

# Tripanotión Reductasa como Blanco Quimioterapéutico contra la Tripanosomosis y la Leishmaniosis

Helena Maruenda

Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima 32, Perú

## INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis y la leishmaniosis, enfermedades parasitarias causadas por protozoarios de la familia Trypanosomatidae, afectan fundamentalmente a países en vías de desarrollo. A través de la pérdida de vidas humanas y desvío de recursos, producen estragos indirectos en su economía y comprometen de esta suerte su productividad.

La transmisión al hombre ocurre a través de insectos hematófagos y, por tanto, una forma de control y prevención consiste en **erradicar** el vector mediante campañas agresivas de fumigación. Este método ha producido efectos sorprendentes en algunos países como Uruguay y Chile (OMS 1999). Una campaña de este tipo resulta costosa en países como el Perú, pues ha de llegar de manera continua a pueblos recónditos y geográficamente de difícil acceso.

La **inmunización** es otro de los métodos preventivos contra estas enfermedades. Si bien todos los esfuerzos en esta área contra la tripanosomosis han resultado infructuosos debido a la caprichosa naturaleza de la pared celular de dichos tripanosomas<sup>1,2</sup>, en el caso particular de la leishmaniosis visceral (LV), enfermedad letal que compromete a las poblaciones de Bangladesh, India, Nepal, Brasil y Sudán, ya se cuenta con resultados prometedores<sup>3</sup>.

Una vez infectado el ser humano, la oferta **quimioterapéutica** a su alcance es insuficiente y en la mayoría de casos poco efectiva y en extremo tóxica. Debido a ello, y a los grandes avances logrados a nivel biomolecular en el estudio de estos protozoarios, la búsqueda de nuevos fármacos se ha intensificado. La mejor comprensión de las rutas metabólicas involucradas en la supervivencia de tales agentes, así como la identificación de las macromoléculas esenciales en el ciclo de vida de estos parásitos, ha abierto las puertas a la búsqueda racional de drogas de mayor

eficacia y menor toxicidad para combatir dichas enfermedades.

La primera etapa en esta búsqueda se inicia con el acceso, posibilitado hoy en día por la cristalografía de rayos X, a la estructura tridimensional de la enzima de interés y a sus complejos: enzima-sustrato y enzima-inhibidor. El modelo generado proporciona información acerca de la arquitectura del sitio activo y, con el apoyo de programas computacionales, la naturaleza de las interacciones involucradas en el reconocimiento del sustrato por la enzima se puede estudiar a nivel molecular. Algunos de estos programas permiten, además, cuantificar la afinidad de distintos esqueletos moleculares mediante, por ejemplo, cálculos teóricos de  $K_d$ . El mejor de los posibles inhibidores generados en dicho mapeo virtual es seleccionado, sintetizado y su actividad biológica, dilucidada. El objetivo es el descubrimiento de un esqueleto inhibidor guía, susceptible de ser mejorado mediante estudios de estructura-actividad, proceso que culmina, con suerte, en un candidato merecedor de mayor atención posterior.

Un acercamiento similar está siendo aplicado a la lucha contra la leishmaniosis y la tripanosomosis. En ella el blanco terapéutico es la singular enzima tripanotión reductasa. Este artículo se centra en los logros realizados hasta la fecha en esta área y, además, intentará resumir el estado actual de dichas enfermedades, endémicas en nuestro medio.

## *La Tripanosomosis y la Leishmaniosis en el Perú*

La tripanosomosis americana, comúnmente denominada Mal de Chagas, es producida por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*. Este se transmite al hombre y al animal doméstico a través de las heces de vectores como el *Triatoma infestans* (chirimachas). Se estima entre 16 y 18 millones las

personas infectadas con *T. cruzi* en Centro y Sudamérica y en aproximadamente 100 millones las personas que se encuentran bajo riesgo de contraer la infección (OMS 1997).

En el huésped mamífero, el parásito se presenta en dos formas: la extracelular flagelada, conocida como tripomastigoto sanguíneo, y la aflagelada, denominada amastigoto, el cual vive y se divide en el citoplasma de la célula de diferentes tejidos<sup>4</sup>.

Clínicamente, el *T. cruzi* produce una enfermedad diferenciada en tres fases. La primera es una etapa sintomática o aguda, de 10 a 15 días, periodo durante el cual los amastigotos se reproducen al interior de las células, destruyéndolas y generando así lesiones inflamatorias variadas (chagomas, signo de Romaña, edema facial, conjuntivitis, entre otras). El índice de mortandad en esta etapa se eleva al 10%. La segunda fase, de aproximadamente 10 años de incubación, es asintomática o indeterminada. Durante este lapso *T. cruzi* se concentra en algunos focos selectivos como el músculo cardíaco, el sistema nervioso, el hígado y el bazo. La tercera etapa es sintomática o crónica, periodo cuando se manifiesta sea la miocarditis intersticial, las visceromegalias, el megaesófago o el megacolon desarrollados; sin tratamiento adecuado, la enfermedad termina con la muerte del individuo<sup>4</sup>.

