



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL LEISHMANICIDA DE COMPUESTOS
VEGETALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS**

**VALENTINA GALLAGO ZAMBRANO
CLAUDIA NATALI GAVIRIA RAMIREZ**

**ANDRES CAMILO GONZALEZ
DIANA MARCELA PARRA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C. 25/04/2025**



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL LEISHMANICIDA DE COMPUESTOS
VEGETALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS**

APROBADA_____

JURADOS_____

ASESORES: ANDRES CAMILO GONZALEZ, DIANA MARCELA PARRA

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD**

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA D.C. 25/04/2025

Índice

- 1. Resumen**
- 2. Introducción a la problemática**
- 3. Justificación**
- 4. Objetivo general**
- 5. Objetivos específicos**
- 6. Antecedentes**
- 7. Estado del arte**
- 8. Marco Referencial**
 - 8.1. Descripción de la enfermedad
 - 8.2. Agente etiológico
 - 8.3. Ciclo de vida
 - 8.4. Epidemiología
 - 8.5. Tratamientos farmacológicos
 - 8.6. Desafíos en el tratamiento de la leishmaniasis
 - 8.6.1. Problemática social
 - 8.6.2. Resistencia clínica a fármacos
 - 8.6.2.1 Antimoniales pentavalentes
 - 8.6.2.2 Miltefosina
 - 8.6.2.3 Isetionato de pentamidina
 - 8.6.2.4 Anfotericina B liposomal
 - 8.7. Nuevas alternativas terapéuticas
 - 8.7.1. Blancos terapéuticos estudiados
 - 8.7.1.1. Leishmanolisina
 - 8.7.1.2. Fumarato reductasa

8.7.1.3. Ribonucleótido reductasa

8.7.1.4. Fosfatasas de especificidad dual (DUSPs)

8.7.1.5. Topoisomerasa II

8.8. Productos sintéticos y naturales prometedores

8.9. Docking molecular

8.9.1. Energía de afinidad

8.9.2. Root Mean Square Deviation (RMSD)

8.9.3. Fuerzas de Van der Waals

8.9.4. Puentes de hidrógeno

9. Metodología

9.1. Búsqueda de proteínas blanco de *Leishmania* y moléculas orgánicas como candidatos terapéuticos

9.2. Búsqueda de estructuras tridimensionales

9.3. Análisis de homología

9.4. Búsqueda de estructuras químicas

9.5. Preparación de ligandos

9.6. Acoplamiento molecular – Multi screening

9.7. Acoplamiento molecular entre macromoléculas y ligandos con mejores energías de afinidad

9.7.1. Identificación de sitios activos

9.7.2. Acoplamiento molecular dirigido

9.7.3. Análisis de interacciones proteína-ligando

10. Resultados

10.1. Proteínas blanco seleccionadas

10.2. Análisis de homología

10.3. Acoplamiento molecular-multi screening

10.4. Acoplamiento molecular entre interacciones proteína-ligando con mejores energías de afinidad

11. Discusión de resultados

11.1. Comparación con otros estudios computacionales

12. Conclusiones

13. Referencias bibliográficas

14. Anexos



Resumen

Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa transmitida por vectores y causada por los parásitos del género *Leishmania* que afecta piel, mucosas y vísceras. Su tratamiento actual, particularmente el uso de compuestos de antimonio pentavalente ha demostrado una alta eficacia, sin embargo, se asocian con efectos secundarios graves como dolor abdominal, náuseas, pancreatitis y cambios electrocardiográficos. Este proyecto pretende desarrollar a partir de una recolección de datos acerca de blancos claves en el desarrollo del parásito y sustancias con potencial para inhibir dichas dianas apoyado del posterior desarrollo de ensayos *in silico*, una alternativa terapéutica que reduzca la toxicidad en el organismo. Los resultados sugieren que la quercetina unida al Ribonucleótido reductasa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* representa la opción más prometedora como agente terapéutico potencial, respaldada por el mayor número y calidad de interacciones moleculares observada. Además, luteolina unida la misma proteína diana mostró un desempeño sólido al enfrentarse con *L. guyanensis* y *L. panamensis*.

Palabras clave: leishmaniasis, parásitos, efectos secundarios, toxicidad, quercetina, ribonucleótido reductasa, agente terapéutico.

Abstract

Leishmaniasis is a vector-borne infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania* that affects the skin, mucous membranes, and viscera. Current treatment,

particularly the use of pentavalent antimony compounds, has demonstrated high efficacy; however, it is associated with serious side effects such as abdominal pain, nausea, pancreatitis, and electrocardiographic changes. This project aims to develop, based on data collection on key targets in the development of the parasite and substances with the potential to inhibit these targets, supported by the subsequent development of in silico assays, a therapeutic alternative that reduces toxicity in the organism. The results suggest that quercetin bound to *Leishmania (Viannia) braziliensis* ribonucleotide reductase represents the most promising option as a potential therapeutic agent, supported by the greater number and quality of molecular interactions observed. Furthermore, luteolin bound to the same target protein showed a solid performance when challenged with *L. guyanensis* and *L. panamensis*.

Keywords: leishmaniasis, parasites, side effects, toxicity, quercetin, ribonucleotide reductase, therapeutic agent.

Introducción a la problemática

Se denomina leishmaniasis a la enfermedad infecciosa transmitida por vectores y causada por los parásitos del género *Leishmania*. Si bien, su presencia es global (menos en Australia y Antártida) es mucho más común en Latinoamérica (1). Según la OMS la incidencia de leishmaniasis es de aproximadamente de 600 000 a 1 millón de casos por año (2). La enfermedad, representa un problema importante para la salud pública en Colombia a lo largo de todo país con excepción de las islas de San Andrés y Providencia en donde el mar que rodea las islas actúa como barrera natural para la proliferación de mosquitos y otros insectos vectores de dicha enfermedad, tampoco se distribuye en Bogotá D.C. (2)

Hasta el año 2023 según lo expuesto en el boletín epidemiológico del Instituto Nacional de Salud (INS) la enfermedad se mantiene de forma endémica en aproximadamente 100 países y Colombia es uno de ellos, se han identificado 11 de las 20 especies parasitarias capaces de infectar únicamente a los humanos (3). En el Reporte Epidemiológico de las Américas de junio del 2024 casi todos los casos reportados en Colombia corresponden a la forma cutánea de la leishmaniasis (98,2 %), mientras que un porcentaje mucho menor afecta las mucosas (1,7 %) y solo una fracción mínima, el 0,1 %, corresponde a la forma visceral, que es la más grave. (2). Por lo tanto, la vigilancia y control de este evento sigue siendo fundamental (4).

A la hora de realizar el diagnóstico de leishmaniasis este puede ser presuntivo o definitivo. En un primer momento, el diagnóstico presuntivo es respaldado por las características clínicas y aspectos epidemiológicos importantes, entre ellos el lugar de origen del paciente o viajes anteriores. La OMS enfatiza en que haya confirmación diagnóstica frente a cualquier sospecha de leishmaniasis ya que la clínica del paciente que presenta la enfermedad no es específica y sumado a ello el tratamiento tiene una

alta toxicidad, complejidad y costo (5–7).

En el año 2023, el Ministerio de Salud y Protección Social publicó la cuarta versión de los “Lineamientos de atención clínica integral para Leishmaniasis en Colombia” en donde se describen las diferentes opciones terapéuticas que garanticen un tratamiento oportuno el cual funcione de manera efectiva contra las tres manifestaciones de la leishmaniasis: cutánea, mucosa y visceral. En ese sentido, se indica que después de establecer el diagnóstico para leishmaniasis se inicia el manejo farmacológico (el Ministerio de Salud indica que es importante tomar estudios de laboratorio previos según el tratamiento que vaya a ser administrado). En los pacientes que presentan casos de leishmaniasis cutánea se describen las dosis y vía de administración de cuatro medicamentos: antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina) y miltefosina como primera línea de tratamiento, además de isetionato de pentamidina, anfotericina B liposomal y anfotericina B deoxicolato como segunda línea. La terapia para tratar los casos de leishmaniasis mucosa incluye los medicamentos ya mencionados con una variación en la administración de antimonios pentavalentes, en donde, basándose en una recomendación de la OMS se realiza la administración de estos en conjunto con una dosis oral de pentoxifilina. Por otra parte, el tratamiento para los casos de leishmaniasis visceral se reduce a la administración de anfotericina B liposomal como primera línea y antimoniales pentavalentes o pentamidina como segunda línea de tratamiento (8).

Hasta el año 1970 la dosis adecuada de antimoniales pentavalentes para el tratamiento de leishmaniasis era 10 mg/kg por un tiempo estimado de 6 a 10 días, no obstante, en cuatro distritos de India (país en donde la leishmaniasis ha representado un problema de salud pública desde hace siglos) se evidenció un fracaso terapéutico del 30% por esa razón un grupo de expertos de la OMS recomendó aumentar la dosis del medicamento y extender el tiempo de uso a 20 mg/kg/día por un tiempo estimado de 30 días. Sin

embargo, en solo tres años un grupo de investigadores de la India encontró que la respuesta al tratamiento en zonas hiperendémicas como Bihar disminuyó de un 97% a un 64% lo que no dejó dudas de que el parásito es capaz de desarrollar una tolerancia progresiva a este fármaco y a otros medicamentos antileishmania a medida que son introducidos (9).

Desde su aplicación, se ha demostrado que estos medicamentos tienden a presentar una alta toxicidad a nivel renal, cardíaco, hepático y auditivo. Pese a que las dosis y duraciones del tratamiento establecidas pretenden favorecer al paciente al erradicar la enfermedad, no se considera en conjunto con dicho fin la importancia de generar la menor cantidad de efectos adversos, disminuir los casos en donde se presente falla terapéutica previniendo así la resistencia a los medicamentos, mejorando a su vez el cumplimiento y el costo de la terapia (9). Por lo anterior, se recalca la importancia de redireccionar los esfuerzos al estudio de nuevas dianas involucradas en procesos clave del parásito y el desarrollo de nuevos fármacos que resulten más inofensivos para el cuerpo humano. Es así, que el presente proyecto pretende desarrollar a partir de una recolección de datos exhaustiva y el posterior desarrollo de ensayos in silico, una alternativa terapéutica que reduzca la toxicidad en el organismo, los costos y los casos en donde se evidencie una falla terapéutica en el tratamiento de la leishmaniasis a expensas de las especies de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *Viannia*.

Justificación

En la actualidad se comprende las disparidades que aluden a las manifestaciones clínicas, la respuesta terapéutica y la sensibilidad de la Leishmaniasis a los medicamentos para diversas especies y países, es gracias a este problema de salud pública que se deberían estudiar y evaluar las nuevas opciones terapéuticas para las especies circulantes en cada país (10)

Esta enfermedad es endémica de áreas tropicales y subtropicales (11) ubicada comúnmente en continentes de Asia, África y América (12) Las lesiones correspondientes pueden variar en tamaño, número y ubicación como la piel, tejido subcutáneo, mucosa oronasal o generalizada en el sistema mononuclear fagocítico (13) Los tratamientos actuales para la leishmaniasis, particularmente el uso de compuestos de antimonio pentavalente, han demostrado una alta eficacia, sin embargo, se asocian con efectos secundarios graves como dolor abdominal, náuseas, pancreatitis y cambios electrocardiográficos. Además, requiere administración parenteral, lo que aumenta el sufrimiento del paciente. Aunque se han intentado estrategias como la alteración para reducir la toxicidad, la resistencia a estos fármacos está aumentando, especialmente en zonas endémicas (13,14)

Por otro lado, medicamentos como la pentamidina y la anfotericina B también presentan serios inconvenientes. Aunque la pentamidina se administra cada dos días, provoca efectos secundarios importantes como taquicardia, hipotensión y disfunción renal en el 50% de los casos. La anfotericina B es eficaz, es cara y tiene efectos tóxicos importantes, como daño renal y desequilibrio electrolítico. Es de gran importancia encontrar tratamientos más accesibles, menos tóxicos y más fáciles de administrar, especialmente para las poblaciones vulnerables y los países en desarrollo. La alta toxicidad y el costo de los tratamientos actuales los hacen inasequibles, lo que crea una necesidad urgente de desarrollar opciones de tratamiento más seguras, efectivas y accesibles que puedan beneficiar a las comunidades más necesitadas sin causar efectos secundarios graves ni desarrollar resistencia a los medicamentos (13)

Conforme esta emergencia avanza se hace más evidente la importancia de encontrar innovaciones terapéuticas para leishmaniasis y este es un hecho perceptible frente al gremio de la salud puesto que se han investigado diferentes fármacos como la

miltefosina un antineoplásico, la paromomicina un antibiótico que altera la síntesis de proteínas y membrana mitocondrial siendo eficaces contra la Leishmaniasis, sin embargo, al cabo de unos años se ha encontrado una creciente resistencia a los mismo. Por otro lado, se encuentra la investigación dirigida a compuestos vegetales secundarios en donde se ha encontrado que su extracción y uso en forma pura o cruda es eficaz, es debido a sus propiedades farmacológicas que se han vuelto fuente importante de investigación (15)

Mejorar la calidad de vida de pacientes con Leishmaniasis es de crucial importancia, en especial cuando hablamos de poblaciones vulnerables, siendo estas las más afectadas por esta enfermedad. Tarea que no resulta sencilla debido a los tratamientos actuales que generan un gran coste y toxicidad, esto sumado a la falta de inversión dirigida al desarrollo de avances terapéuticos ha limitado el progreso y resolución para dicho problema. Es entonces fundamental aumentar la inversión en investigación de medicamentos más efectivos, menos tóxicos y con mayor accesibilidad, así como reducir cargas económicas y sociales asociadas leishmaniasis (15).

Objetivo general

Evaluar, mediante estudios *in silico*, el potencial de ciertas sustancias de origen vegetal para inhibir la función de proteínas clave en el metabolismo del parásito protozoario *Leishmania*, específicamente en tres especies del subgénero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*). Esto, con el propósito de identificar una alternativa farmacológica más segura, eficaz y accesible que los tratamientos convencionales.

Objetivos específicos

- Identificar proteínas diana clave en el desarrollo del parásito *Leishmania*, enfocándose en tres especies del subgénero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*.

- Seleccionar compuestos de origen vegetal con actividad leishmanicida reportada en la literatura científica.
- Evaluar la interacción entre los compuestos seleccionados y las proteínas diana utilizando herramientas de acoplamiento molecular (*docking*).
- Analizar la calidad de las interacciones ligando-proteína considerando tres aspectos clave: energía de afinidad, número de enlaces y tipo de interacción, con el fin de identificar los compuestos con mejor desempeño.
- Comparar los resultados obtenidos con estudios previos para determinar cuál de las sustancias evaluadas muestra mayor potencial como futura alternativa terapéutica contra la leishmaniasis.

Antecedentes

La leishmaniasis representa un problema de salud pública concentrada en regiones tropicales que impacta principalmente a comunidades vulnerables. Patología originada por parásitos del género *Leishmania*, la cual se manifiesta en diferentes formas clínicas, siendo la leishmaniasis visceral una de las más graves. A pesar de los esfuerzos por controlar la enfermedad, los tratamientos existentes no son completamente eficaces, y algunos de ellos presentan efectos secundarios importantes. Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas sigue siendo un área de interés fundamental en la investigación biomédica (16)

En los últimos años, se ha explorado el potencial de compuestos sintéticos como los derivados de la espiroacridina, especialmente el compuesto

11, el cual ha mostrado una actividad leishmanicida destacada in vitro contra

Leishmania infantum, parásito que comúnmente tiene una forma clínica de tipo visceral.

