ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas: Herramientas para Nuevos Enfoques en su Tratamiento

Leishmaniasis and Chagas Disease: Tools for New Treatment Approaches

Ana Fidelina Gómez Garay^{1, 2}, Jorge Javier Alfonso Ruiz Díaz^{1, 2}, Anderson Makoto Kayano¹, Adolfo Borges^{1, 3}

¹ Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica-CEDIC. Asunción, Paraguay.
² Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde-CEBio-Fundação Oswaldo Cruz.

Porto Velho, Brasil.

³ Universidad Central de Venezuela, Instituto de Medicina Experimental.Caracas,

Autor de correspondencia: bioanitagomez@gmail.com DOI: https://doi.org/10.32480/rscp.2019-24-1.126-136 Recibido: 13/03/2019. Aceptado: 10/05/2019.

Resumen: La Leishmaniasis y la Enfermedad de Chagas afectan a millones de personas en América Latina y en otras regiones del mundo, siendo las poblaciones rurales pobres y vulnerables las más afectadas. Aunque se han realizado esfuerzos conjuntos para el combate de estas enfermedades desatendidas, la combinación de diferentes factores como el tratamiento ineficiente, la falta de interés para invertir en la búsqueda de nuevas fuentes terapéuticas y el surgimiento de cepas de parásitos resistentes acaban complicando las perspectivas. Esta situación torna de vital importancia el desarrollo de nuevas estrategias que apunten a la identificación de moléculas con potencial aplicación en la terapia o que puedan ejercer un efecto sinérgico cuando se complementan con la quimioterapia actual. Uno de los enfoques propuestos para este fin consiste en la búsqueda de estos agentes basados en blancos farmacológicos presentes en los parásitos causantes de las citadas enfermedades. Entre estos blancos moleculares se encuentran las enzimas implicadas en vías esenciales del parásito, como la Tripanotiona Reductasa (TR), involucrada en el combate al estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno producidas por macrófagos del huésped durante la infección. Una herramienta importante en la búsqueda de inhibidores para esta enzima puede ser encontrada a través de la aplicación de herramientas in silico, que resulta un método relativamente rápido y de bajo costo, el cual permite seleccionar moléculas con potencial a partir de una gran variedad de fuentes. Los ensavos basados en el tamizaje ("screening") virtual permiten la selección de moléculas de forma racional, que mediante ensayos complementarios pueden dar lugar al surgimiento futuro de nuevos fármacos.

Palabras clave: Leishmaniasis, Mal de Chagas, tripanotiona reductasa, tamizaje molecular virtual



Abstract: Leishmaniasis and Chagas disease affect millions of people worldwide, particularly in Latin America where poor and vulnerable rural populations are mostly affected. Although joint efforts have been made to fight these neglected diseases, the combination of different factors such as inefficient treatment, lack of interest in investing in the search for new therapeutic sources, and the emergence of resistant strains of parasites end up complicating prospects. This situation makes it vitally important to develop new strategies aimed at identifying molecules with potential application in therapy or that may exert a synergistic effect when supplemented with current chemotherapy. One of the approaches proposed for this purpose is the search for these agents based on pharmacological targets present in the parasites causing Leishmaniasis and Chagas. Among these molecular targets there are enzymes involved in essential pathways of the parasite, such as Trypanothione Reductase (TR), involved in combating oxidative stress generated by reactive oxygen species produced by host macrophages during infection. An important tool in the search for inhibitors for this enzyme can be found in the application of in silico tools, which is a relatively inexpensive and fast method of selecting potential molecules from a variety of sources. Assays based on virtual screening allow the selection of molecules in a rational way, which through complementary tests can lead to the future emergence of new drugs.

Keywords: Leishmaniasis, Chagas Disease, trypanothione reductase, *virtual screening*.

Enfermedades desatendidas

Las enfermedades conocidas como tropicales desatendidas (*Neglected Tropical Diseases* o NTD por sus siglas en inglés) son consideradas como un grupo variado de enfermedades que abundan en 149 países con climas tropicales y subtropicales, afectando a más de mil millones de personas y representan una inversión de millones de dólares anuales para los países en desarrollo. Las poblaciones más afectadas incluyen a aquellas de escasos recursos y condiciones de vida inadecuadas, muchas veces en constante contacto con los vectores que las transmiten y los animales que actúan como reservorios (1).

