



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Proteasas: enzimas claves en la fase esquizogónica del ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*

Proteases: key enzymes in the schizogonic phase of Plasmodium falciparum life cycle

Laritza Rojas, Aymara Cabrera-Muñoz, Maday Alonso-del-Rivero*

Centro de Estudio de Proteínas,
Facultad de Biología, Universidad
de La Habana, Cuba

* Autor para correspondencia:
maday@fbio.uh.cu

RESUMEN

Las proteasas son enzimas claves en la fase esquizogónica del ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* debido a que participan en procesos fisiológicos esenciales. El rol que juegan estas enzimas en la degradación de la hemoglobina, la invasión/egresión de los eritrocitos y el procesamiento proteolítico general ha conducido a que sean reconocidas como dianas terapéuticas y se intensifique la búsqueda de sus inhibidores. Varios autores han descrito inhibidores de proteasas con actividad antimalárica *in vitro* pero las propiedades farmacocinéticas y/o la falta de especificidad de estas moléculas no han permitido hasta el momento el desarrollo de antimaláricos basados en estos principios activos. Este hecho justifica la realización de nuevos esfuerzos en el aislamiento/diseño y obtención de nuevas moléculas que pudieran tener potencialidades en la terapéutica.

Palabras clave: malaria, inhibidores de proteasas, antimaláricos, blancos terapéuticos

ABSTRACT

Proteases are key enzymes in the schizogonic phase of the *Plasmodium falciparum* life cycle because they participate in essential physiological processes. The role played by these enzymes in the degradation of hemoglobin, the invasion / egression of erythrocytes and the general proteolytic processing has led to their recognition as therapeutic targets and intensification of the search for their inhibitors. Several authors have described inhibitors of proteases with antimalarial activity *in vitro* but the pharmacokinetic properties and / or the lack of specificity of these molecules have not yet allowed the development of antimalarials based on these active principles. This fact justifies the new efforts in the isolation / design and obtaining of new molecules that could have potentialities in the therapeutics.

Keywords: malaria, protease inhibitors, antimalarials, therapeutic targets

Recibido: 2019-07-15

Aceptado: 2019-09-23

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por la hembra del mosquito *Anopheles* spp. (Hafalla et al., 2011). Existen más de 200 especies del género *Plasmodium* pero solo cinco de ellas provocan la malaria en humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium knowlesi* (Lee et al., 2010). Entre ellos, *P. falciparum* es el responsable de la mayor morbilidad y mortalidad (Miller et al., 2013).

El ciclo de vida de *Plasmodium* spp. es complejo (Fig. 2) y transcurre en dos hospederos, el mosquito (fase esporogónica) y el hombre (fase esquizogónica) (Miller et al., 2002). La fase más estudiada es la esquizogónica, con énfasis en el ciclo eritrocítico dado que la ocurrencia del mismo provoca los síntomas típicos de la enfermedad (fiebres periódicas, temblores y

dolor de cabeza), específicamente con la ruptura de la célula infectada y la liberación de los merozoítos. Durante el ciclo eritrocítico el parásito se desarrolla a través de cuatro etapas: merozoíto, anillo, trofozoíto y esquizonte (Miller et al., 2002).

DESARROLLO

Las proteasas son enzimas que regulan procesos biológicos básicos en muchos organismos por lo que no es sorprendente que muchos microorganismos que presentan un ciclo de vida complejo como *Plasmodium* spp., también dependan de la acción de estas enzimas. De acuerdo a la naturaleza del aminoácido esencial para la catálisis se clasifican en: serino, metalo, cisteíno, aspártico, treonino, asparagino, glutámico, mixtas de mecanismo desconocido (Rawlings et al., 2016).