La información epidemiológica acerca del Chagas en el Perú es incompleta, pero se tiene suficiente evidencia de que esta enfermedad constituye un problema de salud pública en la región sudoccidental, específicamente en los departamentos de Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Ayacucho y Apurímac<sup>5,6</sup>. En estas zonas, el vector *T. infestans* es de hábito intradomiciliario, lo cual facilita la infección del ser humano. Un reciente informe referente a la presencia de vectores de la familia Reduviidae, géneros *Rhodius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, infectados con *T. cruzi* y de hábito intradomiciliario, sugiere que no se le ha prestado la debida importancia a la enfermedad en zonas como Ancash, La Libertad, Lambayeque, Piura, Tumbes, Cajamarca, Amazonas, San Martín y Loreto<sup>7</sup>.

Diversas especies de protozoarios pertenecientes al género *Leishmania* provocan un grupo de enfermedades conocidas genéricamente como leishmaniosis. Actualmente amenaza a más de 350 millones de seres humanos, e infecta, por lo menos, a 12 millones de individuos en 80 países del orbe (OMS, 1990).

El ciclo biológico de la *Leishmania* comprende dos formas; desarrolladas en diferentes huéspedes. El promastigoto, la forma extracelular flagelada, se desenvuelve en el aparato digestivo del vector y es de naturaleza infectante. Una vez hospedado en el mamífero, tras ser fagocitado por los macrófagos, deviene con rapidez en amastigoto, la forma intracelular aflagelada que se multiplica en el citoplasma<sup>4</sup>.

En el Perú, existen tres formas clínicas bien definidas de leishmaniosis: la leishmaniosis cutánea andina (LCA) o uta, la mucocutánea o nasofaríngea (LMC), comúnmente conocida como espundia y, finalmente, la diseminada o difusa. Las especies de leishmania asociadas con estas patologías son cinco, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. braziliensis*, *L. guayanensis* y un híbrido entre la *L. braziliensis* y la *L. peruviana*<sup>8-10</sup>. La LMC genera lesiones que desfiguran al huésped infectado pues conducen a la destrucción parcial o total de las mucosas tanto de la nariz como de la boca y garganta. Las zonas más afectadas se ubican en los departamentos del Amazonas, Ayacucho, Cuzco, Junín y Ucayali<sup>8-12</sup>. La LCA se manifiesta en úlceras de la piel en la cara o en los miembros superiores e inferiores del individuo. Se presenta en la vertiente occidental de la cordillera de los Andes y en los valles interandinos entre 800-3000 msnm<sup>8-12</sup>.

La situación de la leishmaniosis en nuestro país es compleja al encontrarse ampliamente diseminada en la Sierra y la Selva. La infección comienza con la picadura de insectos del género *Lutzomyia*, el cual comprende 137 especies en todo el país<sup>8</sup>. La limitada evidencia científica señala sólo cuatro de estas especies, *Lutzomyia peruensis*, *Lutzomyia verrucarum*, *Lutzomyia ayacuchensis*, y *Lutzomyia tejadai*, como vectores transmisores de la leishmaniosis. Las dos primeras tienen amplia distribución en todo el territorio nacional (cordillera de los Andes, valles interandinos), mientras que las dos últimas están focalizadas en Ayacucho, Lima y Huánuco<sup>8</sup>. Es posible sugerir otras especies como vectores de la leishmaniosis. Por ejemplo, la *Lutzomyia pescei*, que en Andahuaylas y Huancavelica es la especie más común de la zona, y las *Lutzomyia carrerai* y *Lutzomyia gonzaloi*, que en el Cuzco son las especies que experimentan mayor atracción por el cebo humano, son los vectores más probables en dichas regiones, a pesar de que los estudios científicos aún no hayan validado esta propuesta<sup>8</sup>.

### Quimioterapia Actual

De momento no existe tratamiento efectivo contra la tripanosomosis americana. En el Perú se combate sólo con una droga, el 2 - nitroimidazol (N- benzil - 2 - nitroimidazol) acetamida, comercialmente conocida como Rochagan o Radanil (RO-7-1051)<sup>13</sup>, ya que la producción del otro fármaco, el Nifurtimox, se discontinuó a partir del 80<sup>14</sup>. Este tratamiento es efectivo tan sólo en la fase aguda de la enfermedad, su eficacia depende de la cepa de *T. cruzi* involucrada, requiere de una administración oral prolongada y provoca un número de efectos secundarios<sup>13,14</sup>. Dentro de las posibles drogas en un futuro cercano existe un antimicótico triazólico en evaluación clínica como agente tripanocida, el cual ha demostrado ser útil en ambos estadios de la enfermedad, aguda y crónica<sup>15</sup>.

