejante a como se había hecho con las series anteriores (Fig. 4.50).

SERIE 4

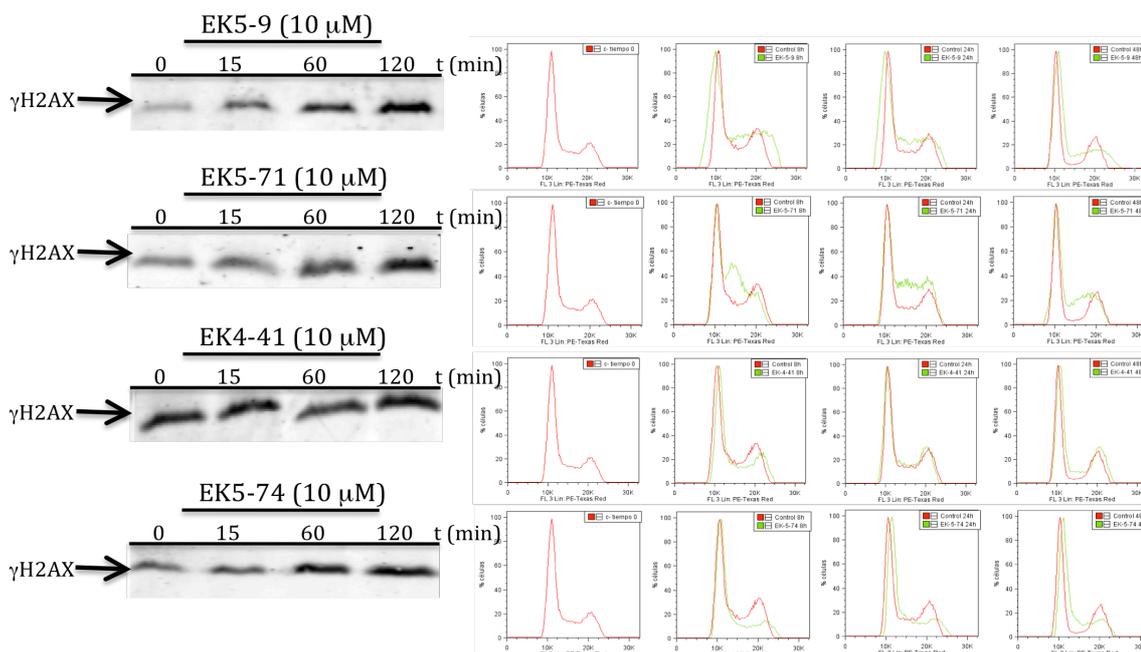


Fig. 4.50. Efecto de las indenoisoquinolinas de la serie 4 a una concentración fija de $10 \mu\text{M}$ sobre la fosforilación de la histona γH2A de *L. infantum* a diferentes tiempos. La hibridación específica con el anticuerpo policlonal originó una banda de 14 kDa que se corresponde con la histona γH2A . En los paneles de la derecha aparece el ciclo celular de los promastigotes tratados (verde) y sin tratar (rojo) a 0, 8 h, 24 h y 48 h después de la adición del compuesto.

La introducción del heterociclo de piridina en el fármacofoero de la indenoisoquinolina produjo compuestos mucho menos efectivos en la rotura de DNA de doble cadena que los de las series anteriores. Apenas los compuestos EK5-9 y EK5-71 ambos con un radical morfolino propil en N_6 inducían daño reparable en el DNA arresto en fase M – 8 h después de la adición del compuesto.

Serie 6: Derivados 12H-5, 11a-diaza-dibenzo [b,h] fluoren 11-ona (aromatecinas)

Los derivados del dibenzofluoreno (aromatecinas) no habían mostrado efectos de mellado sobre el DNA, por lo que únicamente se testaron dos moléculas sobre la fosforilación de la histona γH2A . El compuesto MC2-8 con una sustitución butanodiaminometil y el compuesto AM17-74 con una sustitución N-etanolaminopropil en el C_{14} del farmacóforo. Los dos compuestos se analizaron en promastigotes de *L. infantum* a la concentración única de $10 \mu\text{M}$, estudiándose a

continuación el daño provocado en el DNA y las alteraciones en el ciclo celular a los tiempos indicados (Fig. 4.51).

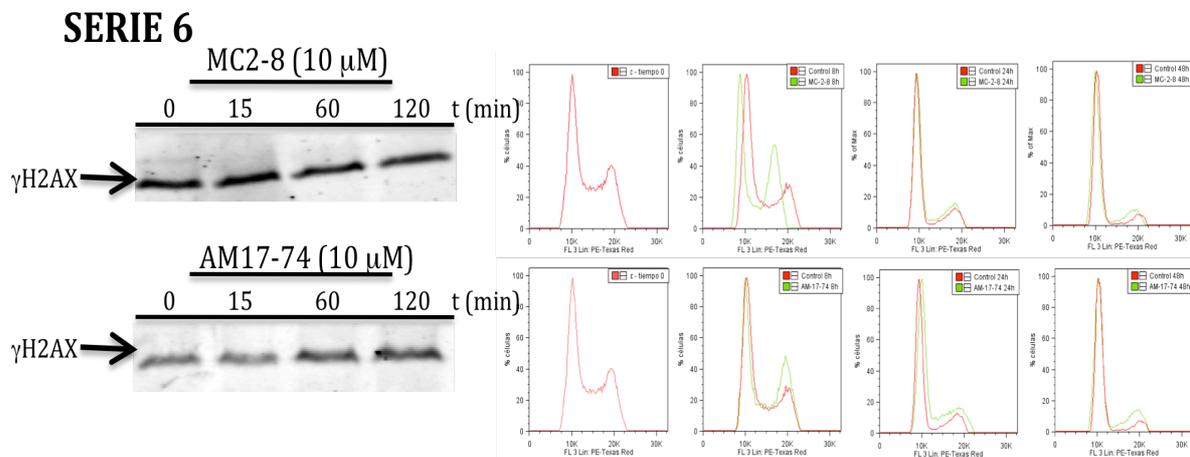


Fig. 4.51. Efecto de las indenoisoquinolinas de la serie 6 a una concentración fija de 10 μ M sobre la fosforilación de la histona γ H2A de *L. infantum* a diferentes tiempos. La hibridación específica con el anticuerpo policlonal originó una banda de 14 kDa que se corresponde con la histona γ H2A. En los paneles de la derecha aparece el ciclo celular de los promastigotes tratados (verde) y sin tratar (rojo) a 0, 8 h, 24 h y 48 h después de la adición del compuesto.

Como era de esperar ninguno de los dos compuestos introdujo modificaciones en la estructura del DNA, ni se produjo un arresto del ciclo celular.

5. discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. DIMENSIÓN DEL PROBLEMA

Como introducimos al comienzo de esta Memoria, las NTD son patologías que reciben escasa o nula atención de las grandes empresas farmacéuticas debido principalmente al escaso margen de ganancia asociado al desarrollo de nuevos tratamientos. Tradicionalmente, el sector académico ha participado activamente en el desarrollo de nuevos fármacos enfocando su investigación en las etapas iniciales de la enfermedad, la identificación de nuevas dianas para el desarrollo de drogas y el descubrimiento de nuevas entidades químicas. Sin embargo, desde hace un par de décadas la Industria Farmacéutica se ha ido alejando del sector académico produciéndose una brecha que dificulta el paso a las instancias ulteriores del desarrollo de moléculas activas que inevitablemente recaen en el sector privado. Todas estas premisas son aún más acuciantes con las NTDs, que a pesar de tener un alto impacto en la población tienen una prevalencia significativa en países situados en la zona intertropical con condiciones higiénico-sanitarias, socioeconómicas y ambientales deficientes.

El término “desatendidas” se refiere a que estas enfermedades persisten exclusivamente en las poblaciones más pobres y marginadas, residentes de zonas rurales remotas, barrios suburbanos marginales, así como en zonas de conflicto en países en vías de desarrollo. Estas condiciones permiten la existencia de un hábitat adecuado para gran número de microorganismos, vectores y reservorios que afectan a una extensa capa poblacional con gran diversidad de características raciales, genéticas y culturales. Estas enfermedades, además de promover la pobreza, incapacitan, desfiguran, estigmatizan y perjudican el crecimiento físico y cognitivo de la población infantil. La OMS estima que las enfermedades asociadas con la pobreza son responsables del 45% de la carga total de enfermedades en los países en desarrollo. En la actualidad más de mil millones de personas (la sexta

parte de la población mundial) están afectadas por NTDs y 534.000 mueren anualmente debido a ellas.

El arsenal terapéutico actual contra estas enfermedades es por lo general inadecuado en términos de eficiencia, toxicidad y desarrollo de resistencias, sin embargo, ha permanecido prácticamente inalterado en los últimos 50 años. Por ejemplo, el tratamiento contra la tripanosomiasis africana depende de drogas altamente tóxicas que requieren administración intravenosa. La terapia contra la enfermedad de Chagas se limita al uso de nifurtimox y benznidazol, para las cuales, la toxicidad depende de la dosis, siendo efectivas sólo en la fase aguda de la enfermedad (Salomon, 2012). El tratamiento de las enfermedades causadas por gusanos (esquistosomiasis, filariasis linfática, oncocercosis) depende de unos pocos fármacos de características sub-óptimas (Müllner y col., 2011). En resumen, las quimioterapias disponibles tienen serias limitaciones que incluyen la generación de resistencias, costos elevados, administración parenteral, extensos regímenes de tratamiento, intolerancia gastrointestinal, nefrotoxicidad y teratogenicidad. Si bien se están realizando importantes avances en el desarrollo de vacunas, todavía falta un largo camino por recorrer para que puedan ser aplicadas. Este contexto genera una urgente necesidad de desarrollar nuevos candidatos para el tratamiento quimioterapéutico de estas enfermedades con mejoras sustanciales en sus características farmacológicas.