Los estudios han revelado que AMTAC 11 presenta una baja toxicidad en células

humanas, lo que lo hace una opción atractiva como tratamiento para la leishmaniasis, especialmente en contextos de recursos limitados (17)

AMTAC 11 muestra una concentración inhibitoria 50% de 1,109 $\mu\text{g/mL}$ en formas promastigotes y una concentración efectiva 50% de 0,974 $\mu\text{g/mL}$ en formas amastigotas, lo que indica una alta eficacia contra ambas formas del parásito. Estos valores sugieren que AMTAC 11 podría ser altamente efectivo para tratar la leishmaniasis, inhibiendo tanto la forma flagelada como la intracelular del parásito (17)

Los estudios de acoplamiento molecular han demostrado que AMTAC 11 interactúa con enzimas clave de *Leishmania infantum*, como la tripanotona reductasa y la ADN topoisomerasa I. Estas interacciones pueden interferir con los procesos metabólicos del parásito, dificultando su supervivencia y replicación. La identificación de estos mecanismos de acción refuerza el potencial de AMTAC 11 como un agente terapéutico prometedor para la leishmaniasis (17).

Una de las ventajas más destacadas de AMTAC 11 es su baja toxicidad en células humanas. Este compuesto no mostró toxicidad significativa hasta la dosis más elevada que se ensayó, en este caso fue de 100 $\mu\text{g/mL}$, lo que sugiere que tiene una alta selectividad por el parásito, sin causar efectos secundarios perjudiciales en los tejidos humanos. Esta característica es de gran importancia para garantizar tratamientos seguros a largo plazo (17).

Además de los compuestos sintéticos como AMTAC 11, los compuestos esenciales derivados de origen vegetal también han evidenciado un potencial significativo como tratamientos alternativos para la leishmaniasis. Un ejemplo de ello es el aceite esencial de *Moringa oleifera*, cuyas propiedades medicinales han sido ampliamente reconocidas. En estudios in silico, varios compuestos de *Moringa oleifera* han mostrado afinidades

favorables con el sitio catalítico de la tripanotiona reductasa, enzima indispensable en cuanto a la viabilidad de *Leishmania* (18).

Compuestos como la apigenina, quercetina e isorhamnetina, extraídos de *Moringa oleifera*, han demostrado interacciones favorables con la tripanotiona reductasa de *Leishmania infantum*. Estas moléculas podrían servir como punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos basados en derivados naturales, lo que representa una alternativa a los tratamientos sintéticos convencionales (18).

Dentro de este marco, los estudios de acoplamiento molecular y las simulaciones in silico juegan un papel crucial al identificar posibles dianas terapéuticas en el parásito. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que los compuestos de *Moringa oleifera* tienen el potencial de inhibir la actividad de la tripanotiona reductasa, lo que podría interferir con los mecanismos antioxidantes del parásito, cruciales para su supervivencia en el hospedador (18).

Otras plantas como *Peperomia inaequalifolia* también han sido evaluadas por sus propiedades antimicrobianas. En un estudio reciente, el aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* fue analizado por su efecto supresor en el desarrollo libre de *Leishmania spp.*, demostrando una actividad leishmanicida significativa en pruebas in vitro. Estos aceites esenciales son particularmente atractivos debido a su origen natural y su menor impacto en la salud humana (19).

El aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* fue evaluado mediante herramientas computacionales y técnicas de inteligencia artificial, lo que permitió identificar sus compuestos bioactivos más relevantes. El uso de estas tecnologías avanzadas ofrece una ventaja al permitir un análisis más rápido y preciso de la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad de estos compuestos, lo que acelera el proceso de identificación de posibles tratamientos (19).

Otro ejemplo de plantas con propiedades leishmanicidas es el género *Solanum*, que incluye especies como *Solanum americanum* y *Solanum guaraniticum*. En estudios recientes, se ha demostrado que ciertos fitoconstituyentes de estas plantas tienen afinidades con la tripanotona reductasa, sugiriendo que podrían actuar como inhibidores de esta enzima clave para el parásito (20).

Dentro de las moléculas estudiadas, la solasodina, la solamargina y la manghaslina han mostrado interacciones con la tripanotona reductasa. Sin embargo, solo la solasodina ha mostrado una interacción estable y favorable con la enzima, lo que la establece como un candidato con gran potencial para futuros estudios in vitro (20). Además, la solasodina no presenta infracciones a la regla de Lipinski, la cual implica que la biodisponibilidad oral depende del equilibrio entre la capacidad de solubilización en agua del compuesto activo y su capacidad para atravesar pasivamente diversas membranas biológicas sugiriendo buenas propiedades farmacológicas y alta absorción gastrointestinal (21).

Por otro lado, la solamargina y la manghaslina han mostrado interacciones inestables y desfavorables con la tripanotona reductasa, lo que limita su potencial como tratamientos para la leishmaniasis. Estos hallazgos destacan la importancia de la estabilidad de las interacciones moleculares al evaluar la viabilidad de nuevos tratamientos (21).

El uso de técnicas computacionales en la investigación de la leishmaniasis ha permitido identificar dianas moleculares clave y rutas metabólicas que podrían ser moduladas por nuevos compuestos. En particular, se ha identificado que los aceites esenciales de *Schinus molle* y *Myrcianthes hallii* pueden inducir la apoptosis en los parásitos, lo que interrumpe su ciclo de vida y reduce su capacidad de infectar a los hospedadores (21). Los aceites esenciales de estas plantas endémicas han demostrado inhibir el desarrollo de promastigotes para algunas especies de *Leishmania*, con efectos citotóxicos

observados a concentraciones relativamente bajas. Los estudios in silico también han sugerido que estos aceites esenciales interactúan con varias dianas moleculares involucradas en la apoptosis, como las vías de señalización de calcio y AMPc (21). La inducción de apoptosis en los parásitos es un mecanismo de acción particularmente eficaz, ya que detiene su proliferación y elimina las células infectadas. La activación de caspasas y la fragmentación del ADN en los parásitos son algunos de los eventos bioquímicos que caracterizan este proceso, lo que lo convierte en un enfoque terapéutico prometedor (21).

Los aceites esenciales también pueden actuar a nivel de las rutas metabólicas del ácido araquidónico y en regulación de respuesta inflamatoria, lo que refuerza su potencial terapéutico. Estos mecanismos pueden ayudar a reducir la carga parasitaria y mejorar la actividad inmunológica por el hospedador contra el agente (21).

El estudio de aceites esenciales mediante herramientas computacionales también ha permitido predecir sus interacciones con diversas dianas moleculares en el parásito, lo que ha sido fundamental para comprender su mecanismo de acción y guiar el diseño de nuevos fármacos. Estos avances destacan la importancia de la investigación multidisciplinaria en la búsqueda de tratamientos innovadores para la leishmaniasis ((22)

Estado del Arte

La leishmaniasis es considerada una enfermedad tropical desatendida, la cual es provocada por parásitos del género *Leishmania* y transmitida por los insectos flebótomos pertenecientes principalmente a dos géneros: *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, dependiendo de la zona. En el continente americano, conocido como el Nuevo Mundo los insectos que transmiten la enfermedad incluyen varias especies que antes se clasificaban dentro de *Lutzomyia* pero que en la actualidad se clasifican en géneros

como *Nyssomyia*, *Psychodopygus* y otros (2) Colombia es el segundo país con más casos de leishmaniasis en Latinoamérica, de hecho, la leishmaniasis es endémica en todo el país, excepto en las islas de San Andrés y Providencia (2). A pesar de los esfuerzos por controlar la enfermedad, los tratamientos actuales presentan limitaciones en eficacia y seguridad, con efectos secundarios significativos y desarrollo de resistencia parasitaria (23). Esto resalta la urgente necesidad de investigar y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que sean más seguras, efectivas y accesibles, especialmente para las poblaciones vulnerables (24).

Los tratamientos convencionales para la leishmaniasis incluyen compuestos de antimonio pentavalente, como el antimoniato de meglumina, así como anfotericina B, miltefosina y pentamidina (25). Si bien estos fármacos pueden ser eficaces, presentan inconvenientes como alta toxicidad (dolor abdominal, náuseas, pancreatitis y cambios electrocardiográficos), necesidad de administración parenteral, costos elevados y creciente resistencia parasitaria (25).

El uso indiscriminado de antimoniales pentavalentes ha llevado a que el parásito desarrolle de resistencia. La resistencia a los antimoniales, por ejemplo, se ha asociado con la sobreproducción de tripanotona y alteraciones en los transportadores de membrana del parásito (26). La resistencia a la miltefosina se debe a una baja en la adherencia del fármaco por parte del parásito (27). Las alteraciones en los transportadores específicos imposibilitan la absorción de pentamidina en las mitocondrias del parásito (9). La resistencia a la anfotericina B puede involucrar alteraciones en los lípidos de la membrana celular del parásito (9).

Ante estos desafíos, la investigación se ha enfocado en identificar nuevas dianas terapéuticas y evaluar el potencial de compuestos sintéticos y naturales. En los últimos años, se han explorado derivados de la espiroacridina, como el AMTAC 11, que ha

mostrado actividad leishmanicida in vitro y baja toxicidad en células humanas (23). Además, se ha investigado el potencial de aceites esenciales de plantas como *Moringa oleifera* y *Peperomia inaequalifolia*, así como fitoconstituyentes de especies del género *Solanum*. Estos compuestos han mostrado actividad contra el parásito y, en algunos casos, mecanismos de acción novedosos, como la inducción de apoptosis (23,28). Por lo anterior, las investigaciones se han dirigido a la identificación y validación de nuevas dianas moleculares en el parásito, como la tripanotiona reductasa, la ADN topoisomerasa II, la leishmanolisina, la fumarato reductasa, la ribonucleótido reductasa y las fosfatasa de especificidad dual (DUSPs). Puesto que, modular la actividad de estas proteínas podría interferir con procesos esenciales para la supervivencia y replicación del parásito (29–32) .

Marco referencial

Descripción de la enfermedad

Se denomina "Leishmaniasis" al grupo de enfermedades de carácter crónico producidas por los parásitos protozoarios pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* y género *Leishmania*. Su transmisión se da por medio de los vectores del género *Lutzomyia* en el Nuevo mundo y *Phlebotomus* en el Viejo mundo (33).

Agente etiológico

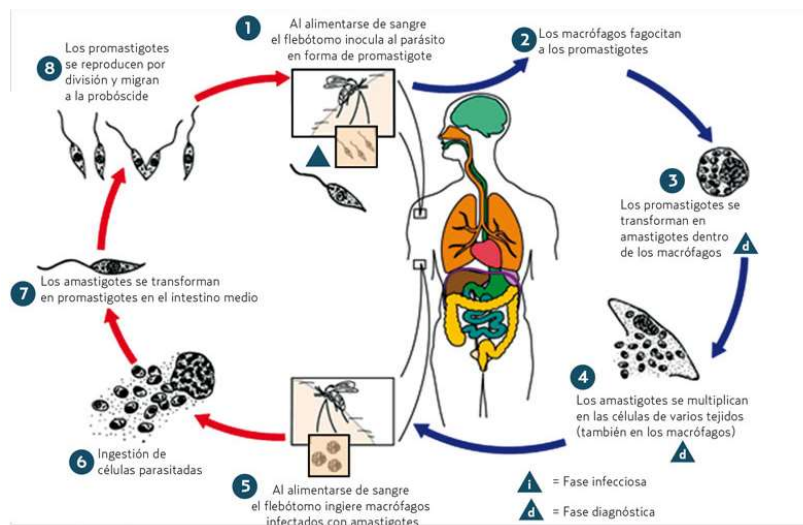
El agente etiológico causal de estas afecciones es un parásito el cual posee dos formas principales en su ciclo de vida: amastigote y promastigote. El primero, se caracteriza por presentar una morfología ovalada cuyo tamaño va de 2 a 5 micras de longitud, no presenta flagelo y posee una estructura llamada kinetoplasto. El kinetoplasto es una mitocondria la cual contiene DNA extracelular en forma de círculo, este se ubica al interior de los macrófagos de los hospederos. Por otra parte, los promastigotes poseen una estructura alargada, su tamaño comprende entre 10 a 15 micras de longitud, poseen

núcleo y kinetoplasto el cual está ubicado en el extremo subterminal o terminal del parásito de *Leishmania*. En esta forma el parásito si posee flagelo lo que le permite moverse hasta la probóscide del mosquito y ser capaz de infectar al ser humano y los demás hospederos (34).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Leishmania* se compone de dos partes importantes: Una en el vector y la otra en el hospedero, a esto se le conoce como ciclo digenético. En un primer momento la hembra del género *Lutzomyia* o *Phlebotomus* ingiere los amastigotes de un hospedero infectado y pasan al tracto digestivo del vector en donde se desarrollan y se convierten en promastigotes y por división binaria empiezan a reproducirse. Después de 4 o 5 días estos migran a la probóscide del mosquito, de esa manera el vector al picar al hospedero va a desprender estas formas e ingresarán al torrente sanguíneo en donde los promastigotes serán fagocitados por los macrófagos y encerrados en los fagolisosomas para finalmente diferenciarse en su forma aflagelar, es decir, en amastigote. El parásito se divide en dicha forma hasta causar la lisis del macrófago infectado para así ir por su siguiente blanco celular (34).

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*



Fuente: Adaptado de AMF Actualización de medicina. Ciclo de vida de Leishmania [Internet]. Tomado en: <https://amf-semfyc.com/es/web/articulo/leishmaniasis>

Epidemiología

La leishmaniasis es una enfermedad de presencia global, no obstante, se ha encontrado un mayor número de casos en Sudamérica, la cuenca mediterránea y ciertas zonas de Asia y África. Existen tres formas clínicas en las que se presenta la enfermedad: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LMC), sin embargo, según datos proporcionados por la OMS en el año 2018 aproximadamente el 85% de los casos de leishmaniasis cutánea se registraron en 10 países siendo Colombia parte de la lista (35).

Si bien la distribución geográfica de la leishmaniasis es global son las especies pertenecientes al complejo *Viannia* las más comunes y de mayor importancia en el territorio nacional. Uno de los agentes etiológicos de mayor relevancia es *L. braziliensis* cuyo reservorio son los roedores y los perros. Es el agente causal de dos formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea, en la primera se presentan lesiones ulceradas y en la segunda se evidencian lesiones ulceradas en la mucosa oral y nasal las cuales pueden extenderse a la orofaringe y a la laringe. Se distribuye principalmente por América Central y del Sur, según la literatura solo un 6% de los casos se resuelven de manera espontánea mientras que el porcentaje restante produce lesiones graves (36).

Continuando, *L. panamensis* ocupa también un lugar importante como patógeno responsable de los casos de leishmaniasis en su presentación cutánea y mucocutánea en Panamá, Costa Rica y Colombia. Su reservorio es el oso perezoso y a diferencia de *L. braziliensis* la enfermedad causada por esta especie no se cura de manera espontánea, por el contrario, se extiende por medio de los vasos linfáticos de modo que lo que inició como una úlcera superficial se convierte en una afección mucocutánea (36).

Por último, en América del Sur también se encuentra una tercera especie, *L. guyanensis*, el reservorio de este son las zarigüeyas, osos perezosos y hormigueros. La forma cutánea se caracteriza por producir múltiples úlceras de manera superficial que se distribuyen a lo largo del vaso linfático (distribución esporotricóide) de modo que una afección cutánea puede dar a lugar una afección mucocutánea posteriormente. Aunque normalmente requiere de tratamiento en ocasiones se puede resolver de manera espontánea en aproximadamente 6 meses (36).

Tratamientos farmacológicos

Desde mediados del siglo XX el tratamiento estándar para el control de los casos de leishmaniasis consiste en la administración de antimonios pentavalentes como el antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio. No obstante, su eficacia, según diferentes estudios, está entre un 36% a 96% puesto que el éxito depende en gran medida de la farmacocinética del medicamento, la respuesta del individuo y de la susceptibilidad intrínseca del parásito ((37). Como se muestra en la tabla 1, en Colombia, según los lineamientos establecidos por el Ministerio de Salud y Protección Social para el tratamiento de los casos confirmados de las tres formas clínicas de leishmaniasis se hace uso de antimoniales pentavalentes, miltefosina, isetionato de pentamidina, anfotericina B liposomal y anfotericina B deoxicolato (8).

Desafíos en el tratamiento de leishmaniasis

Problemática social

En un primer momento, se expuso el difícil acceso puesto que la mayor parte de los casos se concentran en áreas rurales dispersas en donde los centros médicos más cercanos son de primer nivel por lo cual no poseen la capacidad de resolución lo que genera a su vez un seguimiento al tratamiento deficiente por parte de la comunidad. En segunda instancia, se encuentra la calidad de la atención la cual está directamente

impactada por los recursos económicos que se adjudiquen y la continuación de estos.