Las drogas disponibles contra la tripanosomosis africana, producida por las subespecies *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, tampoco son de gran efectividad. La suramina sódica y el isetionato de pentamidina, por ejemplo, utilizadas contra el *T. b. gambiense* y el *T. b. rhodesiense*, en ese orden, son efectivas exclusivamente en el estadio inicial de la enfermedad<sup>4,16</sup>. La única droga disponible para el tratamiento del estado avanzado, pero que compromete el sistema nervioso central, es Melarsoprol, un arsenical, As(III), de alta toxicidad, con un índice de mortalidad que asciende al 5%<sup>16,17</sup>. La eflornitina, un inhibidor de la biosíntesis de poliaminas, es la primera droga efectiva y poco tóxica registrada contra la *T. b. gambiense*<sup>18</sup>. No obstante, el alto costo del tratamiento, pues bordea \$ 500 (400 mg / kg/14 días), limita su producción. Una reciente negociación entre la Organización Mundial de la Salud y la compañía farmacéutica Marion Merrel Dow ha permitido mantener el producto en circulación<sup>19</sup>.

Desde hace más de 50 años la leishmaniosis se combate con sales de Sb(V). Estas son liberadas del estibo-gluconato de sodio, comercializado como Pentostam, y el antimoniato de meglumina, conocido como Glucantime<sup>4,20,21</sup>. En caso de resistencia a los antimoniales, se emplea la Anfotericina B y el isetionato de pentamidina<sup>20</sup>. Otros compuestos menos tóxicos son recomendados en conjunción con alguno de los anteriores, pero la efectividad de la terapia depende primordialmente de la especie involucrada<sup>20</sup>.

Dadas las limitaciones de la quimioterapia actual para combatir estas enfermedades, todas provocadas por parásitos

de la misma familia y en la cual es patente la dependencia efectividad-especie/cepa, se ha convertido en uno de los grandes anhelos de la comunidad científica poder ofrecer un tratamiento estándar o una única droga para todas ellas. Este panorama se contempla con mayor entusiasmo hoy en día debido al mejor conocimiento que se posee, a nivel molecular, de las etapas metabólicas específicas de dichos flagelados. Resalta dentro de ellas el sistema de defensa oxidativa, regulado por el tripanotión reductasa, TR, sobre la cual se centra nuestro interés.

### Tripanotión Reductasa (EC 1.6.4.8)

Los tripanosomas poseen ciertas peculiaridades metabólicas no presentes en organismos superiores<sup>22,23</sup>. Uno de los más atractivos, desde el punto de vista quimioterapéutico<sup>24</sup>, es el proceso en donde participa el tripanotión [N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutationil)espermidina], un conjugado tripeptídico formado por una molécula de glutatión (GSSG) y el conector espermidina, T[S]<sub>2</sub>, tal como se indica en la Figura 1.

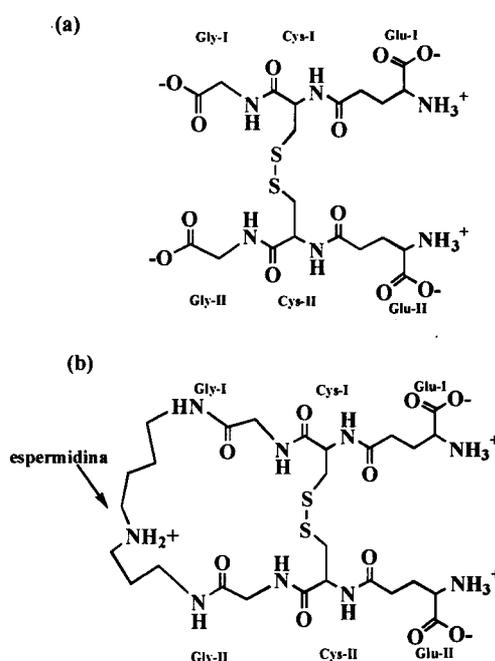


Figura 1. Estructuras moleculares de los metabolitos (a) glutatión, GS-SG y (b) tripanotión T[S]<sub>2</sub>.

La molécula del tripanotión es mantenida en su forma reducida  $T(SH)_2$  por una flavoproteína NADPH-dependiente, el tripanotión reductasa. El papel que encarna esta enzima es análogo al del glutatión reductasa en mamíferos (hGR), es decir, protege el parásito del estrés oxidativo provocado por radicales libres como pueden ser el oxidrilo (OH $\cdot$ ), superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogeno (H $_2$ O $_2$ ), entre otros<sup>22,23</sup>. La Figura 2 esquematiza ambos procesos.

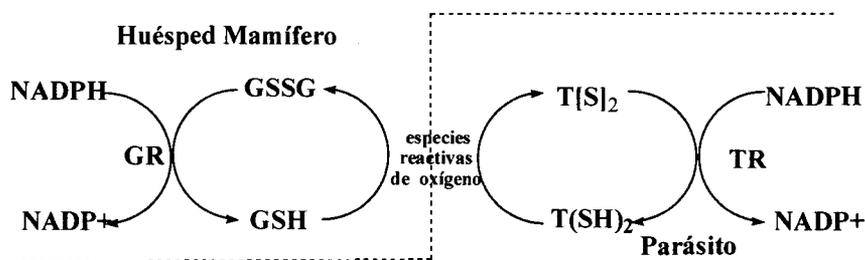


Figura 2. Reacción catalizada por las flavoproteínas glutatión reductasa y tripanotión reductasa

En mamíferos, la agresión oxidativa es controlada no sólo por GR sino, adicionalmente, por el superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa a través de una cascada de reacciones. Las dos últimas macromoléculas, responsables de la degradación del H $_2$ O $_2$  y de los hidroperóxidos orgánicos, se encuentran ausentes en los tripanosomas<sup>25</sup>, deficiencia que sensibiliza estos parásitos frente a la oxidación. Por ello, y debido a la alta especificidad del proceso  $T[S]_2/T(SH)_2$ , TR se ha convertido en un blanco quimioterapéutico de importancia en el combate contra estas enfermedades<sup>22-25</sup>.