Entre las enfermedades causadas por parásitos flagelados con amplia distribución en las Américas clasificadas como desatendidas, pueden citarse la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis (2). La leishmaniasis es causada por parásitos del género *Leishmania*, transmitida por la picadura del vector flebotomíneo infectado. La mayoría de los casos se concentran en Brasil, Colombia y Perú (3).

Por otro lado, la enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida por vectores triatominos. Es considerada la enfermedad tropical transmisible más prevalente en América Latina. La distribución geográfica de la infección de Chagas se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile (4).

El panorama altamente complejo de estas enfermedades en países en vías de desarrollo se ve agravado por la falta de inversión en la búsqueda de nuevas posibilidades terapéuticas opcionales a las convencionales, las cuales presentan severos efectos adversos en los pacientes, quienes acaban desistiendo del tratamiento, aumentando así el riesgo del

desarrollo de resistencia del parásito. En el caso particular del Chagas, el medicamento es ineficiente cuando la enfermedad se encuentra en su fase crónica (2).

El control y tratamiento de enfermedades tropicales desatendidas representan un gran desafío para grupos de investigación, sistemas de salud y gobiernos, que deben promover acciones de integración social, asistencia a la salud e incentivo al desarrollo científico y tecnológico, con el objetivo de minimizar los agravios asociados a estas molestias. Estas enfermedades, además de afectar a millones de personas en situación de vulnerabilidad, presentan implicaciones económicas asociadas al tratamiento que son igualmente relevantes, como a la propia enfermedad (6).

De esta manera surge la necesidad de adoptar nuevos medicamentos alternativos o combinatorios para su aplicación en el tratamiento de estas dolencias. Pero, ¿cuáles son las opciones disponibles cuando se plantean estas alternativas a tratamientos que poseen más de cincuenta años de implementación?

Nuevos enfoques terapéuticos y blancos moleculares en tripanosomátidos

El desarrollo de nuevos tratamientos contra protozoarios sigue principalmente tres líneas: (i) reposicionamiento de fármacos que se encuentran en el mercado para otros fines utilizando herramientas virtuales o nuevas combinaciones de los que tienen acción conocida, (ii) análisis de las vías metabólicas del parásito para identificar nuevos objetivos moleculares y posterior desarrollo de compuestos con posible acción sobre ellos, y (iii) sobre productos naturales como fuente potencial (6).

Todos los medicamentos actualmente disponibles para el tratamiento de enfermedades parasitarias surgieron a partir del tamizaje (("screening") contra los parásitos en cultivo, ensayados contra linajes celulares, pasando los más prometedores a ser evaluados in vivo y en ensayos preclínicos y clínicos. Por otro lado, los avances en relación a la comprensión de los mecanismos moleculares de enfermedades parasitarias, así como de las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas de los parásitos, permitieron el desarrollo de una nueva estrategia de diseño racional de fármacos, basándose en las diferencias estudiadas entre huésped y parásito y dirigido contra blancos específicos presentes en este último. Esta área, desarrollada mediante las herramientas biomoleculares (biología molecular, bioquímica, genética, etc.), ha aumentado el número de blancos moleculares para pruebas en screening de alto rendimiento para identificación de agentes innovadores en las últimas décadas (7).

Los blancos moleculares se definen como aquellas proteínas o ácidos nucleicos cuya actividad biológica es específica de un organismo y que pueden ser susceptibles a la acción de compuestos o moléculas con la capacidad de alterar sustancialmente su actividad. En este mismo ambiente, conceptualmente, los inhibidores se definen como moléculas capaces de enlazarse a un objetivo específico bloqueando su actividad. En cuanto a los blancos

moleculares de enfermedades desatendidas, los criterios básicos para la selección de los mismos son que se presenten prioritariamente en el agente etiológico y que se expresen en la etapa de vida patógena para el huésped (8).

Aunque la inversión en investigación y desarrollo farmacéutico ha aumentado substancialmente, la falta de un aumento correspondiente en la identificación de nuevas moléculas con aprobación para terapéutica, indica que la innovación farmacéutica sigue siendo un desafío para los grupos de investigación (9).

La búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas en la lucha contra las enfermedades desatendidas causadas por parásitos ha conducido a los investigadores al estudio de diversos blancos moleculares, algunos de ellos inclusive compartidos entre los organismos componentes de la familia Trypanosomatidae (Tabla 1).

Como ya ha sido mencionado, entre los principales criterios para la validación de un blanco molecular se encuentra que el mismo sea crucial para el metabolismo del patógeno, prefiriéndose si está presente exclusivamente en el parásito. Sin embargo, algunos fármacos no siguen este patrón, derivando en los efectos adversos y la baja eficiencia (8). Entre los blancos más estudiados presentes en esta familia de parásitos, las enzimas del metabolismo tiol-dependiente son consideradas entre las más prometedoras (7, 10). Los tripanosomátidos están expuestos a una cantidad considerable de productos tóxicos denominados especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ROS y RNS por sus siglas en inglés, respectivamente) durante su paso por las células del hospedero. Estos agentes pueden causar un desbalance del sistema reductor intracelular ocasionando serias alteraciones al parásito. El agrupamiento tiol presente en diversos complejos enzimáticos cumple un papel determinante en la reducción de las ROS, regulando en este proceso otras funciones celulares (11). En particular, en los miembros de la familia Trypanosomatidae existe un sistema a base de tripanotiona [T(S)2] que junto a la flavoenzima Tripanotiona Reductasa, proporcionan las condiciones adecuadas para su supervivencia (12).

El sistema de la Tripanotiona Reductasa fue comprendido varios años después de haberse descrito la existencia de otros componentes de la vía metabólica donde ella actúa, sabiéndose hasta ese momento que se trataba de un sistema imprescindible para la supervivencia del parásito (11).

Los componentes descritos posteriormente incluyen la Triparedoxina Peroxidasa y la Triparedoxina, que convierten los radicales peróxido y alquilo hidroperóxido en agua y alcohol, respectivamente (17).

La presencia de la Tripanotiona Reductasa (TR) (BRENDA: EC: 1.8.1.12) en varios flagelados de la familia Trypanosomatidae fue demostrada inicialmente en estudios utilizando el sustrato tripanotiona de *Crithidia fasciculata*, y posteriormente, la enzima fue

identificada en estudios utilizando extractos solubles de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *L. mexicana*, y *Crithidia fasciculata* (18, 19). Estos estudios condujeron a la determinación de la función de la ditiol tripanotiona (forma reducida de la tripanotiona), que conjuntamente con la TR, proporcionan el ambiente reductor en los tripanosomátidos sustituyendo el sistema del glutatión (GSH) y la Glutatión Reductasa (GR) (EC: 1.8.1.7) que se encuentra en el hospedero mamífero (20).

A pesar de que la GR y de la TR presentan aproximadamente 40% de identidad en su secuencia de aminoácidos, existen características estructurales que proporcionan la especificidad respectiva de unión por sus sustratos. Un detalle importante en este punto es la diferencia de cargas, tamaño y bolsones hidrofílicos e hidrofóbicos presentes en las dos enzimas. En este contexto, la TR posee la capacidad de acomodar sustratos constituidos por grupos con mayor volumen, presentando un sitio activo cargado negativamente y regiones hidrofóbicas interactuando con su substrato mediante interacciones electrostáticas y de van der Waals, respectivamente, a diferencia de la GR que presenta residuos cargados positivamente e interactúa con su sustrato de menor tamaño por interacciones electrostáticas (11, 21, 22).

Esta diferencia ha establecido a la TR como un blanco validado para el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Estudios anteriores demostraron que esta enzima y otras que pertenecen a la misma ruta metabólica, se encuentran sobre-expresadas en las cepas de parásito que son resistentes a los medicamentos convencionales, sugiriendo que esta vía puede ser considerada un objetivo apropiado para el desarrollo de nuevos fármacos (23, 24).

Figura 1: Vía metabólica de la enzima Tripanotiona Reductasa (17).