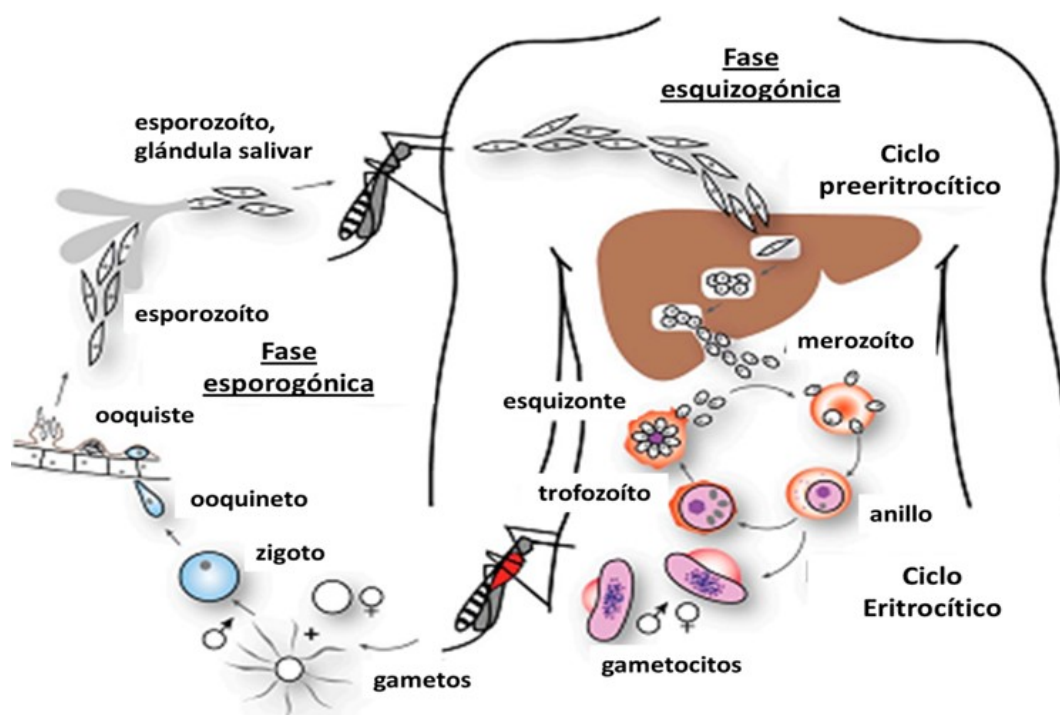


Figura 1: Esquema del ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* (Adaptado de (Cowman et al., 2012).

Figure 1: *Plasmodium falciparum* life cycle. (Adapted from Cowman et al., 2012)

En el genoma de *Plasmodium* spp. se han identificado 92 genes que codifican para proteasas de diferentes clases mecánicas (Fig. 2) (Wu *et al.*, 2003). Décadas de investigación de la biología del parásito han permitido definir el rol que desempeñan las proteasas en procesos fisiológicos imprescindibles como la degradación de hemoglobina, la invasión y la egressión de los eritrocitos (Li *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la variedad de funciones descritas para las proteasas durante la fase esquizogónica del ciclo de vida de *Plasmodium* spp. en este trabajo se discutirá el rol que juegan estas enzimas en procesos fisiológicos esenciales y sus potencialidades como dianas terapéuticas para la búsqueda de nuevos antimaláricos. Durante el análisis se tomará como

ejemplo la especie *P. falciparum*, una de las más estudiadas debido a que causa una mayor morbilidad y mortalidad (Miller *et al.*, 2013).

Degradación de hemoglobina

La degradación de hemoglobina es un evento proteolítico que ocurre en los estadios eritrocíticos de *Plasmodium* y en el que participan de manera secuencial proteasas de tipo aspártico, cisteínico y metálico. La hemoglobina del citosol del eritrocito es transportada hacia la vacuola digestiva del parásito (Milani *et al.*, 2015) donde es procesada hasta aminoácidos libres (Fig. 3). En este proceso participan proteasas como las plasmepsinas, las falcipainas, la falcilisina y las metalo aminopeptidasas.