Ciertos estudios cristalográficos<sup>26-31</sup> han demostrado que TR es un homodímero de dimensiones 95 x 66 x 93 Å, y que cada subunidad, de 52 kD, está integrada por tres dominios. El dominio I, constituido por los aminoácidos 1-163 y 293-352, genera una región con afinidad por el flavin-adenin-dinucleótido, FAD; el dominio II, compuesto por los aminoácidos 164-292, crea el ambiente propicio para el reconocimiento del fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido, NADPH; y el dominio III, los aminoácidos 353-497, forma parte de la interfase entre ambas subunidades, y es el sector responsable del ensamblaje de tal dímero.

La existencia de una cavidad rígida, de 20 Å de largo y 15 Å de ancho y profundidad, que alberga y reconoce al sustrato

$T[S]_2$  ha quedado revelada. Son 25 los aminoácidos que la integran, los cuales se ubican dentro de los dominios I (15-22, 53-62, 103-114, 335-343) y III (396'-399' y 461'-470' de la segunda unidad). Este arreglo espacial de aminoácidos genera dos ambientes de relevancia, uno hidrofóbico y el otro ácido, los cuales, a través de enlaces hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, o enlaces tipo p, mantienen unido el sustrato. El componente Glu(I)-Cys(I)-Gly(I) de  $T[S]_2$  es guiado hacia el fondo

del intersticio atraído por Tyr111, Ile339 y His461', entre otros (Tabla 1). El ambiente hidrofóbico, creado por los residuos Leu18, Trp22, Ser110, Tyr111, Met114 y Phe115, acomoda a la cadena lipofílica metilénica del conector espermidina. Estas interacciones terminan por posicionar el  $T[S]_2$  alrededor del centro catalítico, Cys53, Cys58 y His461', muy cerca del anillo isoaloxacina del grupo FAD. El dominio ácido, cavidad de carga negativa que neutraliza la carga positiva del tripanotión, está conformado por Glu19, Glu466' y Glu467'.

Tabla 1. Interacciones entre tripanotión reductasa y el sustrato  $T[S]_2$ .

$T[S]_2$	Tripanotión reductasa
$\gamma$ Glu(I)	Pro336, Ile339, Gly459', His461', Glu466'
Cys(I)	Val54, Tyr111, Thr335, Ile339, His461'
Gly(I)	Ser15, Leu18, Tyr111, Ile339
Espermidina	Leu18, Glu19, Trp22, Ser110, Tyr111
$\gamma$ Glu(II)	Val54, Val59, Lys62, Phe396, Lys399, His461', Pro462', Thr463', Ser464', Glu466', Glu467'
Cys(II)	Val59, Ile107, His461'
Gly(II)	Ile107

Tabla modificada de referencia (31)

Existe evidencia experimental que TR y hGR son específicas con respecto a su sustrato, T[S]<sub>2</sub> y GSSG, respectivamente<sup>32</sup>. Esta característica puede ser descifrada hoy analizando a nivel molecular los sitios activos correspondientes. La cavidad de GSSG en hGR está formada sólo por 19 aminoácidos, en vez de los 25 residuos involucrados en TR. Catorce de ellos se conservan en ambos intersticios y se encuentran asociados con la acción catalítica de la enzima y con el reconocimiento del núcleo glutatión, presente en ambos sustratos. Los cinco aminoácidos restantes, Ala34, Arg37 (carga positiva), Ile113, Asn117, Arg347 (carga positiva), en hGR, son reemplazados en TR por Glu19 (carga negativa), Trp22 (neutro), Ser110, Met114 y Ala344 (neutro). Esta sustitución convierte a la cavidad en hGR, de hidrofílica y con carga positiva, en hidrofóbica (Met114) y con carga negativa. Una electrostática opuesta junto con dimensiones distintas son los factores asociados con la especificidad observada: el glutatión, molécula cargada negativamente, no puede ser sustrato de TR por repulsión electrostática, mientras que T[S]<sub>2</sub>, cargado positivamente y de mayor tamaño, está excluido del sitio activo en hGR tanto por impedimento estérico como por incompetencia electrostática.

La TR es una flavina-oxireductasa, y, como tal, requiere de los nucleótidos FAD y NADPH para su acción catalítica. Estudios con enzimas de similar naturaleza han identificado dos motivos característicos –altamente conservados– en el reconocimiento del núcleo flavín. El primero de ellos es la secuencia Gly-X-Gly-X-X-Gly (donde X representa cualquier aminoácido), correspondiente a los residuos 12-17 en el dominio I de TR. La segunda huella digital, un péptido de 11 residuos Thr-XXX-h-y-h-h-Gly-Asp (donde y es un residuo aromático y h cualquier aminoácido pequeño y de naturaleza apolar), se halla, en TR, en la secuencia 317-327. En el caso del dinucleótido NAD, son cuatro los aminoácidos identificados en su enlace, Met333, Gly197, Arg223 y Arg229, presentes en TR.