Blancos moleculares	Funciones en el metabolismo del parásito	Compuestos con actividad
Enzimas de la biosíntesis de esteroles	Síntesis de esteroles de membranas	Anfotericina B, drogas azólicas y azasteroles
Enzimas de la biosíntesis de poliaminas	Crecimiento y diferenciación	Pentamidina y DFMO*
Enzimas de la via glicosomal	Glicólisis, salvamento de purinas y beta- oxidación de ácidos grasos	Cumarinas, Aloprurinol y antimoniales
Quinasas dependientes de ciclinas	Ciclo de división celular, transcripción, apoptosis y diferenciación	Indirubina
Proteinasas	Eliminación de proteínas ubiquitinadas	Benzamidina y TPCK
Enzimas del metabolismo de tioles	Manutención del ambiente reductor intracelular	Antimoniales
Topoisomerasas	Involucradas en la división celular	Pentamidina, antimoniales, Novobiocin, Etoposida y fluoroquinolonas
Proteínas ribosomales	Síntesis de proteínas	Paramomicina
Enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos	Constituyentes de membranas	Miltefosina

Tabla 1: Principais blancos moleculares de Tripanosomatídeos (10, 13–16).

Desde la identificación de la enzima TR, las investigaciones han abordado la búsqueda de inhibidores con el fin de interferir en el ciclo de vida de estos flagelados. En este contexto, algunos estudios han descrito la capacidad inhibitoria de la TR por el fármaco clomipramina, registrado como antidepresivo tricíclico clásico. Inicialmente este efecto fue relacionado con un desequilibrio en el gradiente electroquímico de las membranas de los parásitos, sin embargo, trabajos posteriores realizados con una TR recombinante y ensayos in silico indicaron su conexión con la inhibición de esta enzima (25, 26). A partir de ese trabajo inicial, se ha descrito la acción inhibitoria de otros derivados de compuestos tricíclicos (27, 28).

Debido al escenario que involucra estas enfermedades olvidadas, la biodiversidad surge como una fuente de moléculas de alta variabilidad estructural, química y de alto potencial de aplicación biotecnológica.

Tradicionalmente, los productos naturales representan una fuente de moléculas con potencial uso contra enfermedades, ya sea de forma empírica con el uso popular o aplicado en la medicina. Los compuestos de origen natural como fuente de agentes terapéuticos alcanzaron su pico en la década de 1970-80. Entre 1981 y 2002, aproximadamente la mitad de las nuevas entidades químicas registradas corresponden a moléculas de origen natural (29) y hasta el 34% de los medicamentos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) hasta 2010, derivaron de esta importante fuente (29, 30).

Gracias a los considerables avances en la comprensión de las vías de biosíntesis de estas moléculas, junto con mejoras en los enfoques para su aislamiento, identificación y caracterización, se han desarrollado las herramientas necesarias para una nueva era en la investigación de productos naturales en la academia y en la industria (31).

Estudios in silico para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial farmacológico

La identificación de entidades innovadoras es el objetivo central de la investigación en la búsqueda de nuevos fármacos y este proceso puede ser realizado utilizando herramientas de screening de alto rendimiento (High-Throughput Screening-HTS). A pesar de haber sido establecida alrededor de los años 80, el costo de implementación de estas plataformas sigue siendo un gran impedimento, disminuyendo su aplicabilidad en regiones de escasos recursos. En este sentido, la utilización de plataformas virtuales ofrece ventajas interesantes en la búsqueda de moléculas con capacidad de interacción con un objetivo molecular validado. El tamizaje ("screening") virtual o clasificación virtual aplicado a farmacología consiste en el uso de algoritmos matemáticos computacionales que permiten seleccionar

entre un grupo de moléculas sometidas al análisis de interacción contra blancos seleccionados, aquellas que presentan mayor probabilidad de actividad en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (32).

Inicialmente, la selección virtual fue considerada como una alternativa ante la falta de infraestructura de algunos laboratorios para implementar metodologías de HTS, pero posteriormente, ambas técnicas fueron consideradas complementarias, siendo el *screening* virtual conocido como la versión *in silico* del *screening* de alto rendimiento (32).

Los análisis de clasificación virtual pueden seguir dos metodologías igualmente válidas dependientes de los datos disponibles: la basada en la estructura del ligando (cuando no se cuenta con la estructura del receptor) o aquella que considera la estructura del receptor, conocida como acoplamiento ("docking") molecular (33).