Históricamente el ciclo de innovación farmacológica comienza con la investigación básica, seguido del traslado del descubrimiento a la producción del compuesto, su desarrollo, la regulación asociada, la comercialización y finalmente el impacto que produce en la salud. Este proceso dura típicamente de 10 a 15 años, y cuesta entre 400 y 700 millones de euros, de acuerdo a las estimaciones de la industria farmacéutica. Este proceso complejo, largo y costoso, constituye un problema aún más difícil de resolver cuando tratamos con enfermedades que afectan desproporcionadamente a poblaciones pobres y marginadas. Los rendimientos bajos de la inversión, desalientan a la industria farmacéutica en asignar recursos para abordar estos desarrollos y una cultura académica que recompensa las publicaciones por encima del beneficio de la sociedad, ha exacerbado aún más el problema. Esta disparidad en la inversión destinada a la

investigación de las NTDs ha dado lugar al llamado “gap” 10/90, un término establecido por el Global Forum for Health Research, para indicar que solo el 10 % de la inversión en I+D está dirigido a los problemas de salud originados por las NTDs. Durante la última década se ha producido un avance en la solución de este problema, con la aparición de una serie de sociedades públicas-privadas formadas por organizaciones no gubernamentales (ONGs), empresas farmacéuticas multinacionales y pequeñas firmas biotecnológicas en sociación con organismos públicos conocidas como PPPs (del inglés: Public Private Partnerships). Estas sociedades son gerenciadas por un cuerpo ejecutivo que se rige por los criterios utilizados en las empresas farmacéuticas, con la diferencia que no se persigue el beneficio económico.

La investigación en NTDs en ámbitos académicos ha sido constante y éste esfuerzo afortunadamente se ha potenciado en años recientes con el impulso recibido por estas organizaciones. Sin embargo, el producto de éstos avances no ha sido todavía explotado por la industria farmacéutica. Si bien el factor principal de la falta de interés de la industria ha sido la ausencia de un mercado atractivo desde el punto de vista comercial, la protección de los resultados por parte de integrantes del sistema científico se ve como un obstáculo más a la hora de avanzar en éstos desarrollos. De este modo, tanto en círculos académicos, como en éstas organizaciones, se contempla la no protección de los descubrimientos o la liberación de los derechos como una forma de acelerar el proceso. Ciertos grupos han propuesto un sistema de libre acceso a la información de manera similar al usado en el desarrollo de software libre (“open source”), o de manera más radical cambiando el sistema de protección de la propiedad intelectual con la creación de un fondo global que premie a las investigaciones que bajen la mortalidad y morbilidad que causan estas enfermedades.

Las leishmaniosis forman parte de estas NTDs cuya prevalencia es mucho mayor en países subdesarrollados o en vías de desarrollo. Sin embargo, los países desarrollados, en los que se pensaba que estas enfermedades habían sido erradicadas desde hace años, están comenzando a sufrir cada vez más casos de leishmaniosis. Esto se puede deber principalmente al aumento del turismo, tropas destinadas en áreas endémicas, flujos migratorios, especies domésticas que actúan

como reservorios y probablemente a los cambios climáticos actuales (Ready, 2010; Schwartz y col., 2006). Durante décadas, se ha utilizado como primera línea de tratamiento los ya desfasados derivados del Sb^V (Aït-Oudhia y col., 2011). Aunque recientemente se han introducido nuevos fármacos más seguros y de mayor efectividad para remplazar a los Sb^V, éstos siguen siendo tóxicos, producen una rápida aparición de resistencias, y en algunos casos no pueden ser administrados durante la gestación (Bhattacharya y col., 2007; Berman y col., 2005). Debido a esto, la búsqueda de nuevos compuestos frente a estas enfermedades se ha vuelto una prioridad ya que la posibilidad de generar vacunas efectivas a corto plazo es remota. A principios de este siglo, se identificaron las Top1B como dianas potenciales de intervención terapéutica frente a *Leishmania* y otros tripanosomátidos (Bakshi y Shapiro, 2003; Balaña-Fouce y col., 2006; Balaña-Fouce y col., 2008).

La elección de esta nueva diana se basa principalmente en dos razones: i) la expresión de la enzima es muy elevada durante la replicación del parásito, de forma similar a lo observado en el caso de las células tumorales, y especialmente ii) la enzima del patógeno difiere estructuralmente de la del hospedador (Villa y col., 2003).

5.2. UN NUEVO TEST FENOTÍPICO

En esta Memoria de Doctorado presentamos una plataforma robusta para el cribado masivo de compuestos bajo los principios de HTS basada en el uso de una cepa de *L. infantum* transformada con una ORF codificante de la proteína fluorescente infrarroja iRFP del fitocromo de *Rhodospseudomonas palustris*. A diferencia de otros reporteros fluorescentes cuyas longitudes de onda de emisión están en el espectro visible, las proteínas fluorescentes que emiten en el infrarrojo cercano mejoran las propiedades ópticas ya que minimizan la absorción debida a otros componentes de los medios de cultivo como proteínas y lípidos, así como de dispersión de luz (Shu y col., 2009). Además, la emisión de fluorescencia de este reportero se ha mejorado a través de la integración estable de su ORF en alguno de los loci del rRNA 18S, que permite la expresión de proteínas, a la vez que evita la necesidad de introducir un antibiótico de selección (Singh y col., 2009). La cepa modificada con estas condiciones es estable genéticamente, mantiene su virulencia

a través de pases en ratones y la emisión de su señal puede detectarse fácilmente en un sistema de imágenes infrarrojo Odyssey (Calvo y col., en prensa).

Una vez seleccionada la cepa, se evaluó su aplicabilidad para su uso en el descubrimiento de moléculas pequeñas activas frente a *Leishmania*. Ya que los amastigotes de *Leishmania* crecen dentro de las vacuolas parasitóforas del hospedador definitivo, la potencia del nuevo compuesto no es la única condición para la identificación de una molécula “hit” sino la capacidad selectiva de matar el parásito sin afectar a las células que lo albergan. Por lo tanto, un HTS de *Leishmania* debe contemplar este punto, alejándose de los cultivos de formas de vida libre como los promastigotes. En este punto se han planteado sistemas de imagen de alto contenido (HCS) en amastigotes axénicos (De Rycker y col., 2013) e infecciones experimentales en líneas celulares de monocitos diferenciados en macrófagos, como las THP-1 de origen humano (Siqueira-Neto y col., 2012) o en cultivos primarios de macrófagos murinos (Aulner y col., 2013). Todas estas aproximaciones tienen ventajas e inconvenientes para su estandarización como HTS.

- i. Los sistemas de imagen HCS son muy laboriosos y requieren de equipos extremadamente costosos en la actualidad.
- ii. Los cultivos de amastigotes axénicos de *Leishmania* son fáciles de utilizar pero son formas artificiales – resultado de la transformación morfológica por pH y temperatura de los promastigotes – que tienen diferencias notables con los amastigotes aislados de lesión (Pescher y col., 2011). Además, su respuesta a fármacos es más parecida a la de los promastigotes (De Rycker y col., 2013).
- iii. Las infecciones experimentales en líneas de macrófagos también han sido cuestionadas (Seifert y col., 2010). En primer lugar porque metodológicamente tienen pasos tediosos que alejan a la técnica de ser HTS. En segundo lugar porque es difícil eliminar los promastigotes que no han sido fagocitados por los macrófagos y pueden dar falsos positivos.

El explante *ex vivo* de un cultivo primario de células infectadas naturalmente

in vivo con parásitos (*Leishmania*) fluorescentes tiene una serie de ventajas que le convierten en un potencial sistema HTS con grandes posibilidades:

- i. los parásitos vivos los únicos capaces de emitir fluorescencia sin necesidad de usar un sustrato y por lo tanto de ser detectados en el interior de la célula hospedadora.
- ii. las células cultivadas se han infectado de forma natural dentro del entorno fisiológico e inmunológico del hospedador (Osorio y col., 2011).
- iii. el explante *ex vivo* es un cultivo primario que contiene la variedad completa de las células que permiten la progresión parásito en el órgano infectado, y no sólo dentro de los macrófagos.
- iv. desde un punto de vista de laboratorio, la manipulación es mínima y permite utilizar el formato placa de 384 pocillos, lo que supone poder detectar más de 500 compuestos a partir de un único animal infectado.

En la presente Memoria describimos el desarrollo de un explante de bazo murino como sistema de detección primaria de moléculas activas frente a *L. infantum*. Para ello se infectaron ratones BALB/c con promastigotes metacíclicos de *L. infantum*, que originan después de un periodo de 5 a 7 semanas las lesiones típicas de leishmaniasis visceral: i) marcada esplenomegalia; ii) elevada carga parasitaria de los órganos afectados y iii) pérdida de la proliferación en células esplénicas. El sistema reúne las reglas básicas definidas previamente por Croft como ideales para un sistema de detección masivo de fármacos en tripanosomátidos (Croft, 1986): i) utilización de las formas del parásito específicas del hospedador; ii) La señal de fluorescencia del explante guarda correlación con el número de amastigotes, lo que hace que el sistema puede adaptarse fácilmente a ensayos cuantitativos; iii) la potencia del fármaco es fácilmente cuantificable por los cambios en la señal de fluorescencia infrarroja.

Durante el proceso de estandarización del método, usamos AMPB – un fármaco estándar de uso clínico para la leishmaniasis visceral – que mostró una actividad leishmanicida frente a amastigotes a concentraciones cercanas a las alcanzadas en el suero de animales tratados (Bekersky y col., 2002). Simultáneamente se evaluaron 298 compuestos procedentes de tres colecciones

diferentes de fármacos de estructura variable; podofilotoxinas, combrestatinas, quinonas, β -carbolidinas e indenoisoquinolinas (Calvo y col., en prensa).

5.3. COMPUESTOS CON ESTRUCTURA INDENOISOQUINOLÍNICA

En 1990 Kurt Kohn lanzó la hipótesis de que los inhibidores de Top atrapan los complejos CL en la interfase de la unión enzima con el DNA y propuso que estos compuestos se apilan entre los pares de bases que flanquean el sitio de CL debido a su estructura aromática plana. Otros enlaces adicionales facilitarían la interacción del inhibidor con la enzima. Este modelo interfacial ha sido validado posteriormente con los co-cristales de las hTopIB con CPTs, indenoisoquinolinas e indolocarbazoles al DNA (Staker y col., 2005; Ioanoviciu y col., 2005; Marchand y col., 2006). Al igual que otros inhibidores de TopIB las indenoisoquinolinas se unen en la interfaz de los complejos de CL intercalando en el sitio de escisión (interacciones π - π) mediante la formación de una red de enlaces por puentes de H con aminoácidos de la enzima implicados en la resistencia a CPT (Pommier, 2009) (Fig. 6.1).