Basándose en la información disponible ha sido posible plantear el mecanismo de acción de TR. El ciclo catalítico en

el cual se libera tripanotión reducido T(SH)<sub>2</sub> se esquematiza en la Figura 3. El proceso involucra dos estados enzimáticos distintos: (a) TR oxidada, denotado por E<sub>ox</sub>, que se caracteriza por la presencia del enlace disulfuro Cys53-Cys58, y la forma reducida EH<sub>2</sub> en donde las cisteínas se encuentran libres (b y c). El residuo Phe199, en ausencia de la nicotinamida reducida NADPH, cubre el anillo isoaloxacina del FAD, protegiéndolo así del medio (a). Este resguardo cesa tras el ingreso del agente reductor, coenzima NADPH, con lo cual se da inicio a la reducción enzimática (b). Una vez expulsada la nicotinamida oxidada, NADP<sup>+</sup>, FAD es estabilizado con el ion tiolato vecino (c). El tripanotión oxidado que se encuentra en la cercanía, anclado por Tyr111 y His461', es reducido a T(SH)<sub>2</sub> mediante una transferencia de protones mediada por la His461'. Este aminoácido, adecuadamente ubicado por enlaces puente de hidrógeno establecidos con el cercano Glu466', actúa como aceptor y dador de protones (Fig 3, d).

El único sitio activo, de los tres hasta ahora presentados, suficientemente diferente como para representar un blanco específico en el diseño de drogas es el del sustrato tripanotión. Dicho diseño hace uso de diversos programas computacionales que, alimentados con las coordenadas del sitio activo, modelan la arquitectura de dicho ambiente y permiten estudiar las interacciones entre las paredes peptídicas y la molécula de interés. Los heterociclos inhibidores de TR presentados en la Figura 4, Mepacrina, Clomipramina, Amitriptilina, Trifluperazina, y Clorpromazina<sup>33</sup>, fueron descubiertos mediante estudios de esta naturaleza. Estas estructuras evolucionaron de esqueletos simples como son el naftaleno, antraceno y fenantreno, los cuales, una vez insertados dentro del intersticio, fueron variados con miras a propiciar interacciones con los residuos en su entorno, en particular con la pared hidrofóbica constituida por los residuos Leu18, Trp22, Ser110, Tyr111, Met114 y Phe115. La cadena alifática añadida cumple con este objetivo a su vez que el catión amonio, adherido a ella, prevé problemas de solubilidad<sup>33</sup>. Cabe anotar que en estos modelos el catión se encuentra ubicado entre los residuos de carga negativa, Glu466' y Glu467'.

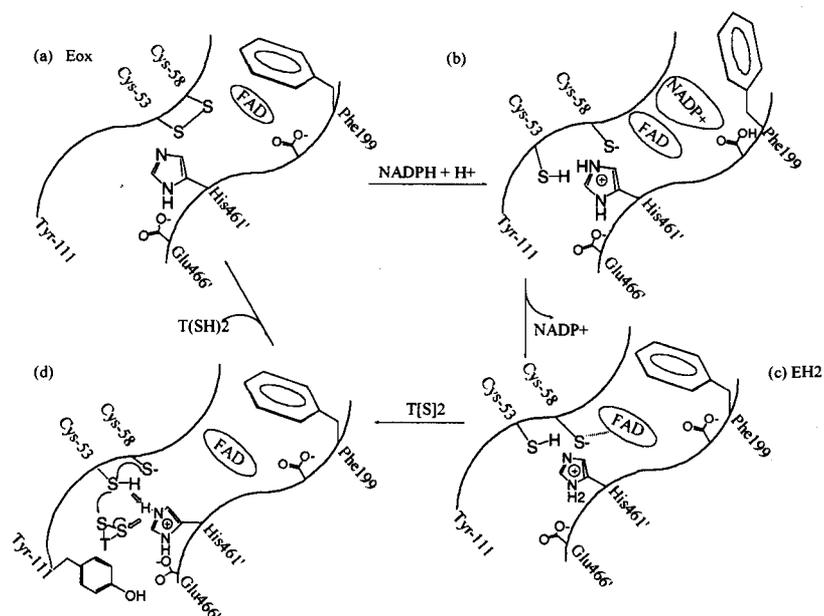


Figura 3. Ciclo catalítico de la enzima tripanotión reductasa que comprende dos estados enzimáticos,  $E_{ox}$  y  $E_{H_2}$ . (a) La forma oxidada de TR que se caracteriza por la existencia del enlace Cys53-Cys58. (b) Reducción del FAD a  $FADH_2$ , por acción de la coenzima NADPH conduce a la ruptura del disulfuro. (c) Salida del  $NADP^+$  genera  $E_{H_2}$ . (d) Transferencia de protones (denotado con líneas gruesas) que conducen a la reducción del  $T[S]_2$ , y al restablecimiento de  $E_{ox}$ .<sup>25,28,31</sup>