Por último, la oportunidad conformada por tres factores claves: tiempo del diagnóstico, disponibilidad del tratamiento y tiempo en que se inicie el tratamiento (38).

Resistencia clínica a fármacos

Antimoniales pentavalentes

El mecanismo de acción de los antimonios pentavalentes (SbV) aún no se comprende por completo sin embargo se dice que su acción inicia en la conversión de estos en antimonio trivalente (SbIII) dentro del amastigote de modo que el medicamento penetra al parásito. Una vez ingresa afecta la vía del metabolismo del tiol al actuar sobre la enzima reductasa dependiente del tiol (TDR1) la cual es fundamental en la síntesis de desoxirribonucleótidos y funciones que al ser perjudicadas dejan al parásito dentro de la célula expuesto a la acción de las especies reactivas de oxígeno lo que finalmente produce su muerte (25). Entre las ventajas que se describen de este medicamento se encuentra su fácil disponibilidad y bajo costo, en especial en zonas endémicas las cuales se caracterizan por ser zonas de difícil acceso y de extrema pobreza. No obstante, este fármaco se ha asociado al desarrollo de cardiotoxicidad, cirrosis, cáncer pancreático y resistencia por parte del parásito (37).

Hasta hace 34 años, por más de seis décadas a nivel mundial se hizo uso de fármacos antimoniales pentavalentes para el tratamiento de los casos de leishmaniasis cutánea y visceral sin rastro alguno de desarrollo de resistencia a este y otros fármacos antileishmania. En India, un país con zonas hiperendémicas de casos de leishmaniasis producto de las condiciones ambientales, socioeconómicas y climáticas, el medicamento es gratuito y de fácil acceso. Lo anterior, generó que personal no cualificado administrara el medicamento en dosis no indicadas con el fin de, según se cree, disminuir la toxicidad en el organismo. El uso indiscriminado del medicamento en

zonas de intensa transmisión contribuyó directamente al desarrollo de mecanismos de resistencia adquirida a los fármacos por parte del parásito de *Leishmania* (9).

En cuanto a la resistencia a metales pesados como el antimonio (Sb) tanto en su forma pentavalente (Sb V) como trivalente (Sb III) se han descrito diferentes mecanismos, uno de ellos es la sobreproducción de tripanotona. La tripanotona, es una molécula que posee una potente acción antioxidante de modo que protege al parásito del daño oxidativo generado por el antimonio. Además, al unirse al Sb (antimonio) forma un complejo que dificulta la interacción con otras moléculas importantes. Por último, mantiene el equilibrio redox de la célula que es esencial a la hora de llevar a cabo funciones celulares. Entonces, en casos en que el parásito adquiere resistencia al medicamento se describe un aumento en la producción de tripanotona al aumentar la síntesis de precursores como el glutatión y las poliaminas. Además, se elevan los niveles de las enzimas necesarias para la catalización de las primeras etapas de la síntesis de dichos precursores: γ -glutamylcisteína sintetasa y ornitina descarboxilasa (9). Se ha descrito un segundo mecanismo enfocado en el transportador de membrana llamado PgpA y en la formación de complejos Sb-tiol (antimonio y moléculas de tiol como el glutatión o la tripanotona). En un primer momento, se consideraba que el transportador PgpA expulsaba el complejo Sb-tiol fuera de la célula, sin embargo, más tarde se demostró que este secuestra el complejo en un compartimento vacuolar dentro de la célula lo que reduce la concentración del medicamento en el citoplasma y a su vez la toxicidad. No obstante, diferentes estudios han confirmado que la resistencia a los antimoniales en el parásito de *Leishmania* es un proceso multifactorial y complejo que involucra más de un mecanismo (9).

Miltefosina

Como tratamiento de segunda elección frente a *Leishmania spp.* se encuentra la

miltefosina, su forma de acción no está descrito por completo, sin embargo, se sugiere que al ser un análogo de fosfocolina (hexadecilfosfocolina) tiene un efecto directo sobre rutas metabólicas que se asocian a los fosfolípidos de la membrana celular del parásito causando así la muerte de este. Este medicamento representó una mejoría a nivel de eficacia y duración del tratamiento, no obstante, es descrito como de baja calidad puesto que diferentes especies de *Leishmania* han mostrado ser resistentes, además, se ha encontrado que puede ser causante de teratogenicidad, toxicidad renal y hepática (27). La resistencia a este medicamento se debe a una baja en la adherencia de éste por parte del parásito. Existe un transportador de membrana conocido como LDMT el cual posee un papel indispensable en la captación del fármaco, es así que la mutación de dos alelos puntuales en el transportador genera una disminución de la absorción de la miltefosina (9).

Isetionato de Pentamidina

El primer registro del uso del isetionato de pentamidina para el tratamiento de la leishmaniasis fue utilizado en el año de 1940 por Kirt y McDonald. Este fármaco interfiere con el transporte de aminoácidos, de ese modo compite con las poliaminas por ácidos nucleicos, además, también tiene la capacidad de unirse al DNA del kinetoplasto. Para su uso es necesario realizar un curso corto, pese a eso, se ha demostrado que es causante de hiperglucemia, hipotensión, taquicardia y cambio electrocardiográficos (39) Este medicamento es ampliamente utilizado como tratamiento de segunda línea, no obstante, desde su uso inicial en la década de los 80 's la eficacia en el tratamiento disminuyó de un 95% a un 70% en sólo diez años. Las alteraciones en transportadores específicos imposibilitan la absorción del medicamento en las mitocondrias del parásito lo que contribuye a la supervivencia de éste (9).

Anfotericina B Liposomal

La anfotericina B en su forma encapsulada en liposomas resulta ser menos nefrotóxica, no obstante, se ha encontrado que es causante de escalofríos y rigidez durante la aplicación de la inyección. Entre las ventajas se encuentra que es eficaz y su toxicidad es baja, pero es uno de los medicamentos más costosos lo que limita su distribución en zonas altamente afectadas por la enfermedad. Presenta una afinidad fuerte por el ergosterol lo que le da preferencia a la membrana de hongos y en este caso, el parásito de *Leishmania*. El ergosterol posee un rol clave en la estructura y función de la membrana plasmática del parásito, por ello al unirse el fármaco a este esterol se forman poros en la membrana lo que promueve la salida de iones y moléculas que son fundamentales para la supervivencia del parásito (28).

Pese a ser un fármaco ampliamente utilizado en los casos de fracaso en el tratamiento antimonial, un estudio demostró en un clon de *Leishmania donovani* el desarrollo de un mecanismo de resistencia al estar expuesto de manera prolongada a la anfotericina B. Los parásitos demostraron un cambio significativo en la composición de los lípidos de su membrana celular, en específico en los niveles de ergosterol los cuales al disminuir impactan de manera directa la función del medicamento. La disminución en los niveles de ergosterol se debe a una deficiencia de la enzima S-adenosil-L-metionina-C24-sterol-metiltransferada (SCMT) la cual es fundamental en la producción de ergosterol. Lo anterior, es producto de una alteración en la expresión de los genes que codifican para la SCMT, ya que al estar un gen ausente el otro se sobreexpresa impidiendo la producción de una proteína funcional (9).

Nuevas alternativas terapéuticas

En respuesta a la creciente problemática en el tratamiento de los casos de leishmaniasis a causa de la toxicidad y difícil acceso a los medicamentos combinado con el gradual desarrollo de mecanismos de resistencia a estos fármacos por parte del parásito, se hace

cada vez más necesario el estudio de nuevos blancos y nuevas sustancias que demuestren una alta efectividad a la hora de eliminar al parásito de *Leishmania* (30).

Blancos terapéuticos estudiados

Leishmanolisina

Antes nombrada como GP63 o proteinasa ubicada en la superficie del promastigote (PSP) la leishmanolisina, es una glicoproteína de superficie abundante expresada por todas las especies del parásito de *Leishmania*. Esta glicoproteína se encuentra anclada al glicofosfatidilinositol (GPI) y actúa como una metaloproteinasa neutra la cual posee actividad en rangos de pH que van de 6 a 9 (40).

Como se mencionó es una glicoproteína abundante en los promastigotes, se estima que hay aproximadamente 5×10^5 moléculas de la proteína por célula. Por otro lado, esta funciona como una enzima al catalizar reacciones químicas, ejemplo de ello es su actividad contra los sustratos polipeptídicos. Lo anterior, sugiere que la leishmanolisina es una proteasa, es decir, una enzima capaz de degradar otras proteínas. Esta actividad resulta clave para la supervivencia del parásito puesto que inactiva componentes como el C3 el cual pertenece al sistema de complemento, además facilita la invasión y la supervivencia en los macrófagos al modificar la superficie de estos. Por último, degrada los componentes de la matriz extracelular lo que promueve la diseminación del parásito. La leishmanolisina, también tiene la capacidad de actuar como ligando al interactuar con receptores en la superficie de los macrófagos lo cual favorece la supervivencia del parásito. Es una proteína multifuncional la cual está regulada durante el ciclo de vida del parásito lo que permite que el parásito adapte su superficie a los ambientes que encuentra en el vector y el huésped (40).

Fumarato Reductasa

La fumarato reductasa es una isoenzima dependiente de NADH que se localiza tanto en

el glicosoma como en la matriz mitocondrial. Las especies de NAD⁺/NADH son fundamentales en la generación de energía en la mitocondria por ello resulta clave la interacción de diversas proteínas del parásito de *Leishmania* con el transporte de NAD⁺/NADH. El balance redox en los glicosomas de *Leishmania* se mantiene por la malato deshidrogenasa y la fumarato reductasa dependiente de NADH. La regeneración de NAD⁺ permite que continúe la actividad de la 1,3-dihidroxiacetona fosfato, produciendo glicerol-3-fosfato, que se transporta a la mitocondria (31).

La fumarato reductasa es clave en el metabolismo de *Leishmania*, catalizando la reducción de fumarato a succinato en condiciones anaeróbicas o microaerófilas, usando NADH como donador de electrones. Este proceso reemplaza la cadena respiratoria en condiciones de oxígeno limitado ($\text{Fumarato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Succinato} + \text{NAD}^+$.) (31).

En el glicosoma, un orgánulo especializado en el metabolismo de *Leishmania*, la fumarato reductasa convierte fumarato en succinato, facilitando la generación de energía anaeróbica. El succinato generado ingresa a un ciclo alternativo del ácido tricarboxílico para producir ATP y NADH, adaptándose a las condiciones anaeróbicas del parásito (31).

Ribonucleótido reductasa

El ribonucleótido reductasa cumple una función crucial en la síntesis de DNA en *Leishmania* al convertir los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, que son esenciales para la formación de cadenas de ADN. Sin esta enzima, el parásito no podría replicar su ADN ni reparar el daño genético, lo que impediría su proliferación y supervivencia.

La actividad de esta enzima está estrechamente vinculada al control de las especies reactivas de oxígeno en el parásito, ya que su función está relacionada con el metabolismo del NADPH, coenzima fundamental para la tripanotiona reductasa, que

ayuda a mantener la tripanotoma en su forma funcional. Esta interacción resalta el ribonucleótido reductasa como un componente clave para la viabilidad del parásito, convirtiéndose en un objetivo potencial para el desarrollo de terapias contra la leishmaniasis.

Fosfatasa de especificidad dual (DUSPs)

Esta familia de enzimas son fundamentales en el control de las rutas de señalización de las MAPKs de especificidad dual (MAP quinasas). Su papel resulta fundamental en el crecimiento, la diferenciación y la respuesta al estrés, de esta manera el parásito de *Leishmania* necesita una regulación precisa en la búsqueda por adaptarse a diferentes entornos como el vector (insecto flebótomo) y el huésped (mamífero). Las fosfatasa de especificidad dual (DUSPs) tienen una acción sobre los residuos de tirosina y serina/treonina al provocar una desfosforilación en sus sustratos proteicos. Lo anterior, les permite regular las MAPKs las cuales participan en la transducción de señales en respuesta a distintos estímulos. La intervención de las DUSPs no solo se reducen a las MAP quinasas también pueden regular proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular lo que influye en la transición del promastigote a amastigote así como su diferenciación. Un estudio realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC) en el año 2018 indicó que existe una conservación evolutiva lo que indica que a lo largo del tiempo las enzimas fosfatasa en *Leishmania* han permanecido sin cambios lo que indica que cumplen un rol clave en la biología del parásito de *Leishmania* (32).

Topoisomerasa II

La topoisomerasa II cataliza la ruptura transitoria de ambas cadenas de la doble hélice de ADN. Esto facilita el paso de una segunda doble hélice por medio de la ruptura, aliviando la tensión torsional acumulada durante la replicación y la transcripción.

Finalmente, la enzima religa las cadenas de ADN, restaurando la integridad de la molécula. La topoisomerasa II es crucial para desenredar las moléculas de ADN hijas entrelazadas que se forman durante la replicación. Esto asegura que haya una segregación de los cromosomas de manera correcta durante la división celular (41).

Los anteriores son solo algunos de los enfoques que resultan ser en extremo prometedores. En los últimos años, se concluyó que dada las problemáticas que han surgido alrededor de los tratamientos actuales y el desarrollo de mecanismos de resistencia hacia estos es necesario cambiar el rumbo hacia el fortalecimiento de nuevas alternativas terapéuticas que afecten funciones claves en el parásito lo que no favorezca el desarrollo de este en el huésped (41).

Productos sintéticos y naturales prometedores

Al identificar el enfoque más favorable para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, se ha conseguido un avance valioso en el desarrollo de nuevos medicamentos que logren controlar la infección, ejerciendo un daño mínimo en el hospedero. En busca de ese objetivo, en los últimos años se han investigado diferentes extractos de plantas y compuestos derivados de las mismas. Estas sustancias poseen actividad leishmanicida sin generar, a diferencia de los medicamentos tradicionales, una serie de efectos secundarios que resultan tóxicos para el organismo a largo plazo.

Además, se reduce el costo del tratamiento, lo que aumenta la disponibilidad y el acceso, sobre todo en países en desarrollo como Colombia.

Un ejemplo de ello es la quercetina es un flavonoide que se encuentra en frutas y verduras. Un estudio realizado en el año 2001 buscó el contenido de flavonoides (miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina y apigenina) en 62 plantas tropicales comestibles (42).

Los flavonoides son polifenoles, es decir una familia de compuestos químicos

caracterizados por tener múltiples grupos fenol. Su estructura química básica está conformada por un esqueleto de difenilpropano (C₆C₃C₆). Los flavonoides son una familia conformada por más de 4000 compuestos diferentes lo que la hace muy extensa. Existen cuatro clases de flavonoides: 4-oxoflavonoides (flavonas, flavonoles, etc.), antocianinas, isoflavonas, derivados del flavan-3-ol. En el estudio se encontró que el flavonoide el cual se encontró en mayores concentraciones fue la quercetina. En las hojas de cebolla se encontró el mayor contenido total de flavonoides siendo el de mayor concentración la quercetina 1497.5 mg/kg, seguido de la luteolina con 391.0 mg/kg. También se encontraron concentraciones considerables en las hojas de semambu, chile ave, té negro, brotes de papaya y guayaba (42).