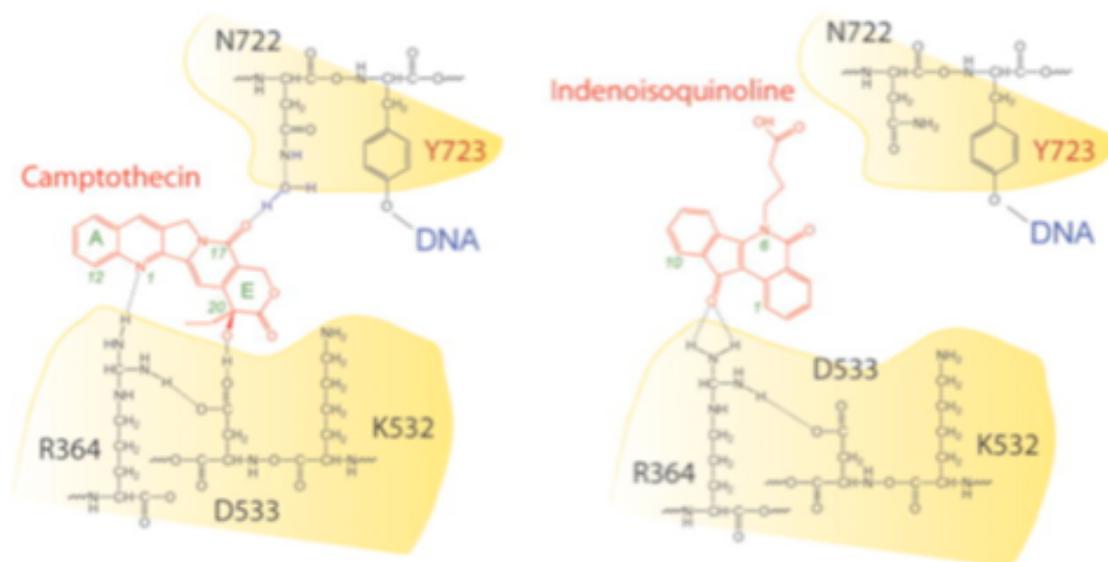


Figura 6.1. Esquema de la inhibición interfacial de la hTopIB por CPT (izda.) e indenoisoquinolinas (der.) mostrando los aminoácidos involucrados en la formación de complejos CL con el DNA (Pommier, 2009).

La importancia de la inhibición en la interfase enzimática ha demostrado su valor en la fase inicial del descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural, y para el establecimiento de ensayos de alto rendimiento basados en la mejora de la inhibición de la unión macromolecular basada en un único lugar de acción.

Las CPTs son los únicos inhibidores de la TopIB aprobados clínicamente para cánceres de colon, pulmón y de ovario (Teicher, 2008; Burgess y col., 2008). Sin embargo la CPT y sus derivados tienen una serie de limitaciones: i) las CPTs son químicamente inestables y rápidamente se inactivan a la forma carboxilato en sangre (Pommier, 2006); ii) los complejos CL revierten en cuestión de minutos después de la eliminación del fármaco, lo que supone la administración continuada del fármaco en forma de infusión (Teicher, 2008); iii) las células que sobreexpresan los transportadores ABCG2 y ABCB1 producen resistencia cruzada a CPTs (Brangi y col., 1999); iv) los efectos secundarios de las CPTs limitan su dosificación y son potencialmente graves (diarrea y neutropenia) (Rivory, 1996).

Las indenoisoquinolinas tienen varias características favorables: i) a diferencia de las CPTs, las indenoisoquinolinas son entidades químicamente estables (Kohlhagen y col., 1998); ii) forman complejos CL en secuencias de DNA diferentes de las CPTs lo que sugiere una diferenciación en la inactivación de genes diana (Strumberg y col., 1999); iii) su actividad anti-proliferativa es similar o superior a la de las CPTs en los paneles de líneas tumorales ensayadas (Cushman y col., 2000); iv) se dirigen selectivamente sobre la TopIB eucariota; v) no son sustratos de transportadores de membrana ABC, lo que sugiere una capacidad intrínseca para superar la resistencia a CPTs (Antony y col., 2007); vi) su actividad antitumoral en modelos animales es superior, lo que sugiere que las dosis terapéuticas en ratones podrían ser alcanzables en humanos (Antony y col., 2005).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se validó el potencial leishmanicida de una serie de derivados de la CPT en un modelo de esplenocitos murinos infectados con una cepa de *L. infantum* que expresa la proteína de fluorescencia infrarroja 1 (IFP1.4) (Prada y col., 2013; Balaña-Fouce y col., 2012b). Para todos los compuestos, la sensibilidad de la forma amastigote fue mucho mayor que la de los promastigotes. Este hecho no es inesperado ya que muchas

drogas con diferentes dianas intracelulares se han manifestado de la misma manera (Coombs y col., 1983). Además, uno de estos análogos – el gimitecan – presentaba un índice selectivo superior a 170, tres veces mayor al obtenido para la miltefosina, uno de los tratamientos clínicos actuales de la enfermedad. De la misma manera que las CPTs las indenoisoquinolinas actúan como venenos TopIB sobre la enzima de *Leishmania* operando dentro del rango micro/nanomolar. Esta característica, ya estudiada en células tumorales y que nuestro grupo ha explorado con otros compuestos estructuralmente semejantes en estudios previos (Prada y col., 2012), nos ha servido para poder ir otorgando un mecanismo de acción primario a todas las moléculas que resultaron potencialmente activas en el cribado HTS frente al patógeno. De la misma manera se estudió el resultado de dicha inhibición, la fragmentación de doble cadena del DNA nuclear – medido como la capacidad de fosforilar la histona γ H2A – y sus consecuencias en el ciclo celular en las primeras horas de exposición a los compuestos químicos.

Los resultados presentados en la Memoria con las distintas series de indenoisoquinolinas demuestran igualmente la mayor sensibilidad de los amastigotes sobre los promastigotes a estos compuestos. Además, un gran porcentaje (67 %) de las indenoisoquinolinas analizadas en el explante fueron “hits” de acuerdo a los criterios de astringencia al que fueron sometidos los compuestos en el HTS. De todos los compuestos, los pertenecientes a las series 1, 2 y 3 fueron los que mostraron una actividad leishmanicida mayor, y salvo excepciones, todos traspasaron el umbral para ser considerados “hit” comparados con la AMPB, el control positivo con que fue estandarizado el protocolo.

Estudios previos realizados en *T. brucei* demuestran que el núcleo del fármacofo (Fig. 6.2, donde R1 = R2 = R3 = H) era esencialmente inactivo (<20% de inhibición a una concentración de 10 μ M) (Bakshi y col., 2009). Sin embargo, la sustitución en estas posiciones por grupos aceptores de electrones convirtió a estas moléculas en “hits” potenciales en el ensayo HTS: N6, C3 y C9. Los compuestos activos tuvieron una cadena alquil-amina de diferente longitud en N6 que le proporcionaba carga positiva a la molécula en las condiciones de ensayo. Los compuestos de la serie 1 con un único sustituyente R1 en N6 diferían en la longitud

del alquilo desde la etil- (TN1-61), propil- (TN1-62), butil- (TN1-65) y hexil-amina (TN1-75).

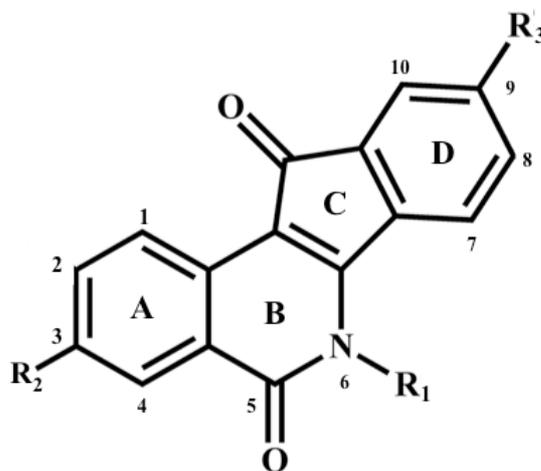


Figura 6.2. Estructura básica del farmacóforo de la indenoisoquinolina con la posición de los tres sustituyentes principales

Los resultados obtenidos en explantes murinos demuestran que el compuesto con mayor potencia leishmanicida ($0,12 \mu\text{M}$) y mayor IS (4,9) era TN1-62, que se correspondía con un grupo propilamino en N6. Este compuesto además, producía la inhibición de LdTopIB recombinante a una concentración $> 0,01 \mu\text{M}$ ($\text{IC}_{50} = 5 \text{ nM}$, en un ensayo de inhibición de la relajación) y era claramente selectivo sobre la enzima del patógeno ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ sobre hTopIB). Merece la pena mencionar que el efecto de estos compuestos inhibiendo el ensayo de relajación del DNA superenrollado no tuvo reflejo en la ruptura del mismo y la formación de complejos CL. Esto se demuestra en los ensayos de relajación/cleavage realizados en geles de agarosa en presencia de BrEt y en el gen de secuenciación de urea de la Fig. ZXC donde se muestra el efecto de varias indenoisoquinolinas (incluida TN1-65), usando GMT como control positivo. Esta molécula (y por inferencia, el resto de la serie 1), no es capaz de producir roturas de cadena sencilla (CL) en el DNA cebo utilizado en el ensayo. A pesar de la incapacidad de los compuestos de la serie 1 de producir roturas de cadena sencilla, los resultados demuestran que al menos TN1-62 previno significativamente la formación de complejos CL por la CPT con LdTopIB. Merece la pena señalar que la banda de ADN relajado que aparece con

las dos enzimas en presencia de cantidades saturantes de CPT, desaparece con la TN1-62 que tiene la capacidad de prevenir la relajación aún en presencia de CPT.

Más significativos son los resultados obtenidos de las análisis de Western realizados con los extractos de promastigotes expuestos a los compuestos de la serie 1. El efecto sobre la fosforilación de la histona γ H2AX de los promastigotes incubados con una concentración de 10 μ M de TN1-62 fue muy significativo. Este efecto no se pudo observar con TN1-61 (amino-etil en N6) y TN1-65 (aminobutil en N6) pero podían observarse – aunque en una menor intensidad – con el compuesto TN1-75 (aminohexil en N6). De estos resultados podemos deducir que la presencia de TN1-62 alerta a la célula de una rotura de doble cadena en su DNA y pone en funcionamiento los sistemas de reparación basados en mecanismos de recombinación homóloga parando el ciclo celular. Estos compuestos han sido definidos fundamentalmente como intercalantes, actuando el N protonable del grupo amino como lugar de interacción con los grupos fosfodiéster del esqueleto del ácido nucleico donde debe situarse la indenoisoquinolina para su unión dentro del complejo ternario que contiene el inhibidor, el DNA y la proteína (Cushman et al., 2000). Es por lo tanto difícil de explicar cómo estos compuestos que no producen complejos de CL mediados por LdTopIB, puedan sin embargo inducir los sistemas de reparación de roturas de doble cadena (DSBs). Este tipo de daño puede tener graves consecuencias para la célula, la cual no podrá mantener la estabilidad de su genoma o viabilidad.