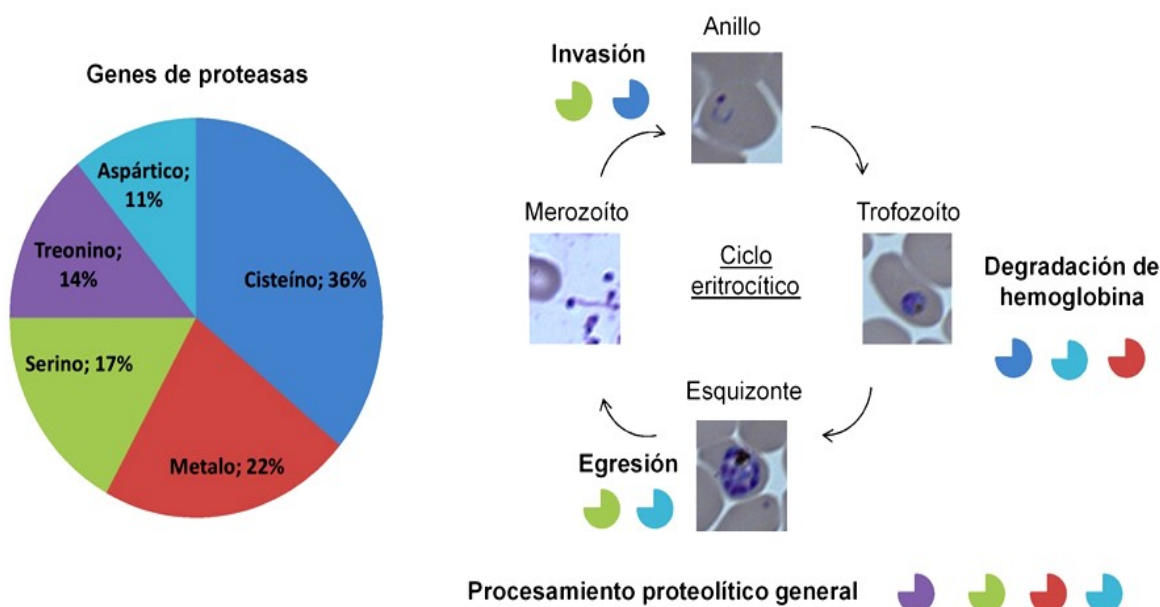


Figura 2: Distribución de los genes que codifican para proteasas en *Plasmodium* spp. según la clase mecánica (Wu *et al.*, 2003) y las funciones descritas. Figura adaptada de Li *et al.* (2012) con imágenes de microscopía óptica de campo claro de frotis de cultivos de *P. falciparum* en diferentes estadios del ciclo eritrocítico teñidos con tinción Giemsa.

Figure 2: Distribution of protease-codifying genes of *Plasmodium* spp. based on its mechanistic class (Wu *et al.*, 2003) and described functions. Figure adapted from Li *et al.* (2012) with Giemsa staining light microscopy images of *P. falciparum* parasites at different blood stages.