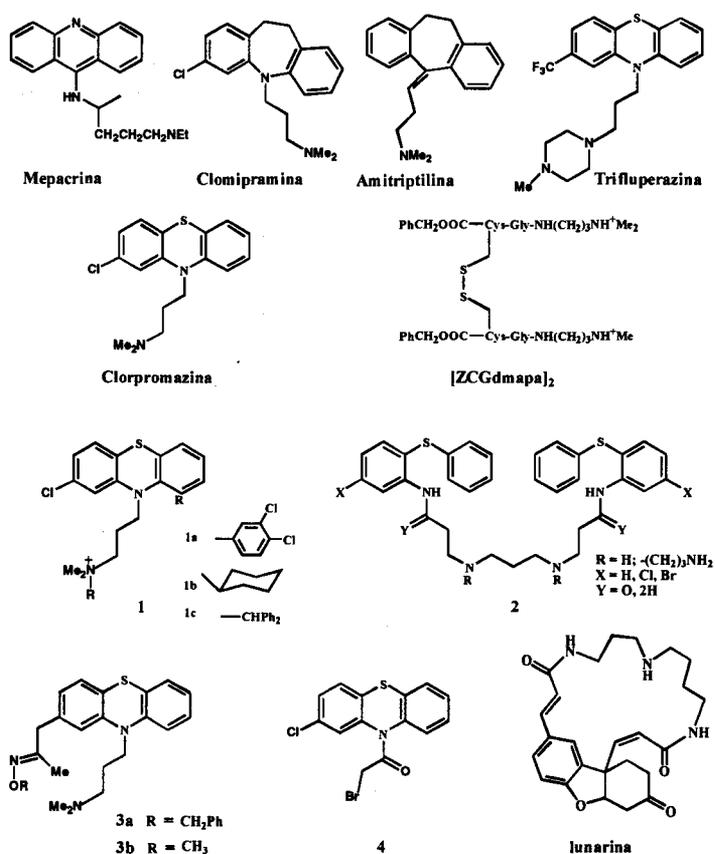


Figura 4. Estructura del sustrato alternativo  $[ZCG.dmapa]_2$  e inhibidores de la enzima tripanotión reductasa

Modelos como estos han permitido además racionalizar los resultados experimentales que en su momento condujeron al descubrimiento del sustrato alternativo [ZCG.dmapa]<sub>2</sub><sup>34</sup>, exhibido en Figura 3, y que actualmente reemplaza al costoso T[S]<sub>2</sub> en los ensayos de inhibición<sup>35</sup>. Se identificó a través de estos estudios otro sector hidrofóbico, denominado sitio Z<sup>34</sup>, no comprendido dentro del sitio reconocido como activo, y constituido por Phe396', Pro398, Leu 399', aminoácidos involucrados en interacciones adicionales con los grupos pendientes del sustrato [ZCG.dmapa]<sub>2</sub>.

En el afán de acceder a este ambiente, se estudió la estructura y actividad de diversas fenotiazinas<sup>36</sup>, incluyendo los derivados cuaternarios **1**, Figura 4, en donde el sustituyente R se extiende hacia esa zona<sup>37</sup>. El fuerte carácter hidrofóbico de R (**1a-1c**) optimiza la energía enlazante en más de 5,6 kcal/mol. El efecto de esta variación condujo a inhibidores selectivos de TR con valores de K<sub>i</sub> experimental dos órdenes de magnitud mayores a los de la Clorpromazina patrón<sup>37</sup>.

Debido al inevitable e indeseable efecto neuroléptico de estas fenotiazinas, algunas variantes fueron propuestas con la finalidad de aumentar su afinidad por TR. Se diseñó, entre otras, el dímero sulfuro de difenilo **2**<sup>38</sup>, estructura que ofrece un mayor número de contactos dentro de la amplia cavidad en TR y que por tanto optimiza la energía de enlace. Se ha demostrado experimentalmente que dicho compuesto y algunos otros análogos inhiben TR selectivamente con valores de IC<sub>50</sub> 0,3-2,3 mM, en contraste con los 12,5 mM de la Clomipramina<sup>38,39</sup>.

Los modelos hasta ahora propuestos, y que ya han conducido a estructuras activas, se basan en estudios cristalográficos conducidos con TR de *T. cruzi*<sup>26,30</sup>, y con TR acomplejada con el tripanotión<sup>31</sup>. Lamentablemente, la estructura del aducto TR-fenotiazina aún no se encuentra disponible; pero ésta, en su momento, contribuirá a precisar con mayor detalle los residuos y las coordenadas involucradas dentro dicho intersticio. Ello, junto con algoritmos más completos, permitirá estimar con mayor exactitud los valores de K<sub>i</sub>.