El desarrollo de las técnicas de secuenciamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de expresión y caracterización estructural de proteínas contribuyó notablemente en las áreas de investigación que apuntan a la identificación de potenciales fármacos. En relación a la estructura tridimensional, para una parte de las moléculas existe una estructura resuelta, obtenida por cristalografía y análisis por difracción de rayos X y/o resonancia magnética nuclear (34).

Por otra parte, cuando no se dispone del modelo adecuado para realizar la selección virtual, se tiene como alternativa el modelado por homología del blanco de interés. Una de las principales justificaciones para la utilización de esta herramienta se basa en la observación de que en la naturaleza las proteínas son más conservadas en su estructura tridimensional que en relación a su secuencia de aminoácidos (35).

Una vez obtenido el modelo tridimensional del receptor, es posible realizar el *docking* molecular, confrontando el modelo en condiciones específicas con los ligandos que serán ensayados. Posteriormente, son seleccionadas aquellas moléculas que presentaron interacciones más favorables en términos de estabilidad molecular del complejo receptorligando (36).

La principal ventaja del *screening* virtual es la disminución drástica de tiempo y recursos requeridos para ensayar una biblioteca de compuestos. La identificación de entidades que no interactúan con el blanco estudiado reduce notablemente el número de moléculas susceptibles de ser ensayadas *in vitro*, siendo ésta la diferencia que se presenta cuando se compara con la técnica del HTS, en la cual innumerables compuestos se prueban sin información previa acerca de los potenciales efectos de los mismos (37).

Las primeras investigaciones de interacción molecular entre ligandos y receptores se realizaron considerándolos como estructuras fijas. Actualmente, se proponen moléculas interactuando de una manera dinámica, sufriendo cambios conformacionales derivados de esa interacción y que afectan a su funcionalidad. Si bien el *docking* molecular puede proporcionar datos importantes sobre el comportamiento de una molécula en presencia de otra, existen factores que no se consideran a la hora de realizar un análisis *in silico*, principalmente el hecho de que la presencia aislada de las dos moléculas no refleja la realidad de los ambientes naturales. Aunque este parámetro es considerado un aspecto del método a ser mejorado, información valiosa puede ser rescatada de los ensayos realizados de forma virtual, representando una herramienta inestimable en la búsqueda de fármacos y moléculas con actividad contra posibles blancos terapéuticos (36).

CONCLUSIÓN

Considerando la situación actual de la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, el control y tratamiento de estas enfermedades representa un gran desafío que estimula el trabajo conjunto de grupos de investigación y sistemas de salud, lo cual debe propiciar el desarrollo tecnológico y científico con el objeto de minimizar las complicaciones asociadas a estas dolencias. Son de especial interés la aplicación de herramientas que permitan el diseño de metodologías capaces de reducir costos a largo plazo. En este contexto, los ensayos *in silico* disminuyen de manera considerable el número de moléculas a ser evaluadas en ensayos biológicos, fomentando la iniciativa de aplicar nuevas estrategias basadas en la disponibilidad de recursos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WHO. Neglected tropical diseases [Internet]. 2019 [citado 2019 Mar 15]. Disponible en: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
- WHO-PAHO. Leishmaniases: Epidemiological Report of the Americas. Rep Leishmaniases
 [Internet]. 2013;1:1–4. Disponible en:
 http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34858/LeishReport6_spa.pdf?sequence
 =5&isAllowed=y
- 3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One [Internet]. 2012 Jan [citado 2014 Jul 16];7(5):e35671. Disponible en:
 - http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3365071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
- 4. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104(suppl 1):31-40.
- Klug DM, Gelb MH, Pollastri MP. Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. Bioorganic Med Chem Lett [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;26(11):2569–76. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.103

- Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. Int J Infect Dis [Internet]. 2011 Aug [citado 2014 Nov 11];15(8):e525-32. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605997
- Müller J, Hemphill A. Drug target identification in protozoan parasites. Expert Opin Drug Discov. 2016;11(8):815-24.
- 8. Vijayakumar S, Das P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. Acta Trop [Internet]. Elsevier B.V.; 2018;181:95–104. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.010
- Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. Nat Rev Drug Discov [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;8(12):959–68. Disponible en: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd2961
- Singh B, Sundar S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. Vaccine [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;30(26):3834–42. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.068
- 11. Comini MA, Flohé L. Trypanothione-Based Redox Metabolism of Trypanosomatids. In: Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013. p. 167–99.
- 12. Beig M, Oellien F, Krauth-Siegel RL, Selzer PM. Screening Approaches Towards Trypanothione Reductase. Trypanos Dis Mol Routes to Drug Discov. 2013;1-21.
- 13. Dias LC, Dessoy MA. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Quim Nova. 2009;32(9):2444-57.
- 14. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. Molecules [Internet]. 2009 [citado 2014 Nov 19];14(7):2317–36. Disponible en: http://www.mdpi.com/1420-3049/14/7/2317/
- 15. Kaur G, Rajput B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin b, and pentamidine resistance in leishmania. J Parasitol Res. 2014;2014.
- Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (review). Int J Mol Med. 2008;22(3):277-86.
- 17. Colotti G, Baiocco P, Fiorillo A, Boffi A, Poser E, Chiaro F Di, et al. Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs. Future Med Chem. 2013 Oct;5(15):1861-75.
- Fairlamb AH, Cerami A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 1985;14(2):187-98.
- Fairlamb A, Blackburn P, Ulrich P, Chait B, Cerami A. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science (80-) [Internet]. 1985;227(4693):1485-7. Disponible en: http://www.sciencemag.org/content/227/4693/1485.short
- Beig M, Oellien F, Garoff L, Noack S, Krauth-Siegel RL, Selzer PM. Trypanothione reductase: A target protein for a combined in vitro and in silico screening approach. Pollastri MP, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jun;9(6):1-19.
- Oliveira RB De, Zani CL, Ferreira RS, Leite RS, Silva THA, Carlos A, et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona redutase. 2008;31(2):261-7.

- Kuriyan J, Kongt X-P, Krishna TSR, Sweett RM, Murgolo NJ, Field H, et al. X-ray structure
 of trypanothione reductase from Crithidia fasciculata at 2.4-A resolution (glutathione
 reductase/oxidative stress/trypanosomiasls/protein crystaoraphy/drug design). Biochemistry.
 1991;88(October):8764-8.
- 23. Cunningham ML, Fairlamb AH. Trypanothione reductase from Leishmania donovani Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. Eur J Biochem. 1995;230(2):460-8.
- Mukhopadhyay R, Mukherjee S, Mukherjee B, Naskar K, Mondal D, Decuypere S, et al. Characterisation of antimony-resistant Leishmania donovani isolates: Biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. Int J Parasitol [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2011;41(13–14):1311–21. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.07.013
- 25. Benson TJ, McKie JH, Garforth J, Borges A, Fairlamb H, Douglas KT. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase: Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. Biochem J. 1992;286:9-11.
- 26. Zilberstein D, Dwyer DM. Antidepressants Cause Lethal Disruption of Membrane Function in the Human Protozoan Parasite Leishmania. 1984;(November):977-9.
- Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Naskar K, Sundar S, Dujardin JC, et al. Imipramine Is an Orally Active Drug against Both Antimony Sensitive and Resistant Leishmania donovani Clinical Isolates in Experimental Infection. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12).
- 28. Saravanamuthu A, Vickers TJ, Bond CS, Peterson MR, Hunter WN, Fairlamb AH. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: A template for drug design. J Biol Chem. 2004;279(28):29493–500.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2005;4(3):206-20. Disponible en: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd1657
- 30. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nat Rev Drug Discov. 2015;14(2):111–29.
- 31. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. Nature. 2004;432(7019):829–37.
- 32. Tanrikulu Y, Krüger B, Proschak E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. Drug Discov Today. 2013;18(7–8):358-64.
- Ferreira RS., Oliva G, Andricopulo AD. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P & D de fármacos. Quim Nova. 2011;34(10):1770-8.
- 34. Blundell TL, Sibanda BL, Montalva RW, Brewerton S, Chelliah V, Worth CL, et al. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. Phil Trans R Soc B. 2006;361:413-423.
- 35. Nayeem A. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: From sequence alignments to structural models. Protein Sci. 2006;15(4):808-24.
- 36. Durrant, J. D.; McCamon JA. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. BioMed Cent Biol. 2011;9(71):1-9.
- 37. Ma DL, Chan DS, Chung-Hang L. Molecular docking for virtual screening of natural product databases. Chem Sci. 2011;2:1656-65.