Según un estudio del año 2019 demostró actividad leishmanicida en diferentes blancos como el Factor Nuclear Eritroide 2-Relacionado con 2 (Nrf2) en la especie *Leishmania braziliensis*. El mecanismo de acción consiste en una activación del Nrf2, el cual luego influye en la expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante y el metabolismo del hierro, como la heme oxigenasa-1 (HO-1). Esta regulación ayuda a agotar la reserva de hierro lábil disponible para el parásito. Otro target mencionado fue la enzima ribonucleótido reductasa en *Leishmania donovani* ya que la quercetina inhibe esta enzima, la cual es crucial para la síntesis de ADN en el parásito. Esta inhibición conduce a una reducción de la proliferación y promueve la muerte celular a través de mecanismos similares a la apoptosis (muerte celular programada). Por otro lado, también se ha demostrado actividad en la enzima topoisomerasa II ya que al ser inhibida se interrumpe la replicación y transcripción del ADN, lo que lleva a la promoción de la apoptosis en los parásitos. La quercetina también produce acción en la arginasa de *Leishmania amazonensis*, al ser inhibida conduce a una reducción en la síntesis de poliaminas necesarias para el crecimiento y la supervivencia del parásito. La

interacción de la quercetina con la arginina y el cofactor de manganeso (Mn^{2+}) resulta en la interrupción de la actividad de la arginasa. (Las poliaminas son importantes para el parásito, y la quercetina interfiere con su producción). Por último, se ha demostrado que induce ROS (Especies reactivas de oxígeno) de ese modo la quercetina causa estrés oxidativo dentro del parásito, lo que lleva a daño celular y muerte. Este es un mecanismo crucial, ya que los ROS pueden dañar los ácidos nucleicos y las proteínas esenciales para la supervivencia del parásito (42) .

Por otro lado, la luteolina también es un flavonoide que se encuentra en plantas incluidas el apio, tomillo, romero y orégano. Sin embargo, pese a presentar similitudes estructurales que la quercetina aún no se ha estudiado su actividad en la mayoría de los blancos presentados anteriormente. Entre los pocos estudios realizados se destaca uno de la Universidad de Baluchistán en donde se vinculó la luteolina y la quercetina en la inhibición de la actividad catalítica de la topoisomerasa II mostrando una eficacia similar en el tratamiento de leishmaniasis cutánea. Este estudio sugiere que las similitudes de sus estructuras químicas se traducen a una actividad biológica y mecanismo de acción similar, así como su eficacia. Además, la luteolina y la quercetina han sido estudiadas simultáneamente para el tratamiento de otras áreas de investigación como el cáncer y el alzheimer mostrando una acción similar en cada diana molecular (43).

Otra sustancia prometedora descrita en el año 2016 es la 5-metoxi, 6,7- metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) la cual pertenece a la misma familia de flavonoides que la quercetina y la luteolina. Sin embargo, pese a compartir un esqueleto común de flavona presenta diferencias a nivel estructural. Por su parte 5-metoxi, 6,7- metilendioxi-flavona tiene un grupo metoxi y un grupo metilendioxi los cuales hacen que esta sustancia difiera de la quercetina y la luteolina las cuales poseen un patrón de hidroxilación en sus

anillos diferente. Este compuesto, en el mismo estudio fue aislado de *Iresina diffusa* (una variedad de Valeriana) con el fin de determinar su actividad leishmanicida sobre *L. mexicana*. Se encontró que el mecanismo por el cual el compuesto detuvo el crecimiento del parásito fue la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , ya que hay una liberación de Ca^{2+} desde la mitocondria y los acidocalcisomas lo que provoca su aumento y así ejerce un efecto inhibitorio. Este efecto inhibitorio es dosis-dependiente lo que implica que mientras aumenta la dosis de la sustancia aumenta la inhibición del crecimiento de *Leishmania mexicana* (44)

Docking Molecular

El acoplamiento molecular, en la traducción al español, es un método que permite el cálculo y la predicción y el cálculo de la posición más conveniente entre la interacción de un ligando y un blanco (generalmente proteico) en base a un modelo tridimensional. Se describió por primera vez en la década de los ochenta (año 1982) por Kuntz et. al. dando origen a una de las herramientas de mayor utilidad en la búsqueda y selección virtual a partir de la estructura de ligandos con actividad biológica y blancos terapéuticos prometedores (45).

Los principios activos de los medicamentos cumplen la función de ligandos que se unen a un blanco en específico lo que produce una actividad biológica al inhibir o activar dicho blanco. El amplio grupo denominado ligandos está conformado por distintas moléculas que incluyen hormonas, neurotransmisores, fármacos o compuestos naturales aislados de plantas en el caso de los alcaloides. Por otra parte, los blancos terapéuticos son moléculas grandes como ácidos nucleicos o proteínas

Por medio del acoplamiento molecular computacional se permite la observación de todas las posibles posiciones en las que una molécula puede unirse a la proteína blanco, a lo anterior se le conoce como algoritmo de muestreo. Un segundo algoritmo, el

algoritmo con una función de puntuación, calcula una puntuación de energía para cada una de estas posiciones puesto que entre menor sea la energía mayor es la estabilidad entre las dos moléculas. Todas estas posiciones son ordenadas de mayor a menor estabilidad, siendo estas últimas las de mayor proyección. Realizar un acoplamiento molecular previo permite identificar las moléculas que podrían unirse a proteínas implicadas en diferentes enfermedades como la leishmaniasis sin gastar en costosos experimentos en el laboratorio. Sin embargo, las proteínas no son estáticas entonces pueden existir casos en donde el acoplamiento molecular de resultados falsos indicando que dos moléculas encajan bien cuando en realidad no es así. Se recalca que, cada blanco proteico es distinto y la capacidad para replicar los resultados experimentales depende en gran medida de los programas y criterios que se tengan en cuenta.

Un estudio realizado en el año 2019 describe diferentes aspectos a tener en cuenta antes de realizar un estudio de acoplamiento molecular. En un primer momento se describe el estado de protonación, la correcta asignación de los átomos de hidrógeno en los residuos de aminoácidos es crucial para la precisión del acoplamiento. Un estado de protonación incorrecto puede resultar en la exclusión de ligandos bioactivos o en la inclusión de falsos positivos. Continuando, se describen las moléculas de agua en el sitio activo, estas moléculas pueden influir significativamente en la unión entre el ligando y el receptor, mediante enlaces de hidrógeno y afectando la entropía y entalpía del sistema. La inclusión adecuada de moléculas de agua en los estudios de acoplamiento es fundamental para mejorar la precisión de las predicciones. También, se enfatiza la importancia de validar los programas de acoplamiento molecular para asegurar que puedan distinguir entre ligandos activos y compuestos que no se unen al blanco. La flexibilidad de las proteínas es un factor crítico que a menudo se pasa por alto. Se discuten enfoques como el acoplamiento flexible del receptor y el acoplamiento

conjunto, que permiten considerar múltiples conformaciones de la proteína durante el acoplamiento. Se propone un enfoque que combina múltiples algoritmos de puntuación para afinar la precisión en la identificación de la configuración correcta de unión entre el ligando y el blanco.

En conclusión, el acoplamiento molecular, a pesar de sus limitaciones, ha resultado ser un elemento valioso en el descubrimiento de nuevos fármacos. El artículo concluye que el éxito del acoplamiento molecular depende mayormente de la calidad de los datos disponibles, la correcta caracterización del sitio de unión, y la consideración de factores como el estado de protonación y la flexibilidad de las proteínas.

Energía de Afinidad

Este parámetro, expresado en kilocalorías por mol (kcal/mol), representa la energía estimada que se libera cuando un ligando se une a una proteína; es decir, es una medida de la fuerza de unión entre ambos. De ese modo, los valores más negativos indican interacciones mucho más favorables y estables (46).

Existe un parámetro en el campo de la termodinámica denominado energía libre de Gibbs (ΔG) el cual resulta importante a la hora de entender la afinidad que existe entre un ligando y una proteína blanco. En herramientas computacionales usadas a la hora de analizar las interacciones entre un medicamento y su diana molecular como Autodock Vina se estima dicha energía rápidamente. Sin embargo, la predicción de esta energía no es exacta en su totalidad ya que no se considera ni la presencia del agua ni lo flexible que resulte ser una proteína. Aun así, este software y los resultados arrojados por este (como la binding affinity) siguen siendo claves a la hora de evaluar la interacción de un ligando y una proteína diana (47).

Root Mean Square Deviation (RMSD)

El *Root Mean Square Deviation* o RMSD, por sus siglas en inglés, es una medida (en

angstroms) utilizada para calcular el promedio de la distancia entre los átomos de la estructura principal de dos o más moléculas sobrepuestas. En 2014 en un estudio publicado por la revista "Journal Of Physical Chemistry" se expone que el RMSD además de usarse a la hora de confrontar estructuras estáticas también resulta útil si se emplea como una coordenada de reacción para analizar la manera en que las estructuras cambian a lo largo de una simulación además de identificar grupos de conformaciones similares. Es importante reconocer que, al tratarse de moléculas que no son enteramente rígidas naturalmente los átomos pueden moverse lo que hace que aún en una estructura estable el valor del RMSD se posicione en números diferentes a 0. En este sentido, un RMSD cercano o igual a 0 indica que se seleccionó el mejor *docking* por defecto al compararlo con una estructura experimental. Sin embargo, es importante tener cuidado de no interpretar cualquier variación de esta medida de forma incorrecta ya que este también puede mostrar cambios pequeños (48,49).

Fuerzas de Van der Waals

Las fuerzas de Van der Waals también constituyen un criterio clave. Estas son interacciones débiles y no covalentes que ocurren entre átomos o moléculas muy cercanos entre sí. Aunque de forma individual son débiles, en este contexto poseen gran relevancia, ya que al acumularse contribuyen a mantener estabilidad en unión del ligando y la proteína durante más tiempo, lo que a su vez incrementa la afinidad. Por otro lado, dichas interacciones favorecen la inserción del ligando en cavidades hidrofóbicas o apolares de la proteína, las cuales resultan fundamentales en la inhibición de su funcionamiento. Además, las fuerzas de Van der Waals indican que existe una acomodación óptima en una zona conservada de la macromolécula diana, lo que permite una correlación con un buen perfil multi-especie (50).

Puentes de Hidrógeno

Los puentes de hidrógeno son interacciones específicas, aunque débiles de forma individual, que se generan cuando un átomo de hidrógeno es compartido entre dos átomos electronegativos (como oxígeno o nitrógeno). En la técnica de acoplamiento molecular, los puentes de hidrógeno resultan fundamentales, ya que contribuyen significativamente a la estabilidad de la unión entre el ligando y la proteína. Por ejemplo, si un ligando forma tres puentes de hidrógeno con una enzima, esto representa una buena posición en su sitio activo, y por lo tanto, una alta afinidad (51)

Metodología

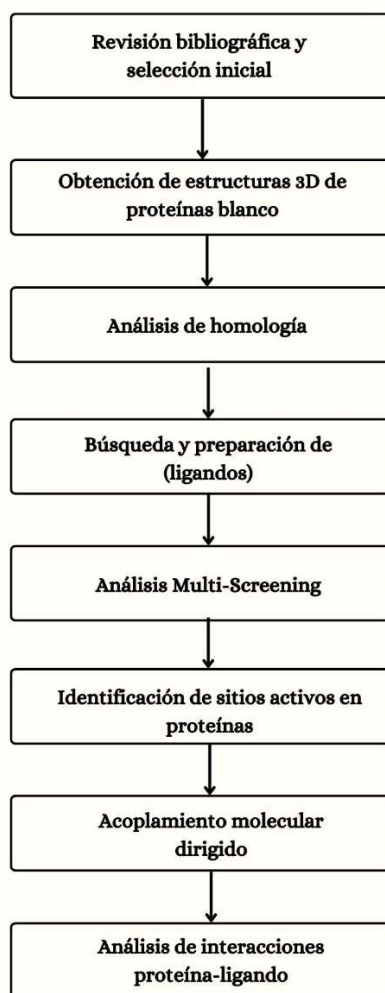


Figura 2. Flujograma en donde se describe paso a paso la metodología seguida en el presente trabajo.

Búsqueda de proteínas blanco de *Leishmania* y moléculas orgánicas como

candidatos terapéuticos

Las proteínas y las moléculas orgánicas seleccionadas en este estudio se identificaron a través de una revisión literaria en donde se utilizó la ecuación de búsqueda (*"Leishmania" OR "leishmaniasis"*) AND (*"protein target" OR "drug target"*) AND (*"in silico" OR "molecular docking"*) la cual fue aplicada a tres bases de datos principales: ScienceDirect, National Library of Medicine y Scielo la cual permitió recuperar artículos en donde se evaluarón proteínas basales de *Leishmania* como posibles blancos terapéuticos para el diseño y evaluación de nuevos fármacos. Dentro de los criterios de inclusión de las macromoléculas (proteínas de *Leishmania*) se definió que fueran proteínas basales asociadas a procesos básicos vitales dentro del parásito. Por su parte, para los ligandos (moléculas orgánicas) se definió que estos fueran moléculas orgánicas que actúan como compuestos activos de plantas que previamente hayan sido usadas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Búsqueda de estructuras tridimensionales de las proteínas de *Leishmania*

Una vez se identificaron las proteínas blanco de *Leishmania* se obtuvo la estructura tridimensional de estas realizando una búsqueda en la base de datos de proteínas – UniProt (<https://www.uniprot.org/>). La búsqueda se realizó utilizando la ecuación de búsqueda *"Nombre de la proteína" AND "Leishmania braziliensis; Leishmania panamensis; Leishmania guyanensis"* lo que permitió recuperar los registros de las macromoléculas por cada especie de *Leishmania* del subgénero Viannia teniendo en cuenta que estas son las especies de importancia en salud pública para Colombia y que pueden existir algunas diferencias entre las proteínas basales asociadas al proceso de especiación. Dentro del registro se identificó la sección *"Structure"* y en esta se ubicó el código de acceso a la base de datos de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q29537>) a partir de la cual se descargaron los archivos

de estructuras tridimensionales de las proteínas en formato *.pdb*.

Análisis de homología

Con el fin de evaluar la homología de las proteínas seleccionadas entre las tres especies de *Leishmania* definidas. Se realizó un análisis de homología con el software Geneious Prime usando la herramienta *MUSCLE* el cual permitió identificar las regiones variables y conservadas de las moléculas. Esto con el fin de evaluar si las moléculas orgánicas seleccionadas pueden tener actividad cruzada entre las especies actuando sobre las regiones conservadas de las proteínas de *Leishmania*.

Búsqueda de estructuras químicas de los principios activos

Para la obtención de las estructuras químicas de los compuestos orgánicos con potencial terapéutico para la leishmaniasis se utilizó la base de datos PubChem

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La búsqueda de estas moléculas se realizó a través del nombre del compuesto y por el código *smiles* de estos. Una vez identificadas las moléculas estas se descargaron en formato *.SDF*.

Preparación de los ligandos

La preparación de los ligandos para el acoplamiento molecular se realizó a través del software Avogadro (<https://avogadro.cc/>) el cual permite optimizar la geometría molecular de los compuestos. Primero, se importaron las estructuras de los ligandos en formato 2D, asegurando que todas las configuraciones estéricas fueran correctas. A continuación, se aplicó la minimización de energía utilizando el método de optimización de geometría MMFF94 debido a su precisión en la predicción de energías y su amplia aplicabilidad a compuestos orgánicos, lo que permitió reducir la energía potencial de los ligandos y alcanzar una conformación más estable. Este paso es crucial, debido a que una estructura optimizada mejora la precisión de las simulaciones del acoplamiento facilitando la interacción entre los ligandos y el sitio activo de la proteína objetivo.

Acoplamiento molecular – Multi screening

Se llevó a cabo un análisis de multi screening utilizando la herramienta PyRx (<https://pyrx.sourceforge.io/>), a partir del cual se evaluaron 5 proteínas basales de *Leishmania* con 12 compuestos orgánicos con potencial terapéutico obtenidos de diferentes vegetales y frutas enunciados en la tabla 3. Este enfoque permitió explorar de manera exhaustiva las posibles interacciones y afinidades entre los ligandos y sus respectivas dianas. A través de simulaciones de docking, se generaron diversas configuraciones que facilitaron la identificación de los compuestos más prometedores para cada proteína. La metodología empleada no solo optimizó el proceso de selección, sino que también proporcionó información valiosa sobre las características estructurales que influyen en la unión. Finalmente se seleccionaron los compuestos vegetales con mejores energías de afinidad y fueron usados para el análisis de acoplamiento molecular dirigido sobre las proteínas previamente descritas.