Sin embargo, y a pesar de no contar todavía con un modelo exacto, la búsqueda virtual ya se ha convertido en una atractiva alternativa en el descubrimiento de nuevos inhibidores de TR. Ejemplo de ello es el mapeo que permitió señalar 13 estructuras distintas como posibles inhibidores de TR dentro de una base de datos de 2500 moléculas<sup>40</sup>. Nueve

de ellas inhibieron TR a concentraciones por debajo de 57mM, y tres de estos esqueletos están siendo alterados sintéticamente en nuestro laboratorio, en un esfuerzo por potenciar su actividad.

Otro ejemplo es la lunarina exhibida en la Figura 4, compuesto natural aislado de la *Lunaria biennis* y *Lunaria redivia*, rescatado de una base de datos de productos naturales<sup>31</sup>. El trabajo experimental indica que esta molécula cíclica inhibe TR en un 97% a 500 mM sin afectar a hGR. El esqueleto resulta atractivo pues es susceptible de alteración química.

Por lo demás, muchos de los compuestos presentados hasta el momento como inhibidores de TR han demostrado ser agentes tripanocidas o leishmanicidas<sup>36</sup>. Se ha reportado valores de ED<sub>50</sub> (*T. brucei*, tripomastigoto) por debajo de 5mM para ciertos miembros simples de la familia de las fenotiazinas (**3a**, **3b** y **4**)<sup>41</sup>, mientras que con derivados de la segunda generación, las sales cuaternarias **1**, se obtienen valores veinte veces menores que la fenotiazina guía<sup>37</sup>. Si bien la carga fija presente en estas sales cuaternarias reduce sus propiedades neurolépticas, estudios *in vivo* indican que, a las concentraciones requeridas para la inhibición, se sigue observando efectos secundarios. Los estudios en esta área con este grupo de compuestos en particular continúan.

### Comentario

Es indudable que la búsqueda racional de inhibidores de la tripanotión reductasa está desarrollándose a nivel mundial exitosamente. Hemos visto que esqueletos guía descubiertos mediante una búsqueda virtual pueden evolucionar en inhibidores más potentes vía los cambios estructurales sugeridos durante el modelado computacional.

Por ello, y debido al marcado desinterés de las compañías farmacéuticas y de la comunidad científica en general por estas enfermedades, es necesario en el país la implementación de trabajos de esta naturaleza.

Consecuentemente, la finalidad de este artículo ha sido presentar TR y proporcionar información resumida sobre la arquitectura del sitio activo, todo ello con la finalidad de dirigir la atención del lector hacia esqueletos puntuales - accesibles sintéticamente o disponibles en los productos naturales- como potenciales inhibidores de la enzima tripanotión reductasa.