Los mecanismos de reparación homólogos como la unión de extremos no homólogos, requieren la alteración de la compactación del DNA para permitir el acceso de las enzimas involucradas en los mismos. La unidad fundamental que constituye la cromatina es el nucleosoma, formado por un octámero compuesto por dos unidades de cuatro histonas cada una, H2A, H2B, H3 y H4, sobre las que se envuelven aproximadamente 150 pb del DNA. Las modificaciones post-traduccionales de las histonas o el remplazo de las mismas por algunas de sus variantes, produce cambios en el empaquetamiento del DNA que facilita el acceso de las enzimas de reparación o control transcripcional.

La histona γ H2A incluye tres subfamilias, H2A1-H2A2, H2AZ y H2AX. En las

células de mamífero, la fosforilación de la histona H2AX en la Ser-139, es un tipo de señalización que se produce de manera temprana y predominante en las roturas DSB, utilizándose para su cuantificación (Rothkamm y Löbrich; 2003). Sin embargo, se ha identificado también, como respuesta a este tipo de daño, otro lugar de fosforilación correspondiente a la Thr-142 (Singh y col., 2012). Los tripanosomátidos solamente poseen una variante de H2A, la cual parece ser homóloga a H2AZ (Alsford y Horn; 2004). La fosforilación de H2A como respuesta al daño de doble cadena, se ha identificado en *T. brucei*, donde la Thr-130 sería el aminoácido fosforilado (Glover y Horn, 2012).

Comparando las secuencias de esta proteína en *Leishmania* con la de otros organismos, encontramos que en este protozoo, la fosforilación también tendría lugar en la treonina mencionada y en base a ello diseñamos un fosfo-péptido con el que inmunizamos un conejo y cuyo anticuerpo que ha podido identificar el daño de doble cadena producido por inhibidores de la TopIB, de los cuales se tienen referencias sobre su capacidad para inducir este tipo de señalización.

Los inhibidores de Top I y II estabilizan las roturas transitorias formadas en el DNA durante su mecanismo de acción, formando complejos CL generando roturas DSB en el material genético. Estas colisiones también pueden producirse entre la RNA polimerasa y el complejo en el DNA que está siendo transcrito (Hsiang y col., 1989; D'Arpa y col., 1990). Estudios realizados con células de mamífero indican que los inhibidores de TopI inducen la fosforilación de la histona H2AX en células que se encuentran fundamentalmente en fase S, mientras que los inhibidores de TopII inducen la fosforilación en todas las fases (Huang y col., 2004).

Las proteínas responsables de la fosforilación de la histona son las pertenecientes a la familia fosfatidilinositol-3-quinasa "like", que incluye las quinasas ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada), ATR (Ataxia Telangiectasia-Rad3) y DNA-PK (proteín quinasa dependiente de DNA). Aunque todas ellas podrían participar en el proceso, ATM parece ser la actúa en mayor medida en respuesta al daño de cadena simple que ocasiona el estancamiento de horquilla de replicación generando el daño de doble cadena; mientras que ATR se induce tras el daño del DNA de cadena sencilla que surge en los procesos de reparación por escisión de

nucleotido (NER) (Kinner y col., 2008; Katsube y col., 2014). En los proteomas predictivos de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *T. cruzi* y *T. brucei* se han identificado fosfatidilinositol quinasa similares, en concreto las proteínas codificadas por LmjF02.0120, LbrM02_V2.0130 y LinfJ02_V3.0100 serían homologas a ATM, mientras que en *L. major*, *L. braziliensis* y *L. infantum*; los genes LmjF32.1460, LbrM32_V2.1620 y LinJ32_V3.1520 codificarían proteínas homólogas a ATR (Bahia y col., 2009).

La wortmanina – un esteroide procedente del hongo filamentoso *Penicillium funiculosum* – inhibe las ATMs de mamífero a concentraciones nanomolares y las ATRs a concentraciones mayores (Sarkaria y col., 1998) Hemos probado el efecto de este inhibidor sobre la fosforilación de la histona H2A. Para ello tratamos promastigotes de *Leishmania* con 20 μ M wortmanina, una concentración capaz de inhibir ATM en células Hela pero no ATR, que requerirá concentraciones de hasta 100 μ M (Wang y col., 2005). La cafeína se ha usado también para el estudio de sistemas de señalización y puntos de control, mediados por ATM y ATR, debido a su capacidad para inhibir dichas enzimas (Sarkaria y col., 1999). Por ello, examinamos el efecto de la cafeína a una concentración de 4 mM.

Según nuestros resultados, las células tratadas con wortmanina, CPTs e indenoisoquinolinas, muestran un descenso en los niveles de fosforilación de la histona, lo que podría deberse a la inhibición de ATM. A pesar del descenso en los niveles de fosforilación detectados en presencia de los dos inhibidores, son mayores que los de las células control, por lo que la fosforilación podría producirse por la acción de ATR.

En los compuestos de la serie 2, bajo la estructura constante de TN1-62, se introdujeron dos modificaciones polares en C3 – un grupo NO₂ invariable – y en C9 un grupo éster (metoxi-, acetoxi- o etanol) o halógeno (Br-, I-). El resultado es que todos los compuestos fueron “hits” en el cribado HTS manteniendo una mayor actividad leishmanicida frente amastigotes axénicos que sobre promastigotes. Además, todos los compuestos tuvieron una CI₅₀ (amastigotes de explante) e IS semejantes a la de su compuesto de cabecera (TN1-62), lo que nos indica que estas sustituciones no mejoran su actividad leishmanicida ni su citotoxicidad.

Sin embargo, los estudios realizados sobre las enzimas recombinantes tanto de *Leishmania* como de humana demuestran que todos los componentes de la serie 2 son capaces de inducir complejos CL en el DNA sustrato cuando se incuban en presencia de la enzima humana y en la mayoría de los casos del patógeno. Este efecto de ruptura del DNA puede ser atribuido al grupo NO₂ en posición C3 ya que los compuestos AM14-7, AM10-63 y AM10-57 de la serie 3 carecen de sustituyente en posición C9 y mantienen la capacidad de producir la ruptura del DNA en presencia de hTopIB. Con todos los compuestos de la serie se pudo observar que la capacidad de formar complejos CL era muy superior con la enzima recombinante de origen humano que con la de *Leishmania*. De hecho, cuando se realizaron estudios de cleavage en geles de secuenciación de urea con el compuesto AM14-67 no se pudieron observar bandas específicas de CL. Este efecto ya se había observado con otros derivados CPTs (Prada y col., 2013) e indenoisoquinolínicos (Bakshi y col., 2009; Balaña-Fouce y col., 2012) y puede atribuirse a la diferente estructura de la LdTopIB (complejo heterodimérico) respecto a hTopIB (enzima monomérica). Por su parte los resultados de competición demuestran que la banda de ADN relajado que aparece con la dos enzimas en presencia de cantidades saturantes de CPT, desaparecen al añadir AM 14-58 que tiene la capacidad de prevenir la relajación aún en presencia de CPT.

La introducción del grupo NO₂ en posición N6 tiene un resultado evidente sobre la fragmentación del DNA en promastigotes. Todos los compuestos de la serie introducían daños de cadena doble en el DNA. Algunas de estas moléculas: AM14-58 (OCH₃ en C9), AM14-32 (OEt en C9) y AM10-30 (Br en C9) producían el daño máximo en el DNA genómico en apenas 15 min y parada del ciclo celular a tiempos cortos.

Dejando establecido el papel del grupo NO₂ en posición N6 y su efecto en la producción de CL, se pasó a estudiar qué rol jugaba la polaridad del sustituyente R1 en posición N6. Teniendo en cuenta que la mayor actividad la proporciona la cadena de tres carbonos, se realizaron varias sustituciones que tenían un claro efecto sobre la carga final del radical (serie 3). El reemplazamiento del NH₂ terminal en R1 por un anillo de imidazol origina un compuesto con potencia aumentada (compuestos AM14-19 y AM10-57 vs. TN1-62).

Sin embargo, las relaciones estructura-actividad con grupos más voluminosos sustituyendo al grupo NH_2 del aminopropilo en posición N-6 (3-imidazolil-1-propil y morfolino propil) dieron lugar a compuestos con diferente acción leishmanicida. Mientras que el grupo imidazolil originaba compuestos con alta actividad inhibidora (AM10-57 y AM14-19) los que tenían un grupo morfolino en la misma posición eran menos activos (AM10-63 y AM14-16). Finalmente, los compuestos resultantes de sustituir el grupo amino por un halógeno, Br (AM12-13) ó I (AM14-9) fueron más citotóxicos y se ha propuesto que su actividad podría deberse a su capacidad de alquilar el DNA (Cushman y col., 2000).

La introducción de un puente metilendioxi entre las posiciones C8 y C9 mejora notablemente la potencia del compuesto AM4-42 con respecto a los compuestos TN1-62, AM14-7 y AM14-58. La importancia del puente metilendioxi es una reminiscencia de su papel en la mejora de la potencia de los análogos de la CPT y es consistente con la noción de que las indenoisoquinolinas actúan inhibiendo la TopIB. Esta afirmación se pudo constatar en el ensayo de formación de complejos CL en agarosa – donde se observó que no sólo se producía la inhibición de la relajación de DNA superenrollado a concentraciones nanomolares sino en un gel de secuenciación en urea a una concentración de 0,01 μM . Este efecto sobre la integridad del DNA originaba complejos CL diferentes a los observados con el GMT y otras CPTs, lo que nos indica que los lugares de estabilización de esta molécula no son coincidentes con los de los compuestos de estructura camptotecínica (Strumberg y col., 1999). Sin embargo, la presencia del grupo aminopropil en posición R_1 del N6 sigue siendo de capital importancia para mantener la actividad leishmanicida. Los compuestos MNR1-38 (imidotecan), MJIII-65 y BD-II-52 con modificaciones en esta posición que afectan al pK del N del grupo alquilamino, tuvieron un efecto mucho menor sobre la viabilidad del patógeno e inhibieron la actividad de la LdTopIB en el rango micromolar. Estos compuestos que portan una doble metoxilación en C2 y C3 tenían un cierto grado de hidrosolubilidad, característica deseable en una molécula en el contexto del desarrollo de fármacos. Sin embargo, a diferencia de *Leishmania*, la enzima humana era estabilizada formando complejos de CL que no volvían a religar con cualquiera de los tres compuestos a concentraciones nanomolares. Todos estos compuestos producían daños de doble cadena en el DNA y una significativa

inducción de la fosforilación de la histona H2AX en promastigotes de *Leishmania*, que podría justificarse por su potencial efecto sobre topoisomerasas de tipo II (Ahn y col., 2010). Este efecto confirmaba los resultados de Bakshi y colaboradores (2009) en *T. brucei* y sugerían una elevada toxicidad de los derivados de la 8,9-metilendideoxi-indenoisoquinolina en el tratamiento de estas enfermedades.