Acoplamiento molecular entre macromoléculas y ligandos con mejores energías de afinidad

Identificación de sitios activos de las proteínas basales de *Leishmania*

Se realizó un análisis en el software COCAH (<https://zhanggroup.org/COACH/>) para la identificación de sitios activos, con el objetivo de facilitar estudios de docking. En este proceso, se cargaron las estructuras tridimensionales de las proteínas de interés, permitiendo al software evaluar las características electrostáticas y geométricas de las superficies moleculares. A través de algoritmos avanzados, COCAH identificó posibles sitios de unión, destacando áreas con alta afinidad para la interacción con ligandos. Este análisis permitió identificar los aminoácidos involucrados en el sitio activo de las proteínas, lo cual permitió desarrollar el ensayo de docking dirigido con los compuestos vegetales previamente seleccionados con el análisis con PyRx.

Acoplamiento molecular dirigido

Con el fin de evaluar la interacción entre los ligandos seleccionados por el análisis de Multiscreening y las 5 proteínas basales de *Leishmania*, se realizó un ensayo de acoplamiento molecular dirigido a través del software AutoDock Vina dentro del paquete de herramientas de MG Tools (<https://vina.scripps.edu/>). Este análisis se realizó con el fin de evaluar la interacción de los ligandos con el sitio activo de las macromoléculas lo que permitió identificar el potencial terapéutico de dichas moléculas.

Análisis de las interacciones entre macromoléculas y ligandos

Se llevó a cabo un análisis utilizando la herramienta LigPlot (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) para evaluar las interacciones entre las proteínas basales de *Leishmania* y los tres ligandos previamente seleccionados. Este estudio permitió visualizar de manera clara las interacciones clave, como enlaces de hidrógeno y contactos hidrofóbicos, facilitando la identificación de los sitios de unión más relevantes para cada proteína. A través de las representaciones gráficas generadas por LigPlot, se pudo observar cómo cada ligando se posicionaba en el sitio activo de las proteínas, lo que proporcionó información valiosa sobre la afinidad de unión y las características estructurales que influyen en estas interacciones. Este análisis no solo destacó las similitudes y diferencias en los patrones de unión entre los ligandos, sino que también ofreció perspectivas cruciales para el diseño racional de fármacos, optimizando futuras investigaciones en el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos.

Resultados

Búsqueda de proteínas blanco de *Leishmania* y moléculas orgánicas como candidatos terapéuticos

Tabla 1.

Nombre de la proteína	Código UniProt	Annotatio n Score	Código de Alphafold	Función de la proteína
Leishmanolysina <i>L. (V.) braziliensis</i>	A0A3T0N KZ2	3/5	AF-A0A3T0N KZ2-F1	Actúa como una enzima al facilitar reacciones químicas, evidenciado en su acción sobre sustratos polipeptídicos. Puede descomponer otras proteínas, lo cual es fundamental para la supervivencia del parásito, ya que le permite neutralizar componentes del sistema de complemento como el C3, y contribuye a la invasión y permanencia en los macrófagos al alterar su superficie. (45)
Leishmanolysina <i>L. (V.) guyanensis</i>	Q00689	4/5	AF-Q00689-F1	
Leishmanolysina <i>L. (V.) panamensis</i>	O46312	3/5	AF-O46312-F1	
Fumarato reductasa <i>L. (V.) braziliensis</i>	A4HME1	1/5	AF-A4HME1-F1	En <i>Leishmania</i> , el equilibrio redox glicosomal es mantenido por la malato deshidrogenasa y el fumarato reductasa dependiente de NADH. Esta última convierte fumarato en succinato, regenerando NAD ⁺ y permitiendo la continuidad del metabolismo energético anaeróbico. El succinato generado alimenta rutas alternas para la producción de ATP en condiciones de bajo oxígeno. (36)
Fumarato reductasa <i>L. (V.) guyanensis</i>	A0A1E1J5 I6	1/5	AF-A0A1E1J5 I6-F1	
Fumarato reductasa <i>L. (V.) panamensis</i>	A0A088S0 L7	1/5	AF-A0A088S0 L7-F1	
Ribonucleótido reductasa <i>L. (V.) braziliensis</i>	A4HGD3	2/5	AF-A4HGD3-F1	Es esencial para que <i>Leishmania</i> sintetice ADN, al transformar ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos. Además, participa en el manejo del estrés oxidativo al depender del NADPH, clave para la función de la tripanotona reductasa. (57)
Ribonucleótido reductasa <i>L. (V.) guyanensis</i>	A0A1E1J0 11	2/5	AF-A0A1E1J0 11-F1	
Ribonucleótido reductasa <i>L. (V.) panamensis</i>	A0A088R UQ3	2/5	AF-A0A088R UQ3-F1	
Proteína fosfatasa <i>L. (V.) braziliensis</i>	A4HAI2	3/5	AF-A4HAI2-F1	Las fosfatasas de especificidad dual son enzimas que pueden desfosforilar residuos de

Proteína fosfatasa <i>L. (V.) guyanensis</i>	A0A1E1IU G3	3/5	AF-A0A1E1IU G3-F1	tirosina y serina/treonina en sus sustratos proteicos. Esto les permite regular la actividad de diversas quinasas, incluidas las MAP quinasas que desempeñan un papel crucial en la señalización celular. En <i>Leishmania</i>, se cree que estas participan en procesos como: Respuesta al estrés Diferenciación del parásito Interacción con el hospedador Resistencia a fármacos (37)
Proteína fosfatasa <i>L. (V.) panamensis</i>	A0A088R NP2	3/5	AF-A0A088R NP2-F1	
Topoisomerasa II <i>L. (V.) braziliensis</i>	A4HB62	3/5	AF-A4HB62-F1	Rompe temporalmente ambas hebras del ADN para permitir el paso de otra doble hélice, reduce la tensión durante la replicación y transcripción. Luego religa el ADN, lo que lo hace clave para desenredar ADN replicado y asegurar la correcta separación de cromosomas en la división celular. (46)
Topoisomerasa II <i>L. (V.) guyanensis</i>	A0A1E1IU Q5	3/5	AF-A0A1E1IU Q5-F1	
Topoisomerasa II <i>L. (V.) panamensis</i>	A0A088RP Q1	3/5	AF-A0A088RP Q1-F1	

Tabla 1. Lista de proteínas usadas con su información de origen en UniProt, AlphaFold, calificación de Sore y función correspondiente.

Tabla 2

Nombre del compuesto orgánica	Código de PubChem	Código Smiles	Planta de origen	Función
Luteolina	5280445	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>	Hojas de cebolla, las hojas de semambu, el chile ave, el té negro, los brotes de papaya y la guayaba (47)	El mecanismo de acción consiste en una activación del Nrf2, el cual luego influye en la expresión de genes relacionados con la defensa antioxidante y el metabolismo del hierro, como la heme oxigenasa-1 (HO-1). ribonucleótido reductasa en <i>Leishmania donovani</i> ya que la quercetina inhibe esta enzima, la cual es crucial para la síntesis de ADN en el parásito. Por otro lado, también se ha demostrado

Quercetina	5280343	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>	Hojas de cebolla mayormente (47), también puede ser extraído de <i>Moringa oleífera</i> (23)	actividad en la enzima topoisomerasa II ya que al ser inhibida se interrumpe la replicación y transcripción del ADN, lo que lleva a la promoción de la apoptosis en los parásitos (47,48)
Artemisina	68827	<chem>C[C@@H]1CC[C@H]2[C@H](C(=O)O[C@@H]3[C@@]24[C@H]1CC[C@](O3)(OO4)C)C</chem>	La <i>Artemisia absinthium</i> , comúnmente conocida como ajeno. (57)	Genera especies reactivas de oxígeno, dañando mitocondrias y alterando el metabolismo redox del parásito. Induce apoptosis y afecta la proliferación de formas intracelulares, inhibiendo su crecimiento y reduciendo la viabilidad del parásito (52).
5-Metoxi-6,7 metilendio xiflavona	189609	<chem>COC1=C2C(=CC3=C1OCO3)OC(=O)C=C2=C4C=CC=C4</chem>	<i>Iresine diffusa</i> (Una variedad de la valeriana). (49)	Altera la Homeostasis del Ca ²⁺ intracelular: Aumenta la concentración de Ca ²⁺ intracelular ([Ca ²⁺] _i) al liberar este catión desde compartimentos intracelulares. (49)
Ácido Rosmarínico	5281792	<chem>C1=CC(=C(C=C1C[C@H](C(=O)O)OC(=O)/C=C/C2=CC(=C(C(=C2)O)O)O)O</chem>	Romero Romero, menta, albahaca, tomillo y salvia. (58)	Inducción de estrés oxidativo, generando especies reactivas de oxígeno que dañan componentes celulares del parásito. Además, altera la membrana plasmática, afecta su permeabilidad y puede inhibir enzimas antioxidantes clave como la tripanotona reductasa. (53)
Apigenina	5280443	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>	<i>Moringa oleífera</i> (23)	Inhibe a las MMPs mediante la unión a su sitio activo que contiene un átomo de zinc esencial para la actividad enzimática, puede reducir la expresión de los genes que codifican para las MMPs, disminuyendo así la cantidad de enzima presente en el tejido. También puede interferir con los mecanismos que activan las MMPs, evitando que pasen de su forma inactiva (pro-MMP) a su

				forma activa. La apigenina puede estimular la producción de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). (23)
Ácido Ferulico	445858	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)/C=C/C(=O)O)O</chem>	Lignina, un componente estructural de las plantas, lo produce hongos de pudrición blanca, como los del género <i>Pycnoporus spp.</i> Naranjas, manzanas, tomates, remolacha, etc (54).	Genera estrés oxidativo y regula la respuesta inmune del hospedador (54).
Ácido Cafeico	689043	<chem>C1=CC(=C(C=C1/C=C/C(=O)O)O)O</chem>	<i>Annona coriacea</i> Mart (55).	Genera estrés oxidativo, alterando el metabolismo redox del parásito y modulando la respuesta inmune del hospedador (55).
Ácido Protocatéquico	72	<chem>C1=CC(=C(C=C1C(=O)O)O)O</chem>	Uvas, ciruela, te negro y verde, olivas, etc (56).	Genera estrés oxidativo, alterando el metabolismo energético (56).
Ascaridole	10545	<chem>CC(C)C12CCC(C=C1)(OO2)C</chem>	<i>Dysphania ambrosioides</i> también conocida como epazote o paico. (59)	El mecanismo de acción del ascaridol implica la ruptura de su enlace O-O en presencia de Fe ²⁺ , lo que genera radicales centrados en el carbono que desencadenan estrés oxidativo intracelular (57).
Geranilgeraniol	5281365	<chem>CC(=CCC/C(=C/CC/C(=C/CC/C(=C/CO)/C)/C)/C)C</chem>	Semillas de <i>Bixa orellana</i> . Zingiber officinale o también llamado	Interfiere la prenilación de proteínas y la integridad de membranas. (58).

			jengibre, cúrcuma y citronela. (60)	
Annonacin a	354398	CCCCCCCC CCCC[C@H]([C@H])1CC[C@@H](O1)[C@@H](CCCC[C@H](CCC[C@H](CC2=C[C@H](OC2=O)C)O)O)O)O	Annona muricata (61)	Induce disfunción mitocondrial, alteraciones en el potencial de membrana y apoptosis del parásito. (54)

Tabla 2. Lista de compuestos orgánicos usados como ligandos con su información de origen en PubChem, código Smiles e información de que planta se puede extraer y adicionalmente su forma de acción

Análisis de homología

Las imágenes 3-7 muestran los resultados de homología de las proteínas basales en las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*



Figura 3. Análisis de homología de la proteína fosfatasa de *Leishmania*

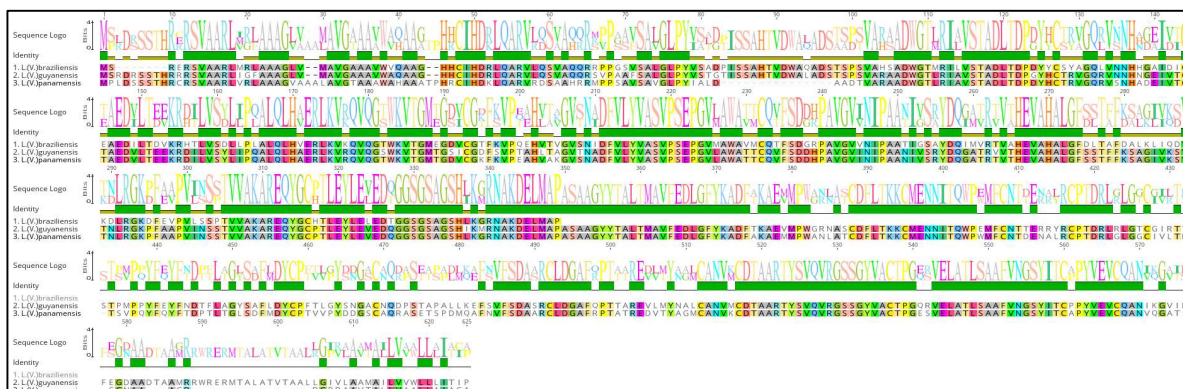


Figura 4. Análisis de homología de la proteína Leishmanolysin de *Leishmania*

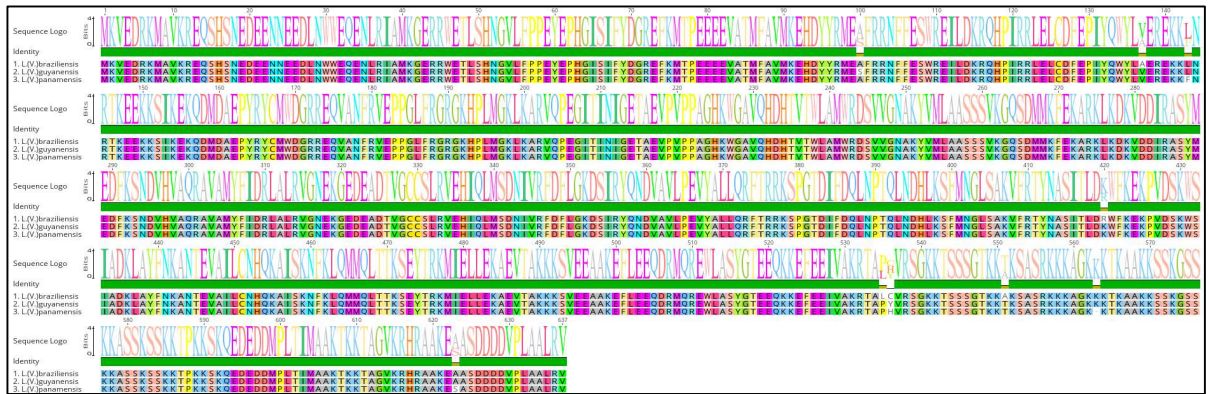


Figura 5. Análisis de homología de la proteína Topoisomerasa II de *Leishmania*

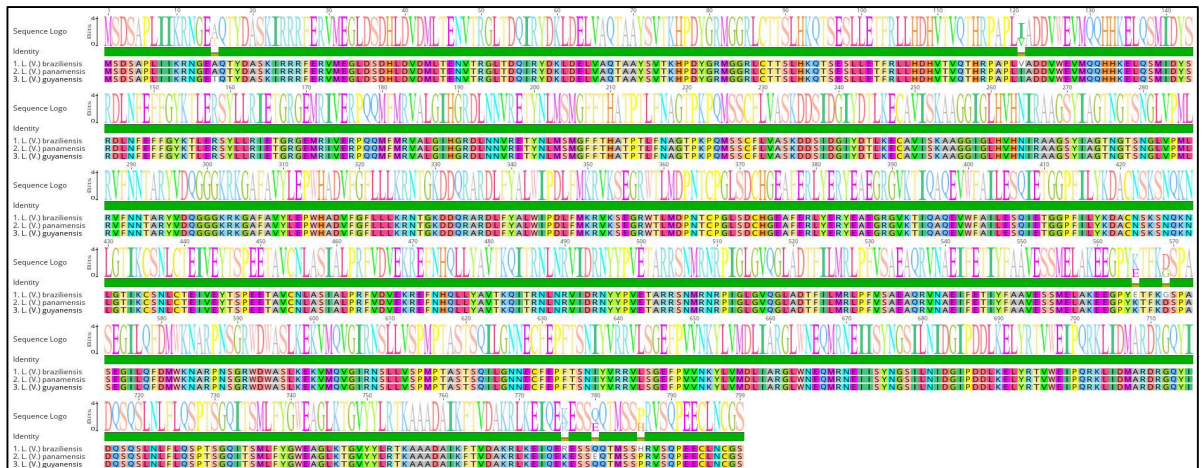


Figura 6. Análisis de homología de la proteína Ribonucleótido reductasa de *Leishmania*