REFERENCIAS

1. Pays, E., Nolan, D.P. *Expression and function of surface proteins in Trypanosoma brucei*. En *The Trypanosome Surface*. Proceedings of the Third Francqui Colloquium. Brussels. Pays, E (Eds) De Boeck&Larcier S.A., 26-27 May 1997.
2. Molyneux, D. H. *Current Public Health Status of the Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. En: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis* Hide, G.; Moltram, J.C.; Coombs, G.H.; Holmes, P.H. (Eds) CAB International, UK, 1997.
3. Engers, H.; Desjeux P. *First vaccine trial against visceral leishmaniasis*. *TDR News* **2001**, 64, 6.
4. Heyneman, D. *Parasitología Médica*. En *Microbiología Médica*. Jawetz E.; Melnick, J.; Adelgerg, E.A. (Eds) Manual Moderno, SA. CV. México, 1985, pp: 514-524.
5. *Perú en la Salud de las Américas*. Publicación Científica Técnica No. 587, OPS, Organización Panamericana de la Salud, 2002.
6. Torres Lao, R.E. *Chagas-Perú* en V Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Andina de Control de la Transmisión Vectorial y Transfusional de Chagas, Guayaquil-Ecuador 7-9 Mayo, 2003.
7. Náquira, C. *Trypanosomiasis Americana en el Norte y Nororiente del Perú* en V Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Andina de Control de la Transmisión Vectorial y Transfusional de Chagas, Guayaquil-Ecuador 7-9 Mayo, 2003.
8. *Leishmaniasis en las Américas*. Cuaderno Técnico No. 44, OPS, Organización Panamericana de la Salud, 2002.
9. Lucas, C.M.; Franke, E.D.; Cachay, M.I.; Tejada, A.; Cruz, M.E.; Kreutzer, R.D.; Barker, D.C.; McCann, S.H.; Watts, D.M. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, 59, 2, 312-317
10. Davis, C.R.; Reithinger, R.; Campbell-Lendrum, D.; Feliciangeli, R.; Borges, R.; Rodriguez, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries *Cad. Saude Publica* **2000**, 16, 4, 925-950.
11. Guthmann, J.P.; Calmet, J.; Rosales, E.; Cruz, M.; Chang, J. Patients' associations and the control of leishmaniasis in Peru. *Bull. WHO* **1997**, 75, 1, 39-44.
12. Guerra, H.; Falconi, E.; Llanos-Cuentas, A.; Chang, J. Research in tropical medicine and primary health care in Peru. *Salud Publica Mex.* **1993**, 35, 5, 477-486.
13. Cerecetto, H.; Gonzalez, M. Chemotherapy of Chagas' disease: Status and new developments. *Curent Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, 1187-1213.
14. Coura, J.; de Castro, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* **2002**, 97, 1 3-24
15. Urbina, J. A.; Payares, G.; Contreras, L.M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Loebenberg, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH-56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1998**, 42, 7, 1771-1777.
16. Croft. S.L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* **1999**, 94, 2, 215-220.
17. Pepin, J.; Milord, F. The treatment of human african trypanosomosis. *Adv. Parasitol.* **1994**, 33, 1-47.
18. Burri, C.; Brun, R. Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis *Parasitol. Res.* **2003**, 90 Supp 1: S49-52
19. Anuncio hecho por el Dr. Michael Gelb durante la inauguración del Keystone Symposium *Drugs against Tropical Protozoan Parasites* Keystone-Denver, 3/3-8, 2002.
20. Croft. S.L.; Yardley, V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharm. Design* **2002**, 8, 319-342
21. Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet* **1999**, 354, 1191-1199
22. Fairlamb, A.H. Novel Biochemical Pathways. *Parasitology* **1989**, 99S, 93-112.
23. Fairlamb, A.H. & Cerami, A. Metabolism and Functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, 46, 695-729
24. Krauth-Siegel, R.L.; Coombs, G.H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitology Today* **1999**, 15, 10, 404-408.
25. Schirmer, R.H.; Muller, J.G.; Garfoth, J.; Krauth-Siegel, R.L. Disulfide – reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 141-154.
26. Krauth-Siegel, R.L.; Enders, B.; Henderson, G.B.; Fairlamb, A.H.; Schirmer, R.H. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **1987**, 164, 123-128.
27. Hunter, W.N. Bailey, S.; Habash, J.; Harrop, S.J.; Aboagye-Kwarteng, T.; Smith, K.; Fairlamb, A.H. Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *J. Mol. Biol.* **1992**, 227, 1, 322-333.
28. Bailey, S.; Smith, K.; Fairlamb, A.H.; Hunter, W.N. Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28 nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 213, 67-75
29. Lantwin, C.B.; Schilichting, I.; Kabsch, W.; Pai, E.F.; Krauth-Siegel, R.L. The structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state. *Proteins*, **1994**, 18, 2, 161-173
30. Zhang, Y.; Bond, Ch.S.; Bailey, S.; Cunningham, M.L.; Fairlamb, A.H.; Hunter, W.N. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Science* **1996**, 5, 52-61.
31. Bond, Ch.S.; Zhang, Y.; Berriman, M.; Cunningham, M.L.; Fairlamb, A.H.; Hunter, W.N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure* **1999**, 7, 81-89.
32. Faerman, C.H.; Savvides, S.N.; Strickland, C.; Breidenbach, M.A.; Ponasik, J.A.; Ganen, B.; Ripoll, D.; Krauth-Siegel, L.; Karplus, P.A. Charge is the major discriminating factor for glutathione reductase versus trypanothione reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 8, 1247-1253.
33. Benson, T.J.; McKie, J.H.; Garfoth, J.; Borges, A.; Fairlamb, A.H.; Douglas, K.T. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. *Biochem. J.* **1992**, 286, 9-11.
34. El-Waer, A.F.; Smith, K.; McKie, J.H.; Benson, T.J.; Fairlamb, A.H.; Douglas, K.T. The glutamyl binding site of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*: enzyme kinetic properties of gamma-glutamyl-modified substrate analogues. *Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, 1203, 1, 93-98.
35. El-Waer, A.; Douglas, K.T.; Smith, K.; Fairlamb, A.H. Synthesis of N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinylglycine 3-dimethylaminopropylamide disulfide: A cheap and convenient new assay for trypanothione reductase. *Analytical Biochemistry* **1991**, 198, 212-216.

36. Chan, C. Hong, Y.; Garfoth, J.; McKie, J.H.; Jaouhari, R.; Speers, P.; Douglas, K.T.; Rock, P.J.; Yardley, V.; Croft, S.L.; Fairlamb, A.H. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 2, 148-158.
37. Khan, M.O.F.; Austin, S.E.; Chan, C. Hong, Y.; Marks, D.; Vaghjiani, S.N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Croft, S.L.; Douglas, K.T. Use of an additional hydrophobic binding site, the Z site, in the rational drug design of a new class of stronger trypanothione reductase inhibitor, quaternary alkylammonium phenothiazines. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3148-3156.
38. Bonnet, B.; Soullez, D. Davioud-Charvet, E.; Landry, V.; Horvath, D.; Sergheraert, C. New spermine and spermidine derivatives as potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1997**, *5*, 7, 1249-1256.
39. Bonnet, B.; Soullez, D.; Girault, S.; Maes, L.; Landry, V.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C. Trypanothione reductase inhibition trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, *8*, 95-103.
40. Horvath, D. A virtual screening approach applied to search for trypanothione reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2414-2423.
41. Austin, S.E.; Khan, O.F.; Douglas, K.T. Rational drug design using trypanothione reductase as a target for anti-trypanosomal and anti-leishmanial drug leads. *Drug Design and Discovery* **1999**, *16*, 5-23.