Tabla 6.1. Predicción *in silico* de las propiedades moleculares de las indenoisoquinolinas de las series 1, 2 y 3 analizadas en la presente Memoria.

Serie	compuesto	MW	CLog	HBA	HBD	cumplimiento
1	TN-1-61	310,96	1,151	4	0	4
	TN-1-62	322,96	1,509	4	0	4
	TN-1-65	334,96	1,867	4	0	4
	TN-1-75	358,96	2,583	4	0	4
2	AM-14-58	396,95	0,911	5	0	4
	AM-14-67	424,95	0,525	6	0	4
	AM-14-32	408,95	1,334	5	0	4
	AM-10-30	447,88	1,424	4	0	4
	AM-12-21	387,96	0,787	4	0	4
3	AM-14-7	408,95	0,774	5	0	4
	AM-14-9	474,89	2,478	4	0	4
	AM-14-16	460,95	1,14	6	0	4
	AM-12-13	525,81	3,061	3	0	3
	AM-14-19	411,99	1,231	6	0	4
	AM-14-21	420,95	1,54	5	0	4
	AM-10-57	418,96	1,925	5	0	4
	AM-10-63	432,95	1,322	5	0	4
	AM-11-80	380,99	1,179	5	0	4

HBA: Hydrogen Bond Acceptors
HBD: Hydrogen Bond Donors

Para que cualquier entidad química pueda completar con éxito la fase inicial del descubrimiento de fármacos, es necesario que tenga unas buenas propiedades farmacocinéticas y unos perfiles de toxicidad aceptables. En las Tablas 6.1 y 6.2 se presentan las propiedades moleculares de los compuestos de las series 1, 2 y 3 usando el paquete informático Drug Likeness Tool (DruLiTo) (http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.htm).

Se analizaron los cuatro parámetros seleccionados por Lipinski para tener una biodisponibilidad aceptable *in vivo*: coeficiente de reparto octanol/agua (ClogP) ≤ 5 , peso molecular (MW) ≤ 500 , número de aceptores por enlaces por puentes de H (HBA) ≤ 5 y número de donantes de enlaces por puentes de H (HBD) ≤ 10 . De acuerdo con Lipinski las moléculas que violen más de una estas reglas pueden tener algún efecto no deseable sobre sus propiedades farmacocinéticas (Lipinski y col., 2001). Dada la importancia de estas propiedades moleculares en la biodisponibilidad de las moléculas estudiadas, hicimos un estudio predictivo de dichos parámetros sobre las series 1, 2 y 3. De los resultados de la Tabla se predijo que con excepción del compuesto AM12-13 de la serie 2, con un MW > 500 Da, todos los compuestos cumplían las cuatro premisas. Es bien conocido que una sola violación de cualquier de estos parámetros Lipinski no tiene un efecto significativo sobre las propiedades farmacocinéticas del ligando, por lo que AM12-13 no tendría porqué ser rechazado como posible candidato.

Por lo tanto a partir del estudio de la predicción *in silico* de las propiedades moleculares, hemos llegado a la conclusión de que ninguna de las entidades químicas estudiadas hasta el momento tendrían ningún problema de biodisponibilidad.

Las dos series de aromatecinas sustituidas en C14 fueron preparadas a semejanza de estructuras activas frente a TopIB de la CPT, la luotonina (un producto natural aislado de *Peganum nigellastrum*) y las indenoisoquinolinas (Cinelli et al., 2008). La hidroxiaacuminatina es un producto natural heterocíclico raro aislado de *C. acuminata* que contiene el núcleo de la 12H-5,11a-diazadibenzo [b,h] fluoren-ona-11 no sustituido que se ha denominado rosettacina (Fig. 6.3). Los compuestos sustituidos de este farmacóforo se denominan aromatecinas debido a

la similitud en estructura y mecanismo de acción a los compuestos descritos en esta Memoria.

Tabla 6.2. Predicción *in silico* de las propiedades moleculares de las indenoisoquinolinas de las series 4, 5 y la bis-indenoisoquinolina AM8-3 analizadas en la presente Memoria.

Serie	compuesto	MW	CLog	HBA	HBD	cumplimiento
4	EK-4-41	340	0,956	6	0	4
	EK-5-9	409,98	-0,206	8	0	4
	EK-5-71	472,95	0,952	9	0	4
	EK-5-74	422,96	1,089	6	0	4
5	MJ-III-65	462,94	1,022	9	0	4
	NMR-I-38	472,95	2,173	9	0	4
	DB-II-52	467,97	0,04	10	0	4
	AM-8-3	611,99	2,922	8	0	3

HBA: Hydrogen Bond Acceptors
HBD: Hydrogen Bond Donors

Los resultados previos en líneas tumorales humanas apuntan a que estos compuestos tienen efecto antiproliferativo en numerosas líneas de células tumorales con resultados prometedores. Estos resultados establecen que el 14-sustitución, en su conjunto, sirve para mejorar inhibidora hTopIB y la potencia antiproliferativa.

Este efecto puede atribuirse a un aumento de la solubilidad (como se ve con las CPTs sustituidas en posición 7; topotecan e irinotecan), complementariedad de carga con el DNA y a la formación de enlaces de hidrógeno (tal y como se propone para las indenoisoquinolinas). Estos datos han servido para revitalizar el interés de esta clase de compuestos que anteriormente se consideraban inactivos, gracias a la sustitución en C14. La actividad leishmanicida de estos compuestos fue significativamente menor que la encontrada para CPTs e indenoisoquinolinas.

Además apenas se encontró correlación entre la actividad antiproliferativa y la inhibición de la TopIB por los compuestos MC2-8, AM17-72, AM17-74 y AM17-75 y la no aparente fragmentación de doble cadena del DNA, aunque todos ellos presentaban buenas condiciones para su administración in vivo (Tabla 6.3).

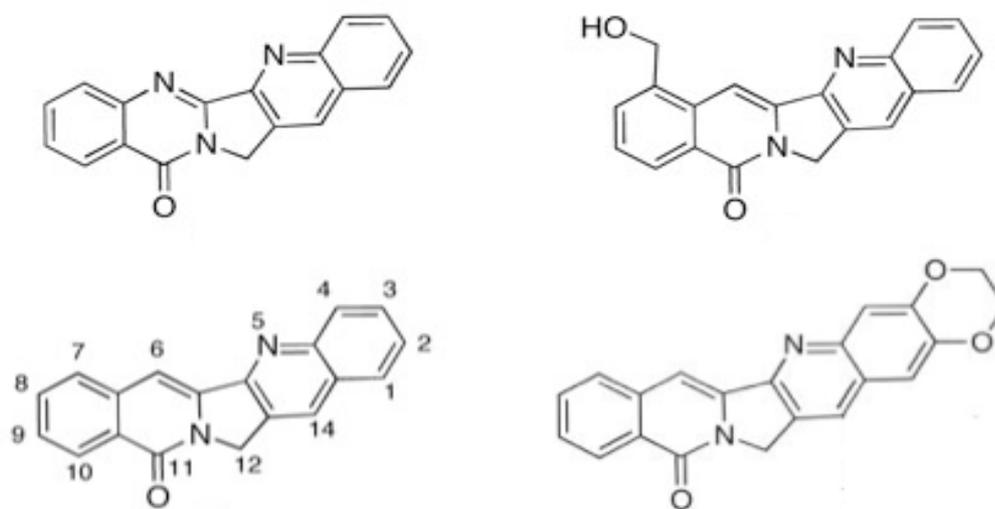


Figura 6.3. Estructura química de la luotonina (1), rosettacin (2) y de las aromatecinas 14- (3) y 1,4- (4) sustituidas empleadas en la Memoria.

Tabla 6.3. Predicción *in silico* de las propiedades moleculares de las aromatecinas de la serie 6 analizadas en la presente Memoria.

Serie	compuesto	MW	CLog	HBA	HBD	cumplimiento
6	MC-2-6	336,01	0,017	5	0	4
	MC-2-8	360,01	0,733	5	0	4
	AM-17-72	472,99	0	7	0	4
	AM-17-74	462,98	0	7	0	4
	AM-17-75	446,99	0	6	0	4
	MC-4-59	432,98	1,573	6	0	4

HBD: Hydrogen Bond Donors
HBA: Hydrogen Bond Acceptors

Estos análogos se ensayaron como inhibidores de TopIB y agentes antiproliferativos con resultados variables en un panel de células tumorales (Cinelli y col., 2010). El efecto leishmanicida de estos compuestos se ve claramente disminuido respecto a las aromatecinas tanto en promastigotes como en amastigotes. Además no se encuentra correlación entre la actividad anti-TopIB y la citotoxicidad de estos compuestos.

Los resultados de la presente Memoria, ponen de manifiesto la necesidad de nuevas herramientas que sirvan para cribar grandes números de pequeñas moléculas y que a su vez puedan ser evaluadas sobre una diana molecular prometedora para su optimización. Por un lado hemos desarrollado un sistema fenotípico de cribado que ha servido para seleccionar una serie de moléculas cuyo mecanismo de acción está basado en la inhibición de la TopIB. Esta diana molecular, que está siendo estudiada por nuestro grupo desde hace más de 10 años, difiere sustancialmente de la del hospedador, haciéndola especialmente atractiva en las fases preliminares del descubrimiento de fármacos. Gracias a los resultados de la presente Memoria se profundiza en el conocimiento de la LiTopIB y se abre el camino hacia un desarrollo racional de nuevos fármacos con una diana terapéutica claramente definida frente a las diversas formas de leishmaniosis.

6. conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La cepa de *Leishmania infantum* que emite fluorescencia en el infrarrojo cercano utilizada en la Memoria representa un importante paso adelante en la investigación bioimagen de la leishmaniasis visceral, proporcionando un modelo robusto de la detección fenotípica adecuado para plataforma HTS de colecciones o bibliotecas de pequeñas moléculas en explantes esplénicos de ratones BALB/c
2. De las tres colecciones de moléculas pequeñas cribadas – 298 en total - de acuerdo a la plataforma HTS de explantes murinos, 29 – un 10 % del total – fueron seleccionadas como “hits” con potencial leishmanicida semejante a la anfotericina B utilizada como control positivo. De estas 29 moléculas, 18 tenían estructura indenoisoquinolínica, lo que nos indica el importante potencial de estas moléculas frente a esta patógeno.
3. De las moléculas pequeñas seleccionadas como “hits” varias se revelaron como potentes inhibidores de la DNA topoisomerasa de tipo IB de *Leishmania*. La presencia de un grupo amino-propil en posición N₆ del farmacóforo, produce la inhibición de la relajación del DNA superenrollado. Por su parte, la inclusión de un grupo NO₂ en posición C₃ genera compuestos con capacidad de producir complejos CL. Por lo general los compuestos con sustituyentes aminoalquílicos de mayor longitud, o con un heterociclo sustituido reducen el potencial inhibitorio del compuesto.
4. De la serie de derivados indenoisoquinolínicos estudiada frente a la DNA-topoisomerasa de tipo IB de *Leishmania infantum*, sólo aquellos que producían complejos CL inducían la fosforilación de la histona γ H2A y por lo tanto la reparación de daño cromosómico de cadena doble.

7. bibliografía

7. BIBLIOGRAFIA

Ahn G, Lansiaux A, Goossens JF, Bailly C, Baldeyrou B, Schifano-Faux N, Grandclaudon P, Couture A, Ryckebusch A (2010) Indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11-diones conjugated to amino acids: Synthesis, cytotoxicity, DNA interaction, and topoisomerase II inhibition properties. *Bioorg Med Chem* 18: 8119-8133.

Aït-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D (2011) *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res* 109: 1225-1232.

Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T (2007) Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 46: 132-142.

Akiyama HJ, McQuillen NK (1972) Interaction and transformation of *Leishmania donovani* within *in vitro* cultured cells. An electron microscopical study. *Am J Trop Med Hyg* 21: 873–879.

Alexander J, Bryson K (2005) T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99: 17–23

Alsford S, Horn D (2004) Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol* 53: 365-372.

Alsner J, Svejstrup JQ, Kjeldsen E, Sørensen BS, Westergaard O (1992) Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for *in vivo* function. *J Biol Chem* 267: 12408-12411.

Alvar, J (2001) *Leishmaniasis: de la biología al control*. Laboratorios Intervet. 2ª Edición: 200pp.

Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC (2008) Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* 105 :1–9.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA (2007) Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 77: 266-274.

Andriani G, Chessler AD, Courtemanche G, Burleigh BA, Rodriguez A (2011) Activity *in vivo* of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1298.

Antinori S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Acquaviva V, Foschi A, Trovati S, Parravicini C, Corbellino M, Meroni L (2007) Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Br J Dermatol* 157: 1032-1036.

Antinori S, Schifanella L, Corbellino M (2012) Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 109-118.

Antony S, Agama KK, Miao ZH, Takagi K, Wright MH, Robles AI, Varticovski L, Nagarajan M, Morrell A, Cushman M, Pommier Y (2007) Novel indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 produce persistent topoisomerase I cleavage complexes and overcome multidrug resistance. *Cancer Res* 67: 10397-10405.

Antony S, Kohlhagen G, Agama K, Jayaraman M, Cao S, Durrani FA, Rustum YM, Cushman M, Pommier Y (2005) Cellular topoisomerase I inhibition and antiproliferative activity by MJ-III-65 (NSC 706744), an indenoisoquinoline topoisomerase I poison. *Mol Pharmacol* 67: 523-530.

Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.

Ashutosh et al. (2005) Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in *in vitro* drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3776-3783.

Aulner N, Danckaert A, Rouault-Hardoin E, Desrivot J, Helynck O, Commere PH, Munier-Lehmann H, Späth GF, Shorte SL, Milon G, Prina E. (2013) High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2154.

Bahia D, Oliveira LM, Lima FM, Oliveira P, Silveira JF, Mortara RA, Ruiz JC (2009) The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*--new tools for designing specific inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 963-970.

Bakshi RP, Shapiro TA (2003) DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. *Mini Rev Med Chem* 3: 597-608.

Bakshi RP, Shapiro TA (2004) RNA interference of *Trypanosoma brucei* topoisomerase IB: both subunits are essential. *Mol Biochem Parasitol* 136: 249-255.

Bakshi RP, Sang D, Morrell A, Cushman M, Shapiro TA (2009) Activity of indenoisoquinolines against African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 123-128.

Balaña-Fouce R, Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM (2012a) Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 181: 85-93.

Balaña-Fouce R, Cubría JC, Reguera RM, Ordóñez D (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol* 30: 435-443.

Balaña-Fouce R, García-Estrada C, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM (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, Prada CF, Requena JM, Cushman M, Pommier Y, Álvarez-Velilla R, Escudero-Martínez JM, Calvo-Álvarez E, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM (2012b) Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5264-5270.

Balaña-Fouce R, Redondo CM, Pérez-Pertejo Y, Diaz-González R, Reguera RM (2006) Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase. *Drug Discov Today* 11: 733-740.

Balmer O, Tostado C (2006) New fluorescence markers to distinguish co-infecting *Trypanosoma brucei* strains in experimental multiple infections. *Acta Trop* 97: 94-101.

Basselin M, Badet-Denisot MA, Robert-Gero M (1998) Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop* 70: 43-61.

Bates AD, Berger JM, Maxwell A (2011) The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 39: 6327-6339.

Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ (2002) Pharmacokinetics, excretion and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 828-833.

Berman JD (2005) Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* 6: 1381-1388.

Berman JD (2006) Visceral leishmaniasis in the New World and Africa. *Indian J Med Res* 123: 289-294.

Berman JD (1988) Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* 10: 560-586.

Bern C, Maguire JH, Alvar J (2008) Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e313.

Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, Das VR, Kumar N, Lal C, Verma N, Singh VP, Ranjan A, Verma RB, Anders G., Sindermann, H, Ganguly NK (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 196: 591-598.

Bjornsti M, Fertala J (1999) Overexpression and purification of DNA topoisomerase I from yeast. *Methods Mol Biol* 94: 179-186.

Bodley A, Chakraborty AK, Xie S, Burri C, Shapiro TA (2003) An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7539-7544.

Bolhassani A et al. (2011) Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Exp Parasitol* 127: 637-645.

Broccoli S, Marquis JF, 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.

Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, Robey R, Pommier Y, Fojo T, Bates SE (1999) Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res* 59: 5938-5946.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Bustamante JM, Tarleton RL (2011) Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. *Expert Opin Drug Discov* 6: 653-661.

Caffrey CR, Lima AP, Steverding D (2011) Cysteine peptidases of kinetoplastid parasites. *Adv Exp Med Biol* 712: 84-99.

Calvo-Álvarez E, Alvarez-Velilla R, Fernández-Prada C, Balaña-Fouce R, Reguera RM (2015) Trypanosomatids see the light: recent advances in bioimaging research. *Drug Discov Today* 20: 115-121.

Calvo-Álvarez E, Guerrero NA, Alvarez-Velilla R, Prada CF, Requena JM, Punzón C, Llamas MÁ, Arévalo FJ, Rivas L, Fresno M, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, Reguera RM (2012) Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1927.

Calvo-Álvarez E, Stamatakis K, Punzón C, Álvarez-Velilla R, Tejería A, Escudero-Martínez JM, Pérez-Pertejo Y, Fresno M, Balaña-Fouce R, Reguera RM (2015) Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis* (en prensa).

Canavaci, A.M. et al. (2010) *In vitro* and *in vivo* high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e740.

Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70: 369-413.

Champoux JJ, Dulbecco R (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 143-146.

Chan MM et al. (2003) A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitol Res* 89: 266-271.

Chen AY, Yu C, Gatto B, Liu LF (1993) DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8131-8135.

Chowdhury AR, Mandal S, Goswami A, Ghosh M, Mandal L, Chakraborty D, Ganguly A, Tripathi G, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder HK (2003) Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. *Mol Med* 9: 26-36.

Cinelli MA, Morrell A, Dexheimer TS, Scher ES, Pommier Y, Cushman M (2008) Design, synthesis, and biological evaluation of 14-substituted aromathecins as topoisomerase I inhibitors. *J Med Chem* 51: 4609-4619.

Cinelli MA, Morrell AE, Dexheimer TS, Agama K, Agrawal S, Pommier Y, Cushman M (2010) The structure-activity relationships of A-ring-substituted aromathecins topoisomerase I inhibitors strongly support a camptothecin-like binding mode. *Bioorg Med Chem* 18: 5535-5552.

Claes F et al. (2009) Bioluminescent imaging of *Trypanosoma brucei* shows preferential testis dissemination, which may hamper drug efficacy in sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e486.

Coombs GH, Hart DT, Capaldo J (1983) *Leishmania mexicana*: drug sensitivities of promastigotes and transforming amastigotes. *J Antimicrob Chemother* 11: 151-162.

Croft SL (1986) *In vitro* screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Parasitol Today* 2: 64-69.

Cushman M, Jayaraman M, Vroman JA, Fukunaga AK, Fox BM, Kohlhagen G, Strumberg D, Pommier Y (2000) Synthesis of new indeno[1,2-c]isoquinolines: cytotoxic non-camptothecin topoisomerase inhibitors. *J Med Chem* 43: 3688-3698

D'Archivio S et al. (2013) Non-invasive *in vivo* study of the *Trypanosoma vivax* infectious process consolidates the brain commitment in late infections. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e1976.

D'Arpa P, Beardmore C, Liu LF (1990) Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* 50: 6919-6924.

Davies DR, Mushtaq A, Interthal H, Champoux JJ, Hol WG (2006) The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. *J Mol Biol* 357: 1202-1210.

De Gorgolas M, Miles MA (1994) Visceral leishmaniasis and AIDS. *Nature* 372: 734.

de La Llave E et al. (2011) A combined luciferase imaging and reverse transcription polymerase chain reaction assay for the study of *Leishmania* amastigote burden and correlated mouse tissue transcript fluctuations. *Cell Microbiol* 13: 81-91.