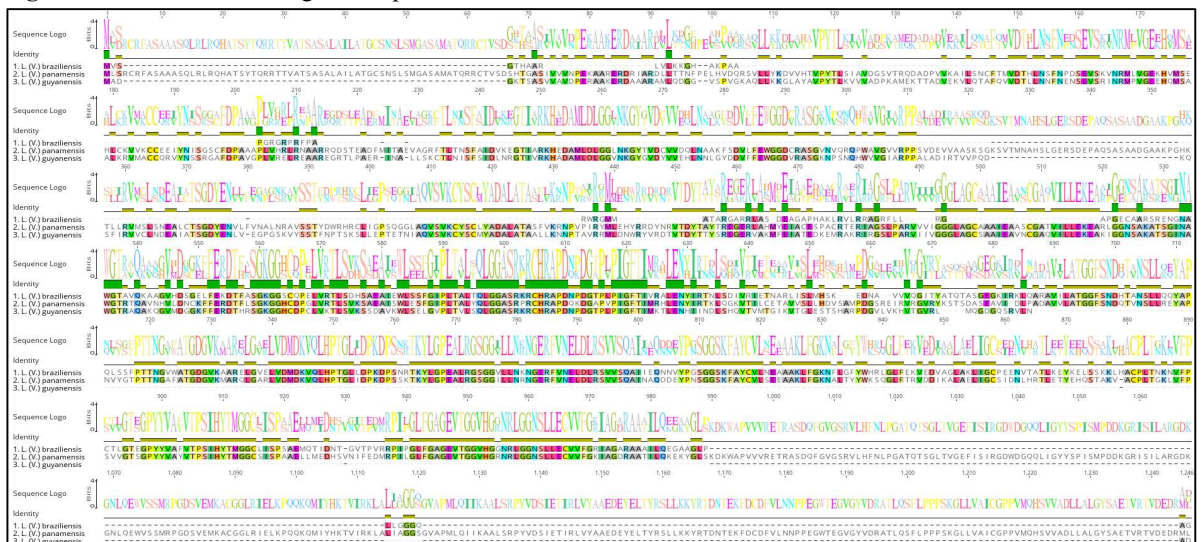


Figura 7. Análisis de homología de la proteína Fumarato reductasa de *Leishmania*

Acoplamiento molecular – Multi screening

Tabla 3

Ligandos Proteína	Luteolina	Quercetina	Artemisina	5-Metoxi	Ácido rosmarinico	Apigenina	Ácido ferulico	Ácido cafeico	Ácido protocatequico	Ascaridole	Geranigeraniol	Annonacin
Leishmanolysin L. (V) braziliensis	-7.8	-7.3	-7.1	-7.3	-6.5	-7.0	-6.1	-6.4	-5.2	-5.1	-5.6	-6.2
Leishmanolysin L. (V) guyanensis	-7.1	-7.8	-6.7	-8.4	-6.1	-7.4	-7.0	-5.7	-5.2	-5.6	-8.2	-4.5
Leishmanolysin L. (V) panamensis	-7.3	-7.7	-7.4	-7.1	-7.0	-7.2	-6.1	-5.8	-5.5	-5.8	-4.1	-5.0
Fumarato reductasa L. (V) braziliensis	-7.5	-7.5	-7.6	-7.9	-7.2	-7.3	-5.5	-6.8	-6.3	-5.7	-6.5	-5.8
Fumarato reductasa L. (V) guyanensis	-9.5	-8.8	-8.8	-9.1	-7.7	-9.3	-6.9	-7.0	-6.8	-6.5	-5.7	-6.7
Fumarato reductasa L. (V) panamensis	-8.9	-8.3	-7.4	-8.0	-9.0	-7.5	-5.8	-6.1	-5.4	-6.2	-5.6	-5.6
Ribonucleótido reductasa L. (V) braziliensis	-8.4	-8.6	-8.8	-7.7	-7.3	-7.8	-6.3	-6.4	-5.9	-5.7	-6.2	.7.0
Ribonucleótido reductasa L. (V) guyanensis	-8.1	-8.8	-8.6	-7.5	-7.5	-7.7	-6.4	-6.6	-5.9	-6.0	-5.2	-5.4
Ribonucleótido reductasa L. (V) panamensis	-8.8	-8.4	-8.7	-7.8	-7.7	-8.6	-6.0	-6.6	-5.8	-5.8	-6.1	-5.8
Proteína fosfatasa L. (V) braziliensis	-7.3	-7.4	-8.0	-7.5	-6.7	-7.1	-5.4	-5.5	-5.2	-5.2	-5.5	-6.6
Proteína fosfatasa L. (V) guyanensis	-8.0	-8.3	-7.4	-8.1	-8.4	-7.8	-5.6	-5.9	-5.9	-5.7	-6.5	-5.0
Proteína fosfatasa L. (V) panamensis	-7.8	-7.4	-7.4	-7.8	-6.9	-7.7	-5.8	-5.8	-5.6	-5.9	-5.8	-5.3
Topoisomerasa II L.(V) braziliensis	-9.3	-8.9	-8.3	-8.2	-8.1	-7.5	-6.8	-6.6	-6.6	-6.1	-5.6	-5.5

Topoisomerasa II L.(V) guyanensis	-8.9	-8.9	-8.0	-8.5	-9.3	-7.5	-6.7	-6.2	-5.8	-6.1	-5.2	-5.4
Topoisomerasa II L.(V) panamensis	-7.7	-7.8	-7.6	-8.4	-6.6	-8.8	-6.5	-6.0	-6.0	-6.3	-6.0	-5.7

Tabla 3. Resultado de acoplamiento molecular entre proteínas y ligandos seleccionados, subrayados los 3 casos en que se dio mejor afinidad.

Acoplamiento molecular entre macromoléculas y ligandos con mejores energías de afinidad

Tabla 4. Acoplamiento molecular dirigido

Blancos		Ligandos					
		5 methoxy		Luteolina		Quercetina	
		Energia de afinidad	RMSD	Energia de afinidad	RMSD	Energia de afinidad	RMSD
Protein phosphatase	<i>L.(V.) braziliensis</i>	-7,1	0	-8	0	-7,1	0
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	-8,2	0	-7,9	0	-8,1	0
	<i>L.(V.) panamensis</i>	-7	0	-8,1	0	-8,1	0
Topoisomerase	<i>L.(V.) braziliensis</i>	-8	0	-7,9	0	-8	0
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	-7,9	0	-8,1	0	-8,2	0
	<i>L.(V.) panamensis</i>	-8,2	0	-7,9	0	-7,9	0
Fumarato Reductasa	<i>L.(V.) braziliensis</i>	-8	0	-7,5	0	-7,4	0
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	-9,1	0	-9,4	0	-9,2	0
	<i>L.(V.) panamensis</i>	-8,4	0	-8,9	0	-8,1	0
Leishmanolysin	<i>L.(V.) braziliensis</i>	-7,8	0	-7,6	0	-8	0
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	-8,5	0	-8	0	-8	0
	<i>L.(V.) panamensis</i>	-7,5	0	-8,1	0	-7,5	0
Ribonucleotido Reductasa	<i>L.(V.) braziliensis</i>	-8,1	0	-8,9	0	-8,6	0
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	-8,7	0	-8,7	0	-8,8	0

<i>L. (V.) panamensis</i>	-8,3	0	-8,8	0	-8,4	0
---------------------------	------	---	------	---	------	---

Tabla 4. Resultados del docking con las proteínas modeladas en Swiss-Model para los casos prometedores.

Las figuras 8-10 muestran las interacciones entre las proteínas de *Leishmania* y los compuestos orgánicos previamente definidos. Los resultados que se muestran corresponden a la proteína Topoisomerasa II.

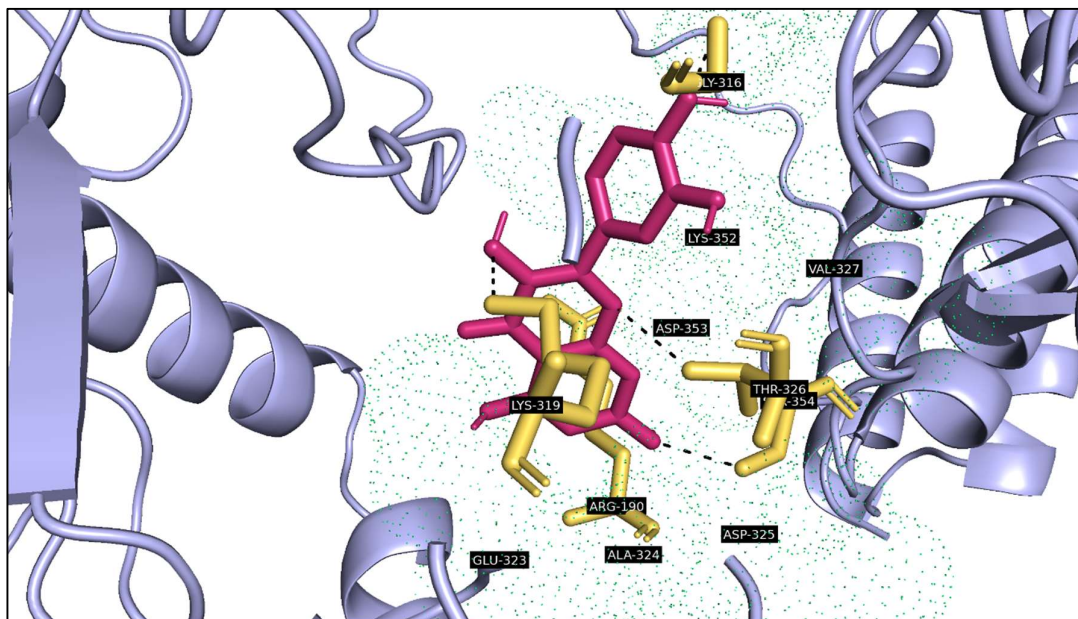


Figura 8. Acoplamiento molecular entre la Topoisomerasa II de *L. (V.) braziliensis* y el compuesto quercetina. Los aminoácidos en amarillo generan interacciones polares de tipo – puente de hidrógeno (línea negra punteada). Los aminoácidos representados con puntos verdes se acoplan por medio de interacciones hidrofóbicas de tipo van der Waals.

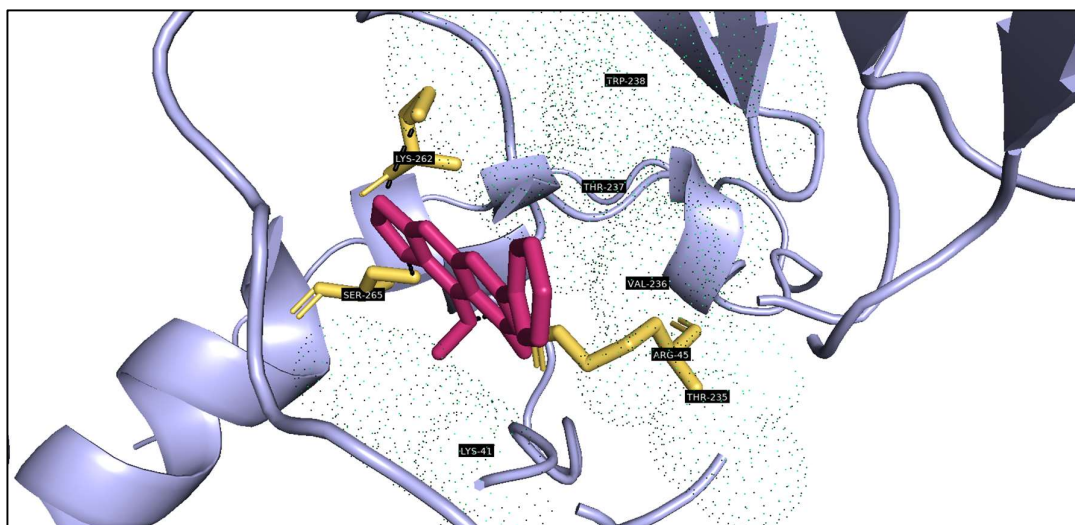


Figura 9. Acoplamiento molecular entre la Topoisomerasa II de *L. (V.) braziliensis* y el compuesto 5-

Methoxy. Los aminoácidos en amarillo generan interacciones polares de tipo – puente de hidrógeno (línea negra punteada). Los aminoácidos representados con puntos verdes se acoplan por medio de interacciones hidrofóbicas de tipo van der Waals.

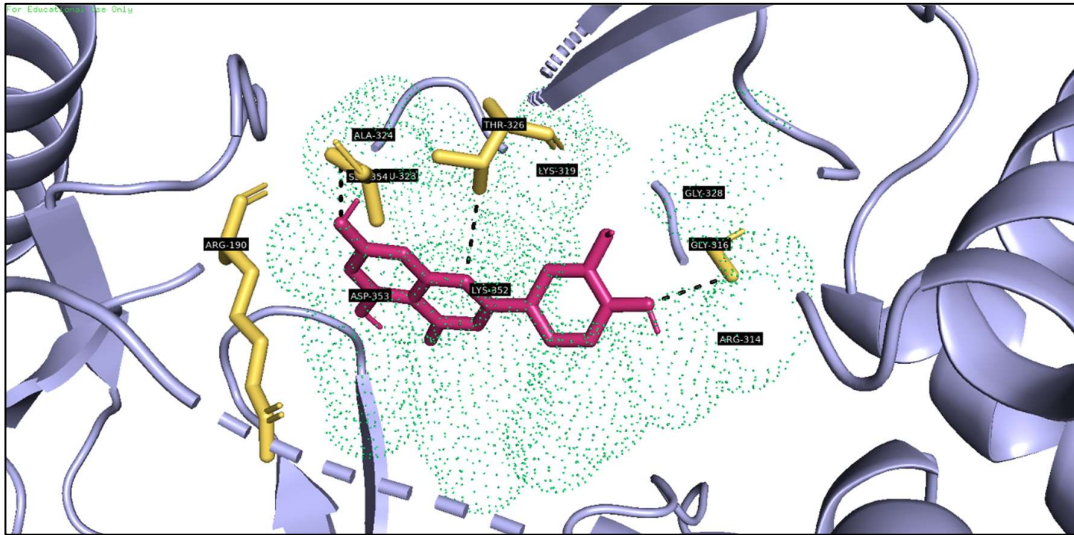


Figura 10. Acoplamiento molecular entre la Topoisomerasa II de *L. (V.) braziliensis* y el compuesto Luteolina. Los aminoácidos en amarillo generan interacciones polares de tipo – puente de hidrógeno (línea negra punteada). Los aminoácidos representados con puntos verdes se acoplan por medio de interacciones hidrofóbicas de tipo van der Waals.

Análisis de las interacciones entre macromoléculas y ligandos

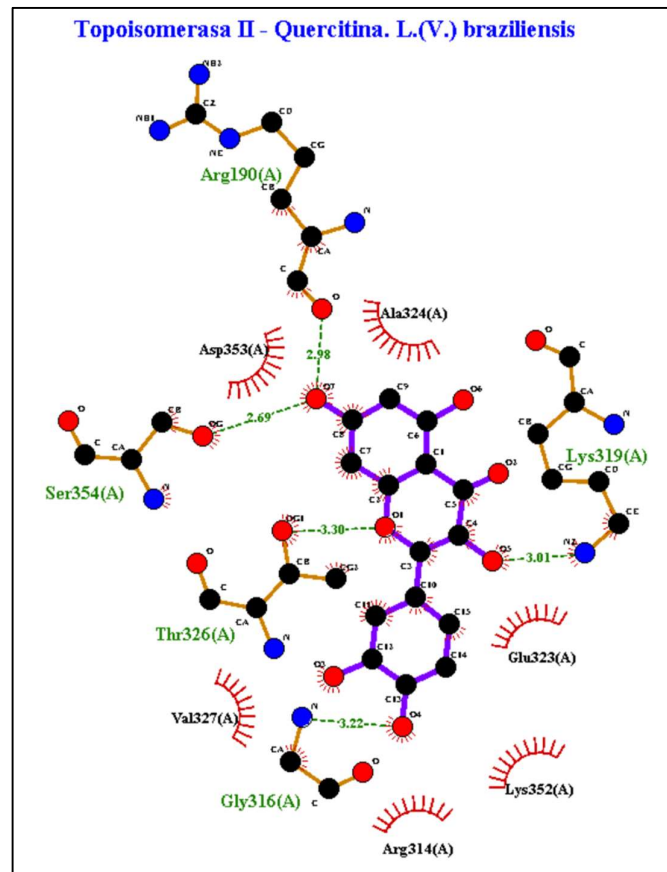


Figura 11. Análisis de interacciones – LigPlot entre el compuesto vegetal Quercetina de y la proteína *Topoisomerasa II* de *L. (V.) braziliensis*. Se describen la totalidad de interacciones, los arcos rojos demuestran interacciones hidrofóbicas entre los átomos del Lupeol y los aminoácidos de la proteína.

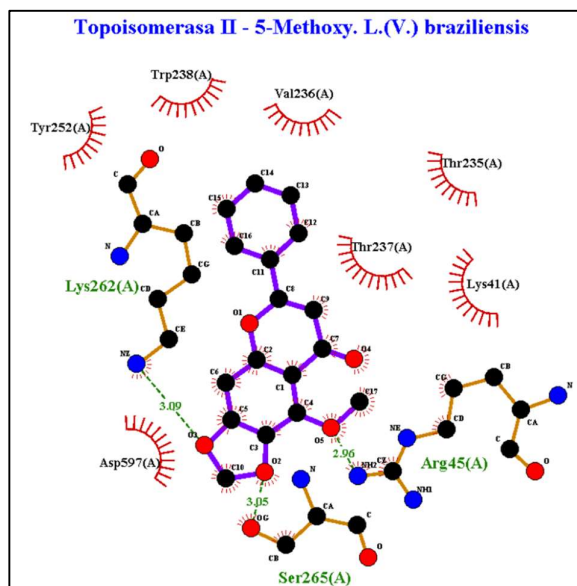


Figura 12. Análisis de interacciones – LigPlot entre el compuesto vegetal 5-Metoxi y la proteína *Topoisomerasa II* de *L. (V.) braziliensis*. Se describen la totalidad de interacciones, los arcos rojos demuestran interacciones hidrofóbicas entre los átomos del Lupeol y los aminoácidos de la proteína.

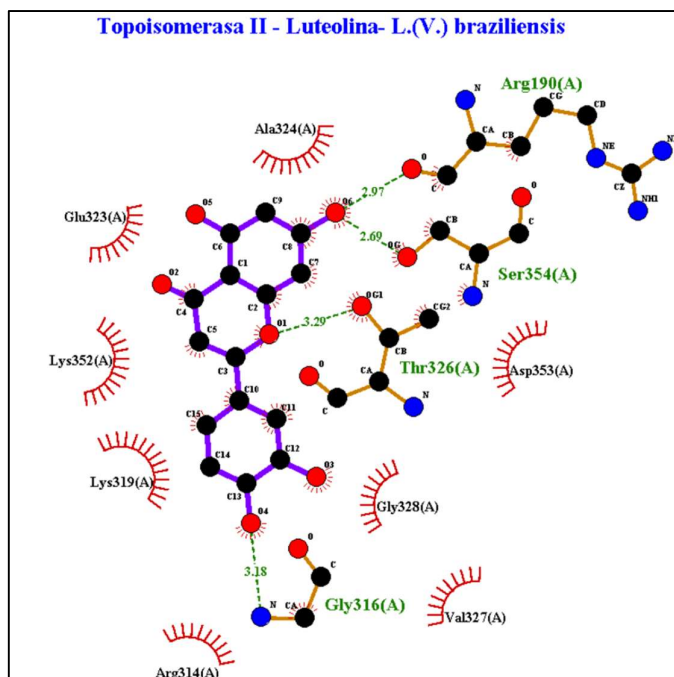


Figura 13. Análisis de interacciones – LigPlot entre el compuesto vegetal *Luteolina* y la proteína *Topoisomerasa II* de *L. (V.) braziliensis*. Se describen la totalidad de interacciones, los arcos rojos demuestran interacciones hidrofóbicas entre los átomos del Lupeol y los aminoácidos de la proteína.

En el caso específico de la quercetina acoplada al Ribonucleótido reductasa de *L. braziliensis*, se observaron ocho puentes de hidrógeno, una participación significativa de residuos altamente conservados en la región catalítica y cinco interacciones de Van der Waals, esto sugiere una alta afinidad y especificidad para la enzima, confirmando su potencial como inhibidor. De manera similar, la quercetina en *L.guyanensis* mostró también ocho puentes de hidrógeno y un perfil de residuos muy similar al observado en *L. braziliensis*, aunque con menor diversidad en los residuos involucrados en los enlaces de hidrógeno, lo que indica una buena interacción, pero ligeramente menos diversa. Por otro lado, la luteolina mostró un desempeño sólido al enfrentarse con *L. guyanensis* y *L. panamensis* con siete puentes de hidrógeno en ambos casos. En *L. guyanensis*, además, se identificaron seis interacciones de Van der Waals frente a cinco en *L. panamensis*, lo que le proporciona una ligera ventaja en estabilidad. Sin embargo, en comparación con la quercetina, ambas variantes de luteolina presentaron un número total menor de enlaces de hidrógeno, lo que indica que, si bien son opciones prometedoras, la quercetina se mantiene como la molécula con mayor afinidad e interacción específica en este estudio.

Discusión de Resultados

En el presente estudio se propuso analizar la interacción entre 12 sustancias de origen natural y cinco blancos clave en el desarrollo del parásito *Leishmania spp.*. Esta iniciativa surge con el objetivo de ofrecer nuevas alternativas frente a las dificultades a las que se ve sometido el sistema de salud en países en vías de desarrollo, donde la enfermedad es endémica. Los resultados obtenidos en el primer ensayo (multiscreen) permitieron reducir el número de ligandos a tres: luteolina, quercetina y 5-metoxi-6,7-

metilendioxi-flavona. Este primer filtro se basó en la energía de afinidad entre la macromolécula y el ligando, resultando estas tres sustancias como las más estables y con mayor potencial inhibitorio. Un segundo ensayo, pero con las macromoléculas mapeadas debido a su pobre calificación en la plataforma Uniprot dió resultados similares confirmando los primeros resultados obtenidos.

Ensayos posteriores incluyeron un docking más específico, realizado con el programa AutoDock Vina, mediante el cual se determinó que ciertas proteínas blanco presentaban interacciones particularmente estables con los tres ligandos seleccionados. En estos segundos estudios se evidenciaron afinidades al enfrentarse las tres sustancias con la macromolécula fumarato reductasa de *L. guyanensis* que superaban incluso -9.0 kJ/mol posicionando no solo a los tres ligandos como futuros fármacos prometedores sino también al blanco como clave en la inhibición del desarrollo del parásito.

No obstante, las interacciones no se evaluaron únicamente en función de la energía de afinidad, ya que se buscaba un análisis más detallado del acoplamiento molecular. Así, mediante el programa LigPlot, se llevó a cabo un nuevo análisis enfocado en tres parámetros clave: RMSD, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Se encontró que todos los valores de RMSD fueron iguales a cero, lo cual respalda la elección automática de los mejores dockings por parte del software. Sin embargo, para obtener un análisis más preciso, se recomienda complementar este estudio con análisis de clustering, los cuales no fue posible implementar en esta etapa (48).

Las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno resultaron ser dos tipos de interacción determinantes para evaluar la estabilidad y especificidad de los complejos formados. La quercetina demostró una notable capacidad de interacción con diversos blancos del parásito, inclinando su interacción con regiones estructuralmente conservadas. Lo anterior se evidenció en la repetición de residuos como Gln622,

Asn626, Val649 y Phe633, comunes entre múltiples proteínas blanco. Estas interacciones no solo reflejan una alta especificidad y estabilidad (principalmente a través de puentes de hidrógeno), sino también una adaptación espacial efectiva del ligando al sitio activo, atribuida a las fuerzas de Van der Waals. Así, la quercetina podría interferir con funciones esenciales como el metabolismo energético (fumarato reductasa), la replicación del ADN (topoisomerasa II) y la síntesis de nucleótidos (ribonucleótido reductasa), posicionándose como un inhibidor multitarget prometedor (59–61) El ligando 5-metoxi-flavona mostró un patrón de interacción más flexible, interactuando tanto con residuos cargados como con polares, entre ellos Glu75, Arg74, Asp133, además de residuos conservados como Gln622 y Asn626. La diversidad de residuos repetidos sugiere una versatilidad estructural que permite al ligando adaptarse a distintos blancos moleculares. Mientras que las fuerzas de Van der Waals fortalecen la unión en regiones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno aportan especificidad en la mayoría de los casos. Por lo tanto, este ligando podría afectar rutas celulares clave como la señalización intracelular (proteína fosfatasa), el ensamblaje del ADN (ribonucleótido reductasa) y los mecanismos de virulencia (leishmanolisina) (62,63) .

Por su parte, la luteolina replicó varios patrones observados con la quercetina, lo cual era predecible debido a la similitud de la estructura química de ambas moléculas, como se discutió previamente. Este ligando mostró afinidad por residuos conservados como Asn626, Gln622, Val649 y Asn651. La repetición de estos residuos refuerza la idea de que la luteolina tiene la capacidad de afectar funciones similares a las de la quercetina, incluyendo la replicación del ADN, el metabolismo energético y la regulación enzimática. Asimismo, su interacción con residuos estructurales como Ser448 y Ala449 sugiere una posible interferencia con la estabilidad conformacional de las enzimas blanco, lo que podría conducir a su mal funcionamiento o incluso a su inactivación. En

este contexto, el perfil de luteolina la posiciona como un inhibidor tanto multi-especie como multitarget (59–63).

Con base en los resultados obtenidos, se evidencia una capacidad significativa de interacción de los tres ligandos principales —quercetina, luteolina y 5-metoxi-flavona— con cinco macromoléculas clave en tres especies del subgénero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*). Dichas proteínas blanco están involucradas en procesos fundamentales del parásito como se observa en la tabla 7.

Los ligandos evaluados demostraron un potencial mecanismo de acción multitarget, respaldado por la repetida presencia de residuos conservados entre especies y proteínas blanco, y por la estabilidad observada en las interacciones por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La presencia constante de estos residuos sugiere que se localizan en sitios activos altamente conservados, esenciales para la función enzimática. Además, la conservación interespecie de estos residuos implica que mutaciones en estas posiciones podrían comprometer la viabilidad del parásito, disminuyendo así la probabilidad de desarrollo de resistencia (40).

Tabla 5. Residuos clave involucrados en interacciones proteína-ligando, su localización en proteínas diana y posibles funciones bloqueadas tras el acoplamiento molecular.

Residuo	Tipo de interacción	Presente en	Función potencial bloqueada
Gln622	H-bond, Van der Waals	Fumarato Red., Topoisomerasa II	Participación en sitio activo; metabolismo energético y replicación
Asn626	H-bond, Van der Waals	Fumarato Red., Topoisomerasa II	Reconocimiento de sustrato; inhibición de actividades enzimáticas
Gln622	H-bond, Van der Waals	Fumarato Red., Topoisomerasa II	Participación en sitio activo;

			metabolismo energético y replicación
Asn626	H-bond, Van der Waals	Fumarato Red., Topoisomerasa II	Reconocimiento de sustrato; inhibición de actividades enzimáticas
Gln622	H-bond, Van der Waals	Fumarato Red., Topoisomerasa II	Participación en sitio activo; metabolismo energético y replicación
Asn626	H-bond, Van der Waals	Fumarato Red., Topoisomerasa II	Reconocimiento de sustrato; inhibición de actividades enzimáticas
Ala449	Van der Waals	Leishmanolisina, Topo II	Estabilidad estructural del sitio activo
Lys269	H-bond	Fosfatasa dual	Modulación de cascadas de señalización
Ser448	H-bond	Leishmanolisina	Estabilización conformacional del dominio catalítico

Tabla 5. Resumen de los residuos involucrados en interacciones con los ligandos analizados, indicando el

tipo de interacción, las proteínas en las que están presentes y la función potencial que podría verse bloqueada tras el acoplamiento molecular. Se destacan interacciones de tipo puente de hidrógeno (H-bond) y fuerzas de Van der Waals, con ampliaciones funcionales relacionadas con procesos esenciales como el metabolismo energético, la replicación, el procesamiento de proteínas y la señalización celular.

Comparación con otros estudios computacionales

En el año 2014, Ogungbe y colaboradores realizaron un análisis de *docking* molecular con el fin de estimar el potencial de 352 polifenoles (presentes en plantas) contra 52 proteínas de *Leishmania*. Sin embargo, es importante resaltar que en dicho estudio se empleó un software (MOE) que utiliza como unidad de medida los kJ/mol, a diferencia del presente trabajo en el que se emplearon kcal/mol mediante AutoDock Vina. Por lo anterior, en este documento se realizó la conversión correspondiente con el fin de

comparar de manera óptima los resultados obtenidos en ambos estudios (64)

Al contrastar los datos de ambos análisis, se encontró que la energía mínima de afinidad del compuesto quercetina fue menor en el presente estudio (-8.6 kcal/mol), en comparación con la reportada por Ogungbe et al. (-127.6 kJ/mol $\approx$ -30.5 kcal/mol)). Si bien los valores en la energía de afinidad del estudio comparativo indican una interacción más fuerte entre la quercetina y su blanco molecular (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *L. mexicana*), los resultados de este trabajo muestran que la sustancia interactúa con tres blancos relevantes (las enzimas fumarato reductasa, ribonucleótido reductasa y topoisomerasa II), lo que le confiere un perfil *multitarget*. Este aspecto a su vez representa una ventaja, ya que sugiere un potencial farmacológico más amplio. Además, al afectar más de una ruta metabólica, se reduce la probabilidad de que el parásito desarrolle resistencia al tratamiento (64).

Continuando, en el presente trabajo se encontró que la sustancia 5-methoxy, 6,7-metilendioxi-flavona mostró una capacidad de unión estable, al arrojar energías de afinidad con valores entre -8.4 y -9.6 kcal/mol frente a los cinco blancos elegidos. Al comparar estos resultados con los obtenidos en un estudio realizado por la Universidad Central de Venezuela (2016), se evidenció que esta sustancia presentó un efecto citotóxico y dosis-dependiente sobre el parásito, con un valor de IC₅₀ de 12.62 μ M a las 48 horas de tratamiento. Además, se demostró que el compuesto afecta la homeostasis del calcio intracelular, altera el potencial electroquímico mitocondrial y alcaliniza los acidocalcisomas, impactando diversos procesos metabólicos clave en el parásito.