De Rycker M, Hallyburton I, Thomas J, Campbell L, Wyllie S, Joshi D, Cameron S, Gilbert IH, Wyatt PG, Frearson JA, Fairlamb AH, Gray DW (2013) Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2913-2922.

den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 17:1471-1477.

Dermine JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M (2000) *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2: 115–126.

Desjeux, P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 239-243.

Desjeux, P, Alvar J (2003) Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97: S3-S15.

Deterding A, Dungey FA, Thompson KA, Steverding D (2005) Antitrypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. *Acta Trop* 93: 311-316.

Díaz-González R, Pérez-Pertejo Y, Pommier Y, Balaña-Fouce R, Reguera RM (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.

Eberle C, Lauber BS, Fankhauser D, Kaiser M, Brun R, Krauth-Siegel RL, Diederich F (2011) Improved inhibitors of trypanothione reductase by combination of motifs: synthesis, inhibitory potency, binding mode, and antiprotozoal activities. *Chem Med Chem* 6: 292-301.

Edwards TK, Saleem A, Shaman JA, Dennis T, Gerigk C, Oliveros E, Gartenberg MR, Rubin EH (2000) Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I. *J Biol Chem* 275: 36181-36188.

Fairlamb AH, Cerami A (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 46: 695-729.

Fairlamb AH, Henderson GB, Cerami A (1989) Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2607-2611.

Feng W, Satyanarayana M, Tsai YC, Liu AA, Liu LF, LaVoie EJ (2009) Novel topoisomerase I-targeting antitumor agents synthesized from the N,N,N-trimethylammonium derivative of ARC-111, 5H-2,3-dimethoxy-8,9-methylenedioxy-

5-[(2-N,N,N-trimethylammonium)-ethyl]-dibenzo-[c,h]-[1,6]-naphthyridin-6-one iodide. Eur J Med Chem 44: 3433-3438.

Filonov GS, Piatkevich KD, Ting LM, Zhang J, Kim K, Verkhusha VV (2011) Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. Nat Biotechnol 29: 757-761.

Fiorani P, Bruselles A, Falconi M, Chillemi G, Desideri A, Benedetti P (2003) Single mutation in the linker domain confers protein flexibility and camptothecin resistance to human topoisomerase I. J Biol Chem 278: 43268-43275.

Folgueira C, Quijada L, Soto M, Abanades DR, Alonso C, Requena JM (2005) The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. J Biol Chem 280: 35172-35183.

Forestier CL, Machu C, Loussert C, Pescher P, Spath GF (2011) Imaging host cell-leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. Cell Host Microbe 9: 319-330.

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

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL (2012) Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2: 11-19.

Fujimoto DF, Pinilla C, Segall AM (2006) New peptide inhibitors of type IB topoisomerases: similarities and differences vis-a-vis inhibitors of tyrosine recombinases. J Mol Biol 363: 891-907.

Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc Natl Acad Sci USA 73: 3872-3876.

Gibson W et al. (2008) The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 1: 4.

Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG (2000) The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22: 319-331.

Glew RH, Saha AK, Das S, Remaley AT (1988) Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiol Rev* 52: 412-432.

Glover L, Horn D (2012) Trypanosomal histone γ H2A and the DNA damage response. *Mol Biochem Parasitol* 183: 78-83.

Goad LJ, Holz GG Jr, Beach DH (1984) Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol*. 10: 161-170.

Goad LJ, Berens RL, Marr JJ, Beach DH, Holz GG Jr (1989) The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 32: 179-189.

González U, Pinart, M, Reveiz L, Rengifo-Pardo M, Tweed J, Macaya A, Alvar J (2010) Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 51: 409– 419.

Goyard S, Beverley SM (2000) Blasticidin resistance: a new independent marker for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 108: 249-252.

Griesbeck O, et al. (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276: 29188-29194.

Grumont R, Washtien WL, Caput D, Santi DV (1986) Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica*: sequence homology with the corresponding monofunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5387-5391.

Guevara P et al. (2005) Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J Med Entomol* 42: 48-56.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG, Jakas DR, Gallagher G, Mattern MR, Mong SM, Bartus JO, Johnson RK, Kingsbury WD (1989) Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem* 32: 715-720.

Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* 3: 439-447.

Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.

Holzer TR, McMaster WR, Forney JD (2006) Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 146:198-218.

Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA break via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260: 14873–14878.

Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF (1989) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 49: 5077-5082.

Hsieh TS, Plank JL (2006) Reverse gyrase functions as a DNA renaturase: annealing of complementary single-stranded circles and positive supercoiling of a bubble substrate. *J Biol Chem* 281: 5640-5647.

Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. (2004) Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A* 58: 99-110.

Ioanoviciu A, Antony S, Pommier Y, Staker BL, Stewart L, Cushman M (2005) Synthesis and mechanism of action studies of a series of norindenoisoquinoline topoisomerase I poisons reveal an inhibitor with a flipped orientation in the ternary DNA-enzyme-inhibitor complex as determined by X-ray crystallographic analysis. *J Med Chem* 48: 4803-4814.

Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 24: 113-118.

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S,

Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005 309: 436-442.

Jean-Moreno V, Rojas R, Goyeneche D, Coombs GH, 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.

Kamhawi S (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22: 439-445.

Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Wang B, Liu Q, Neno M, Onoda M (2014) Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J Biochem* 156: 85-95.

Kaufmann SH, Charron M, Burke PJ, Karp JE (1995) Changes in topoisomerase I levels and localization during myeloid maturation in vitro and in vivo. *Cancer Res* 55: 1255-1260.

Kazemi B (2011) Genomic organization of leishmania species. *Iran J Parasitol* 6:1-18.

Kemp K (2000) Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48: 173-176.

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D (2008) Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10125-10130.

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucl Acids Res* 36:5678-5694.

Kohlhagen G, Paull KD, Cushman M, Nagafuji P, Pommier Y (1998) Protein-linked DNA strand breaks induced by NSC 314622, a novel noncamptothecin topoisomerase I poison. *Mol Pharmacol* 54: 50-58.

Koster DA, Croquette V, Dekker C, Shuman S, Dekker NH (2005) Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature* 434: 671-674.

Kozyavkin SA, Krah R, Gellert M, Stetter KO, Lake JA, Slesarev AI (1994) A reverse gyrase with an unusual structure. A type I DNA topoisomerase from the hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* is a two-subunit protein. *J Biol Chem* 269: 11081-11089.

Kubar J, Marty P, Lelièvre A, Quaranta JF, 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.

Lainson R, Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine*. Academy Press, London pp 1-120.

Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lang T, Hellio R, Kaye PM, Antoine JC (1994) *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci* 107: 2137-2150.

Lang T et al. (2005) Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol* 7: 383-392.

Latorre-Esteves E. et al. (2010) Monitoring the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in a murine model of cutaneous leishmaniasis using *L. major* expressing GFP. *J Biophotonics* 3: 328-335.

Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70: 826–835.

LeBowitz JH (1994) Transfection experiments in *Leishmania*. *Meth Cell Biol* 45: 65-78.

Lecoeur H, Buffet P, Morizot G, Goyard S, Guigon G, Milon G, Lang T (2007) Optimization of topical therapy for *Leishmania major* localized cutaneous leishmaniasis using a reliable C57BL/6 Model. *PLoS Negl Trop Dis* 1: e34.

Lecoeur H et al. (2010) Early curative applications of the aminoglycoside WR279396 on an experimental *Leishmania major*-loaded cutaneous site do not impair the acquisition of immunity. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 984-990.

Leppard JB, Champoux JJ (2005) Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* 114: 75-85.

Li TK, Houghton PJ, Desai SD, Daroui P, Liu AA, Hars ES, Ruchelman AL, LaVoie EJ, Liu LF (2003) Characterization of ARC-111 as a novel topoisomerase I-targeting anticancer drug. *Cancer Res* 63: 8400-8407.

Lima CD, Wang JC, Mondragon A (1994) Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* 367: 138-146.

Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H (2009) Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 160: 311-318.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 3-26.

Lisby M, Olesen JR, Skouboe C, Krogh BO, Straub T, Boege F, Velmurugan S, Martensen PM, Andersen AH, Jayaram M, Westergaard O, Knudsen BR (2001) Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation. *J Biol Chem* 276: 20220-20227.

Liu LF, Wang JC (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 7024-7027.

López CR, Yang S, Deibler RW, Ray SA, Pennington JM, Digate RJ, Hastings PJ, Rosenberg SM, Zechiedrich EL (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol* 58: 80-101.

López-Vélez R, Molina-Moreno R (2005) Climate change in Spain and risk of infectious and parasitic diseases transmitted by arthropods and rodents. *Rev Esp Salud Pública* 79: 177-190.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.

Luque-Ortega JR et al. (2001) *In vivo* monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1121-1125.

Maniscalco M, Noto G, Zichichi L, Veraldi S (2007) Multifocal cutaneous leishmaniasis: a new clinical presentation of the disease. *Acta Derm Venereol* 87: 275-276.

Mao Y, Mehl IR, Muller MT (2002) Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1235-1240.

Marchand C, Antony S, Kohn KW, Cushman M, Ioanoviciu A, Staker BL, Burgin AB, Stewart L, Pommier Y (2006) A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex. *Mol Cancer Ther* 5: 287-295.

Marquis JF, Makhey D, LaVoie EJ, Olivier M (2003) Effects of topoisomerases inhibitors protoberberine on *Leishmania donovani* growth, macrophage function, and infection. *J Parasitol* 89: 1048-1052.

Martin S, McCoubrey WK Jr, McConaughy BL, Young LS, Been MD, Brewer BJ, Champoux JJ (1983) Multiple forms of rat liver type I topoisomerase. *Methods Enzymol* 100: 137-144.

Maslov DA, Kolesnikov AA, Zaitseva GN (1984) Conservative and divergent base sequence regions in the maxicircle kinetoplast DNA of several trypanosomatid flagellates. *Mol Biochem Parasitol* 12: 351-364.

Matz MV et al. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17: 969-973.

McLatchie AP et al. (2013) Highly sensitive in vivo imaging of *Trypanosoma brucei* expressing "red-shifted" luciferase. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2571.

Mehta SR, y col (2008) Real-time in vivo green fluorescent protein imaging of a murine leishmaniasis model as a new tool for *Leishmania* vaccine and drug discovery. *Clin. Vaccine Immunol* 15: 1764-1770.

McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T (2007) Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol* 23: 368-375.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL (1992) Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J* 11: 3593-600.

Michel G et al. (2011) Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1323.

Mißlitz A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T (2000) Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 107: 251-261.

Mo YY, Wang C, Beck WT (2000) A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 275: 41107-41113.

Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal, J (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* 190: 268-271.

Moody SF, Handman E, McConville MJ, Bacic A (1993) The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 268: 18457-18466.

Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, Okwor IB, Beverley S, Uzonna JE (2009) Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol* 183: 8068–8076.

Muller MT (1985) Quantitation of eukaryotic topoisomerase I reactivity with DNA. Preferential cleavage of supercoiled DNA. *Biochim Biophys Acta* 824: 263-267.

Müllner A, Helfer A, Kotlyar D, Oswald J, Efferth T (2011) Chemistry and pharmacology of neglected helminthic diseases. *Curr Med Chem* 18: 767-789.

Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M (1992) Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 33: 35-40.

Murray HW (2000) Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis* 4: 158-177.

Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X (2006) Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-13-/-mice. *Infect Immun* 74: 2487–2490.

Myburgh E et al. (2013) *In vivo* imaging of trypanosome-brain interactions and development of a rapid screening test for drugs against CNS stage trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 22: e2384.

Myler P, Fasel N (editors). (2008) *Leishmania: After The Genome*. Caister Academic Press.

Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W (2008) Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 4: e1000222.

OMS (2007) Control de la leishmaniosis: informe de la Secretaría. 60ª Asamblea Mundial de la Salud. A60/10: 5pp.

OMS (2010) Control of the leishmaniases. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 949: 1-186.

Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N (1995) Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 49: 239–276.

Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O (1984) Purification, morphometric analysis, and characterization of the

glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. J Cell Biol 98: 1178-1184.

Ormö M et al. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science 273: 1392-1395.

Osorio Y, Travi BL, Renslo AR, Peniche AG, Melby PC (2011) Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel *ex vivo* splenic explant model system. PLoS Negl Trop Dis 5: e962.

Park AY, Hondowicz BD, Scott P (2000) IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. J Immunol 165: 896–902.

Peacock L et al. (2007) Dynamics of infection and competition between two strains of *Trypanosoma brucei brucei* in the tsetse fly observed using fluorescent markers. Kinetoplastid Biol Dis 6: 4.

Peniche AG, Osorio Y, Renslo AR, Frantz DE, Melby PC, Travi BL (2014) Development of an *ex vivo* lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major*. Antimicrob Agents Chemother 58: 78-87.

Pescher P, Blisnick T, Bastin P, Späth GF (2011) Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. Cell Microbiol 13: 978-991.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D (2008) *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science 321: 970-974.

Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E (2001) Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. Medicine (Baltimore) 80: 54-73.

Pires SF et al. (2008) Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int J Parasitol* 38: 289-297.

Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6: 789-802.

Pommier Y (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* 109: 2894-2902.

Pommier Y, Marchand C (2011) Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nat Rev Drug Discov* 11: 25-36.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C (2010) DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17: 421-433.

Prada CF (2013) Estudio de las regiones implicadas en la funcionalidad y resistencia a fármacos de la ADN-topoisomerasa IB de *Leishmania*. Tesis Doctoral; 305 pp.

Prada CF, Alvarez-Velilla R, Balaña-Fouce R, Prieto C, Calvo-Álvarez E, Escudero-Martínez JM, Requena JM, Ordóñez C, Desideri A, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM (2013) Gimatecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochem Pharmacol* 85:1433-1440.

Pratt DM, David JR (1981) Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* 291: 581-583.

Proulx ME, Désormeaux A, Marquis JF, Olivier M, Bergeron MG (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.

Ray S, Hazra B, Mitra B, Das A, Majumder HK (1998) Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. Mol Pharmacol 54: 994-999.

Ready PD (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. Euro Surveill 15: 19505.

Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WG (1999) Structural insights into the function of type IB topoisomerases. Curr Opin Struct Biol 9: 29-36.

Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WG (2000) Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. Biochemistry 39: 6832-6840.

Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ (1998) Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. Science 279: 1504-1513.

Reguera RM, Redondo CM, 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.

Reimão JQ et al. (2013) Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. J Microbiol Methods 93: 95-101.

Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G (2009) Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? Trends Parasitol 25: 505–510.

Rivory LP (1996) Irinotecan (CPT-11): a brief overview. Clin Exp Pharmacol Physiol 23: 1000-1004.

Rocha MN et al. (2013) An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. Diagn Microbiol Infect Dis 75: 282-291.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430: 463-467

Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5057-5062.

Roy G et al. (2000) Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol* 110: 195-206.

Roy R, Trowbridge P, Yang Z, Champoux JJ, Simmons DT (2003) The cap region of topoisomerase I binds to sites near both ends of simian virus 40 T antigen. *J Virol* 77: 9809-9816.

Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ (1995) Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181: 685-697.

Salomon CJ (2012) First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci* 101: 888-894.

Sambrook K, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York USA. Vol. 1, 2 y 3.

Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine *Cancer Res* 59: 4375-4382.

Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT (1998) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin *Cancer Res* 58: 4375-4382.

Schoeffler AJ, Berger JM (2008) DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys* 41: 41-101.

Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC (2008) Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* 24: 135-142.

Schwartz E, Hatz C, Blum J (2006) New world cutaneous leishmaniasis in travelers. *Lancet Infect Dis* 6: 342-349.

Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Meresse S, Descoteaux A, Desjardins M (1999) Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* 1: 19-32.

Seifert K, Escobar P, Croft SL (2010) *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother* 65: 508-511.

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

Sereno D et al. (2001) DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1168-1173.

Seychelle M, Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM (2011) All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 :827-841.

Shaner NC et al. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567-1572.

Shu X, Royant A, Lin MZ, Aguilera TA, Lev-Ram V, Steinbach PA, Tsien RY (2009) Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324: 804-807.

Simon I, Wissing KM, Del Marmol V, Antinori S, Remmelink M, Nilufer Broeders E, Nortier JL, Corbellino M, Abramowicz D, Cascio A (2011) Recurrent leishmaniasis in kidney transplant recipients: report of 2 cases and systematic review of the literature. *Transpl Infect Dis* 13: 397-406.

Singh N, Basnet H, Wiltshire TD, Mohammad DH, Thompson JR, Héroux A, Botuyan MV, Yaffe MB, Couch FJ, Rosenfeld MG, Mer G (2012) Dual recognition of phosphoserine and phosphotyrosine in histone variant H2A.X by DNA damage response protein MCPH1. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 14381-14386.

Singh N, Gupta R, Jaiswal AK, Sundar S, Dube A (2009) Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. *J Antimicrob Chemother* 64: 370-374.

Singh S, Sharma U, Mishra J (2011) Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments. *Int J Dermatol* 50: 1099-1108.

Singleton CK, Wells RD (1982) Relationship between superhelical density and cruciform formation in plasmid pVH51. *J Biol Chem* 257: 6292–6295.

Sinha S, Fernández G, Kapila R, Lambert WC, Schwartz RA (2008) Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol* 47: 1263-1270.

Siqueira-Neto JL, Moon S, Jang J, Yang G, Lee C, Moon HK, Chatelain E, Genovesio A, Cechetto J, Freitas-Junior LH (2012) An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1671.

Slesarev AI, Stetter KO, Lake JA, Gellert M, Krah R, Kozyavkin SA (1993) DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature* 364: 735-737.

Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9536-9541.

Spellberg B, Edwards JE Jr (2001) Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32: 76-102.

Staker BL, Feese MD, Cushman M, Pommier Y, Zembower D, Stewart L, Burgin AB (2005) Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J Med Chem* 48: 2336-2345.

Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ (1996) The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem* 271: 7602-7608.

Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ (1997) Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J Biol Mol* 269: 355-372.

Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* 279: 1534-1541.

Strumberg D, Pommier Y, Paull K, Jayaraman M, Nagafuji P, Cushman M (1999) Synthesis of cytotoxic indenoisoquinoline topoisomerase I poisons. *J Med Chem* 42: 446-457.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW (2010) Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 362: 504–512.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels R (2003) Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clin Infect Dis* 37: 800–804.

Tanizawa A, Kohn KW, Pommier Y (1993) Induction of cleavage in topoisomerase I c-DNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res* 21: 5157-5166.

Teicher BA (2008) Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies. *Biochem Pharmacol* 75:1262-1271.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W (2013) The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog* 9: e1003594.

Thalhofer CJ et al. (2010) *In vivo* imaging of transgenic *Leishmania* parasites in a live host. *J Vis Exp* 41: pii 1980

Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.

8. Matz, M.V. et al. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17, 969-973

Ulukan H, Swaan PW (2002) Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs* 62: 2039-2057.

Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S (2002) Innate immunity and its role against infections *Ann Allergy Asthma Immunol* 88: 253-264.

Valenzuela JG, Garfield M, Rowton ED (2004) Pham VM Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol* 207: 3717-3729.

van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M (2010) Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 10:184-194.

Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, Muñoz, DL, Robledo SM, Muskus CE, López-Abán J, Muro A, Vélez ID, Mollinedo F (2012) *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and Sb^V-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1612.

Vennerstrom JL, Lovelace JK, Waits VB, Hanson WL, Klayman DL (1990) Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 918-921.

Villa H, Otero-Marcos AR, Reguera RM, Balaña-Fouce R, García-Estrada C, Pérez-Pertejo Y, Tekwani BL, Myler PJ, Stuart KD, Bjornsti MA, Ordóñez D (2003) A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 278: 3521-3526.

Vinograd LJ, Radloff R, Watson R, Laipis P (1965) The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 53: 1104-1111.

Vologodskii AV, Cozzarelli NR (1994) Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 609-643.

Walker J, Saravia NG (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.

Wanasen N, Soong L (2008) L-Arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res* 41: 15-25.

Wang JC (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys* 31: 107-144.

Wang JC (2002) Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-440.

Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.

White JH, Bauer WR (1986) Calculation of the twist and the writhe for representative models of DNA. *J Mol Biol* 189: 329-341.

Wolday D, Berche N, Akuffo H, Britton S (1999) Leishmania-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. *Parasitology Today* 15: 182-187.

Wu J, Cunha FQ, Liew FY, Weiser WY (1993) IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. *J Immunol* 151: 4325-4332.

Yamashita Y, Fujii N, Murakata C, Ashizawa T, Okabe M, Nakano H (1992) Induction of mammalian DNA topoisomerase I mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. *Biochemistry* 31: 12069-12075.