Al contrastar ambos estudios, se destaca que los acoplamientos realizados en este trabajo revelan un perfil multitarget, ya que la molécula interactúa con enzimas que cumplen funciones vitales en *Leishmania*, como la topoisomerasa II (implicada en la replicación), la fumarato reductasa (relacionada con el metabolismo energético) y la

ribonucleótido reductasa (asociada a la síntesis de nucleótidos). En conjunto, ambos estudios demuestran la capacidad del compuesto para interferir en distintos procesos del metabolismo del parásito, lo que refuerza su potencial como un posible fármaco con una capacidad inhibitoria eficaz sobre múltiples estructuras celulares de *Leishmania*. Por último, un estudio titulado “Luteolin, an Abundant Dietary Component is a Potent Anti-leishmanial Agent that Acts by Inducing Topoisomerase II-mediated Kinetoplast DNA Cleavage Leading to Apoptosis” demostró la actividad inhibitoria de la luteolina sobre los promastigotes y amastigotes de *L. donovani*. El estudio in vitro arrojó que la concentración inhibitoria media (IC_{50}) era de 12.5 μM , lo que mostró que este componente induce la escisión del ADN del cinetoplasto del parásito al inhibir la topoisomerasa II, lo que provoca la apoptosis de *Leishmania donovani* sin afectar las células T humanas. Por otro lado, los resultados del acoplamiento molecular realizados en el presente trabajo demostraron una afinidad fuerte entre la luteolina y la enzima topoisomerasa II (implicada en procesos de replicación y transcripción del parásito), al evidenciarse rangos de afinidad entre -8.4 y -8.9 kcal/mol. Ambos estudios coinciden en la afinidad de la sustancia con la enzima, sin afectar células humanas, lo que a su vez refuerza el valor predictivo del docking molecular (65).

Conclusiones

Al finalizar este trabajo, se concluye que fue posible identificar proteínas clave en el desarrollo del protozoo *Leishmania*, específicamente en las tres especies más relevantes del subgénero *Viannia*. Esto permitió enfocar el análisis en dianas moleculares con importancia clínica.

Asimismo, gracias a la búsqueda realizada en tres bases de datos científicas reconocidas, se seleccionaron sustancias de origen vegetal con actividad reportada contra blancos relevantes del parásito. A partir de esto, se llevaron a cabo análisis de

acoplamiento molecular mediante herramientas computacionales, los cuales evidenciaron que tres de los doce compuestos inicialmente seleccionados presentaron interacciones fuertes con más de una proteína blanco, lo que sugiere un posible efecto inhibidor con un perfil multitarget.

Entre ellos, la quercetina destacó por su interacción con el ribonucleótido reductasa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, evidenciando el mayor número y calidad de interacciones moleculares, así como su unión con residuos funcionales críticos de la enzima. Además, luteolina unida la misma proteína diana mostró un desempeño sólido al enfrentarse con *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Dado el papel esencial de esta proteína en la supervivencia del parásito, este hallazgo posiciona a la quercetina como el compuesto más prometedor del estudio.

En conjunto, los resultados refuerzan el potencial terapéutico de los flavonoides como inhibidores selectivos de blancos esenciales en *Leishmania*, y sugieren que la quercetina podría servir como molécula líder para futuras investigaciones preclínicas.

Referencias Bibliográficas

1. Ching Chacón A, Villalobos Romero B, Jiménez Vargas MF. Leishmaniasis: evaluación clínica y diagnóstico. *Revista Medica Sinergia*. 2022 Apr 1;7(4):e781.
2. Silveira Maia-Elkhoury AN, Sanchez-Vazquez ²Manuel Jose. Situación epidemiológica Leishmaniasis cutánea y mucosa [Internet]. 2022 Dec [cited 2025 Jan 10]. Available from:
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56833/OPASCDEV220021_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Mayorga Mogollon LE. Protocolo de vigilancia en salud pública de Leishmaniasis. Bogotá; 2024 May.
4. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. 2024 Jun.
5. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: the Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct;38(10):3768–73.
6. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017 Oct;57:1–29.
7. Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Mar;98(3):148–51.
8. Lizarazo F, Echeverri J, Mendigaña F, Ayala M, Cortés L, Gómez J. Lineamientos de atención clínica integral para Leishmaniasis en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. 2023;9–23.

9. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan;19(1):111–26.
10. Romero GAS, de Farias Guerra M V., Paes MG, Macedo V d. O. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) guyanensis in Brazil: Clinical Findings and Diagnostic Approach. Clinical Infectious Diseases. 2001 May 1;32(9):1304–12.
11. Nieves MP, Díaz E, Romero A, Machuca C. Prognostic value of physiological changes associated with the chemo-resistance in Leishmania [Internet]. Available from: http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=1165&rv=39
12. J.M. Ramos y M. Segovia. Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis. Revista Española de Quimioterapia. 1997 Mar;10.
13. Alejandro A, León F. INVESTIGADOR.
14. Puerta RSM, Muñoz JA. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por Leishmania (V.) panamensis en Colombia. Vol. 26, Biomédica. 2006.
15. Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. Vol. 104, Applied Microbiology and Biotechnology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. p. 8965–77.
16. Edoardo Torres-Guerrero 1 Roberto Arenas2. Leishmaniasis. Alternativas terapéuticas actuales. 2018;
17. Almeida FS, Sousa GLS, Rocha JC, Ribeiro FF, de Oliveira MR, de Lima Grisi TCS, et al. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against Leishmania infantum. Bioorg Med Chem Lett. 2021 Oct;49:128289.

18. Fernández S, Gayozo E. In silico molecular docking of *Moringa oleifera* Lam. compounds with the catalytic and FAD-NADPH-binding site of trypanothione reductase from *Leishmania infantum*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*(Colombia). 2023;52(3):1421–45.
19. Dennise Daniela Rivera Zaruma. Caracterización de principios activos del aceite de *Peperomia inaequalifolia*: evaluación antimicrobiana contra *Leishmania* spp. y citotoxicidad mediante herramientas computacionales e inteligencia artificial. 2024 Aug 4 [cited 2025 Jan 14]; Available from: <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/5322/1/Rivera%20Zaruma%20Dennisse%20Daniela.pdf>
20. Gayozo, Rojas. Análisis estructural de interacciones in silico de fitoconstituyentes de *Solanum americanum*, *Solanum guaraniticum* y *Solanum lycopersicum* con la proteína tripanotiona reductasa de *Leishmania infantum*. *Steviana*. 2020;12(2).
21. David I, Cevallos AB. “ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO E IN SILICO DE ACEITES ESENCIALES DE *MYRCIANTHES HALLII*, *SCHIMUS MOLLE* & *ORIGARUM MAJORANA*, CONTRA *LEISHMANIA* SPP.” 2022.
22. Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. Vol. 30, *General Pharmacology*. 1998. p. 435–43.
23. Rosa M do SS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, Rodrigues I de A, Soares RMA, Souto-Padrón T, et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jun;47(6):1895–901.
24. Puerta RSM, Muñoz JA. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania* (V.) *panamensis* en Colombia. Vol. 26, *Biomédica*. 2006.

25. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016 Aug;227:98–114.
26. González Romero uleysi E, Cedeño Sánchez JA, Briones Morales VE, González Romero AA. Abordaje terapéutico actual de la leishmaniasis cutánea por *Leishmania Braziliensis*: Una Revisión Documental. *Polo del Conocimiento.* 2024 Jul 2;9(7):1156–68.
27. Rubiano LC, Miranda MC, Muvdi Arenas S, Montero LM, Rodríguez-Barraquer I, Garcerant D, et al. Noninferiority of Miltefosine Versus Meglumine Antimoniate for Cutaneous Leishmaniasis in Children. *J Infect Dis.* 2012 Feb 15;205(4):684–92.
28. Rivera-Toledo E, Jiménez-Delgadillo AU, Manzano-Gayosso P. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2020 Mar 25;63(2):7–17.
29. Edith Schlagenhau, Robert Etges, Peter Metcalf. The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure.* 2002 Mar 14;1–3.
30. Dinc R. New developments in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med.* 2022 May;15(5):196–205.
31. Peña Díaz Carmen Priscila. CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE TRANSPORTADORES EN TRIPANOSOMÁTIDOS: CLONACIÓN DE POR LO MENOS UN GEN CODIFICANTE PARA PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE NAD⁺. *J Clin Microbiol.* 2008;
32. Soulat D, Bogdan C. Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2017 Dec 22;8.
33. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia*

- evansi, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990 Sep;84(5):676–7.
34. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999 Sep 15;112(18):2993–3002.
 35. Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health.* 2010 Mar 5;7(3):814–26.
 36. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermosifiliogr.* 2021 Jul;112(7):601–18.
 37. Pradhan S, Schwartz RA, Patil A, Grabbe S, Goldust M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2022 Mar 20;47(3):516–21.
 38. MENDIGAÑA PAEZ FA. PLAN ESTRATEGICO LEISHMANIASIS 2018 – 2022. Bogotá; 2018.
 39. Carmen Déa Ribeiro de Paula, João Herman Duarte Sampaio, Danielle Rizzo Cardoso, Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/ dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 40.
- Schlagenhauf E, Etges R, Metcalf P. The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure.* 1998 Aug;6(8):1035–46.
41. Dinc R. New developments in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med.* 2022 May;15(5):196–205.
 42. Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J Agric Food Chem.* 2001 Jun 1;49(6):3106–12.

43. WANG H, WANG H, CHENG H, CHE Z. Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model. *Mol Med Rep*. 2016 May;13(5):4215–20.
44. Vercesi AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. Presence of a Na^+/H^+ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett*. 2000 May 12;473(2):203–6.
45. Ewing TJA, Makino S, Skillman AG, Kuntz ID. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J Comput Aided Mol Des*. 2001;15(5):411–28.
46. Escalante-Tovar S. La Afinidad Electrónica, la peor de todas. *Educación Química*. 2019 Oct 11;30(4):108.
47. Pantsar T, Poso A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules*. 2018 Jul 30;23(8):1899.
48. Wiley John. Root Mean Square Deviation. In: *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. Wiley; 2014.
49. Pitera JW. Expected Distributions of Root-Mean-Square Positional Deviations in Proteins. *J Phys Chem B*. 2014 Jun 19;118(24):6526–30.
50. Winterton RHS. Van der Waals forces. *Contemp Phys*. 1970 Nov;11(6):559–74.
51. Caldera Villalobos M, Herrera González AM. Polímeros adhesivos y formación de uniones a través de reacciones de polimerización y fuerzas intermoleculares. *Educación Química*. 2019 Apr 9;30(2):2.
52. Boudou F, Belakredar A, Berkane A, Keziz A, Alsaeedi H, Cornu D, et al. Phytochemical profiling and in silico evaluation of *Artemisia absinthium* compounds targeting *Leishmania* N-myristoyltransferase: molecular docking, drug-likeness, and toxicity analyses. *Front Chem*. 2024 Nov 28;12.

53. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod*. 2007 Mar 1;70(3):461–77.
54. Julio Amilcar Pineda-Insusti¹, William Edison Gómez-Andrade, Astrid Stefanía Duarte-Trujillo, Claudia Patricia Soto-Arroyave, Camilo Alejandro Pineda-Soto, Fernando Javier Fierro-Ramos, et al. Producción de *Pycnoporus* spp. y sus metabolitos secundarios: Una revisión. *ICDIDCA*. 2017;
55. Sousa SR de, Lopes ÂC de A, Gomes RLF, Vasconcelos LFL, Araújo ASF de, Castro AAJF, et al. ASPECTOS BOTÂNICOS, FITOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS DO ARATICUM (*ANNONA CORIACEA* MART.): UMA REVISÃO. *Brazilian Journal of Development*. 2020;6(11):84781–8.
56. Wilson Cardona Galeano, Sara M. Robledo Restrepo, Benjamín Alberto Rojano, Fernando Alzate Guarín, Diana Lorena Muñoz Herrera, Jairo Saez Vega. Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (*Piperaceae*). *Scielo*. 2013;
57. Fidalgo LM. Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* as a Promising Antileishmanial Agent. *Nat Prod Commun*. 2007 Dec 1;2(12).
58. Lopes MV, Desoti VC, Caleare A de O, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV. Mitochondria Superoxide Anion Production Contributes to Geranylgeraniol-Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:1–9.
59. Das A. Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):1844–51.
60. Chen M, Zhai L, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. *Antimicrob*

Agents Chemother. 2001 Jul;45(7):2023–9.

61. Eklund H, Uhlin U, Färnegårdh M, Logan DT, Nordlund P. Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol*. 2001 Nov;77(3):177–268.

62. Schlagenhauf E, Etges R, Metcalf P. The crystal structure of the Leishmania major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*. 1998 Aug;6(8):1035–46.

63. Papadaki A, Tziouvara O, Kotopouli A, Koumarianou P, Doukas A, Rios P, et al. The Leishmania donovani LDBPK_220120.1 Gene Encodes for an Atypical Dual Specificity Lipid-Like Phosphatase Expressed in Promastigotes and Amastigotes; Substrate Specificity, Intracellular Localizations, and Putative Role(s). *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 25;11.

64. Ogungbe IV, Erwin WR, Setzer WN. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. *J Mol Graph Model*. 2014 Mar;48:105–17.

65. Mitra B, Saha A, Roy Chowdhury A, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, et al. Luteolin, an Abundant Dietary Component is a Potent Anti-leishmanial Agent that Acts by Inducing Topoisomerase II-mediated Kinetoplast DNA Cleavage Leading to Apoptosis. *Molecular Medicine*. 2000 Jun 1;6(6):527–41.

66. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012 May 31;7(5):e35671.

67. Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu Rev Entomol*. 2013 Jan 7;58(1):227–50.

68. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*.

2011 Jun 1;7(2):146–57.

69. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Dec 14;11(12):e0006052.

70. Luo Y, Muesing MA. Prospective Strategies for Targeting HIV-1 Integrase Function. *Future Med Chem*. 2010 Jul 12;2(7):1055–60.

ANEXOS

Glosario

- **Leishmaniasis:** enfermedad infecciosa transmitida por vectores y causada por los parásitos del género *Leishmania* (66).
- **Promastigote:** es la forma del parásito que vive dentro del vector biológico. Posee un flagelo que le permite moverse. Esta es la forma que se transmite al humano cuando el vector (hembra) se alimenta de sangre. (66)
- **Amastigote:** es la forma intracelular del parásito, durante el ciclo de vida del parásito se ubica dentro de los macrófagos. Esta forma tiene forma ovalada y no posee flagelo.
- **Flebótomo:** insecto el cual comprendido en el orden Diptera, cuya familia es Psychodidae y subfamilia Phlebotominae. Las hembras actúan como vectores de la enfermedad leishmaniasis.
- **Tripanotona reductasa:** enzima clave en la defensa del parásito contra el estrés oxidativo. Muchas investigaciones la estudian como blanco para nuevos tratamientos (67)
- **Acoplamiento molecular (docking):** técnica computacional que simula cómo se une una molécula (como un medicamento) a una proteína del parásito. Ayuda a predecir qué tan efectivo puede ser un tratamiento (68)
- **Ligando:** Nombre que se le da, en el campo de la biología computacional, a la molécula que se une a una proteína en los estudios de docking. Puede ser un medicamento, un compuesto vegetal, entre otras sustancias (68).
- **Binding pocket (sitio de unión):** es una zona determinada de una proteína o ácidos nucleicos en donde se une otra molécula a través de un enlace químico (68).

- **Antimoniales pentavalentes:** medicamentos de primera línea para el tratamiento de leishmaniasis. Pese a su efectividad generan alta toxicidad en el paciente (69).
- **Lipinski's Rule of Five:** Conjunto de reglas que ayudan a saber si una molécula podría funcionar bien como medicamento por vía oral. Si cumple las reglas, es buena candidata (68).
- **Fuerzas de Van der Waals:** Interacciones muy débiles pero importantes entre átomos que ayudan a que las moléculas se mantengan unidas.
- **Puentes de hidrógeno:** Son enlaces entre moléculas que, aunque no son muy fuertes por sí solos, ayudan mucho a que un ligando se quede pegado a una proteína (68).
- **AlphaFold:** Herramienta de inteligencia artificial que predice cómo se ven las proteínas en 3D. Es como una "radiografía virtual" de la proteína (68)
- **AutoDock Vina:** Programa de computadora que permite hacer los estudios de acoplamiento molecular. Es muy usado porque es gratuito y confiable (68)
- **RMSD (Root Mean Square Deviation):** Indicador que dice qué tan bien encaja una molécula en la proteína en los estudios de docking. Mientras más bajo, mejor ajuste (68)
- **Apoptosis:** Es un tipo de muerte celular programada. Algunos tratamientos buscan provocar este proceso en el parásito para eliminarlo sin dañar células humanas (70).
- **Acidocalcisoma:** Compartimento dentro del parásito que regula calcio y otras sustancias. También es un blanco interesante para investigar nuevas terapias (70)