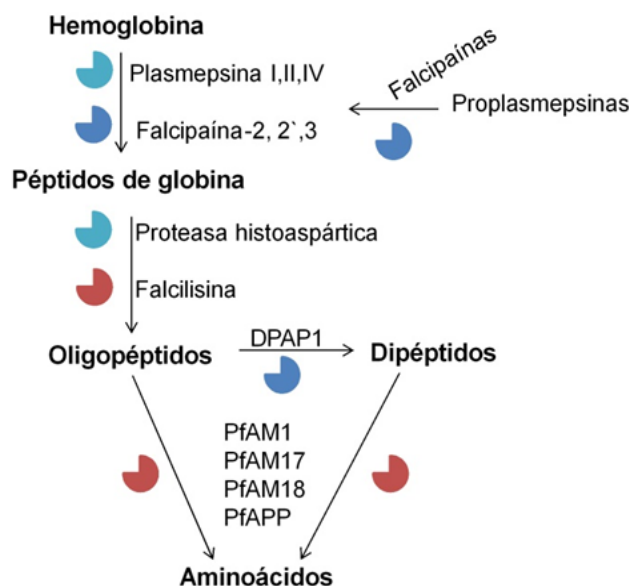


Figura 3: Cascada de degradación de la hemoglobina en *Plasmodium falciparum*. DPAP1 (dipeptidil-aminopeptidasa 1), PfAM1 (aminopeptidasa de *P. falciparum*, perteneciente a la familia M1), PfAM17 (aminopeptidasa de *P. falciparum*, perteneciente a la familia M17), PfAM18 (aminopeptidasa de *P. falciparum*, perteneciente a la familia M18) y PfAPP (aminopeptidasa P de *P. falciparum*). Adaptado de Dalal y Klembe (2007).

Figure 3: Plasmodium falciparum hemoglobin degradation cascade. DPAP1 (dipeptidyl aminopeptidase 1), PfAM1 (*P. falciparum* M1 aminopeptidase), PfAM17 (*P. falciparum* M17 aminopeptidase), PfAM18 (*P. falciparum* M18 aminopeptidase) and PfAPP (*P. falciparum* P aminopeptidase). Adapted from Dalal and Klembe (2007).

La familia de las plasmepsinas (proteasas aspártico de la familia A1) es de gran interés para la búsqueda de antiparasitarios debido a que son proteasas específicas de *Plasmodium* (Coombs *et al.*, 2001). Esta familia presenta cuatro miembros principales, las plasmepsinas I, II, IV y la proteasa histaspártica (Banerjee *et al.*, 2002). Estas enzimas presentan especificidad por fenilalanina, leucina y norleucina en la posición P1 (Beyer *et al.*, 2005) debido a que sus bolsillos S1 y S1' son altamente hidrofóbicos (Valiente *et al.*, 2008). La plasmepsina I y la II participan en las primeras etapas de la degradación de la hemoglobina, mientras que el resto participa en la degradación de los péptidos más pequeños (Banerjee *et al.*, 2002). Existen evidencias de que las plasmepsinas tienen función redundante por lo que son menos atractivas

como blancos terapéuticos (Liu *et al.*, 2006). No obstante las plasmepsinas son proteasas importantes ya que parásitos *knock-out* de tres/cuatro plasmepsinas presentan defectos en su crecimiento (Bonilla *et al.*, 2007).

Por otra parte, las falcipainas (familia C1A) son las cisteíno proteasas mejor caracterizadas en *P. falciparum*. Estas enzimas participan en la degradación de hemoglobina y se denominan falcipaina 1 (FP-1), falcipaina 2 (FP-2 y FP-2'), y falcipaina 3 (FP-3) (Sijwali *et al.*, 2001; Sijwali *et al.*, 2004). Entre ellas, las más importantes para la degradación de la hemoglobina son la FP-2 y la FP-3, que se encuentran localizadas en la vacuola digestiva. La FP-2 es sintetizada durante todo la etapa de trofozoíto mientras que la FP-3 aparece en la etapa de trofozoíto tardío/esquizonte joven y ambas están presentes por al menos 6h después de su síntesis (Dahl y Rosenthal, 2005). La FP-2 prefiere residuos hidrofóbicos y voluminosos (leucina y fenilalanina) en la posición P2 (clasificación de Schechter y Berger, 1967) (Shenai *et al.*, 2000; Surbramanian *et al.*, 2009) y su actividad se ve favorecida con sustratos que presentan además, un residuo de arginina en la posición P1 (Surbramanian *et al.*, 2009). Por su parte, la FP-2' y la FP-3 presentan especificidad similar a la FP-2 (Singh *et al.*, 2006; Cotrin *et al.*, 2013). A pesar de que siempre se pensó que las falcipainas ejercían su acción después de las plasmepsinas I y II, algunas evidencias sugieren que estas proteasas también participan en la activación de las plasmepsinas de la vacuola (Drew *et al.*, 2008). Además las falcipainas pueden sustituir a las plasmepsinas en su función de iniciar la cascada de degradación de la hemoglobina (Liu *et al.*, 2006).

Otra proteasa involucrada en la degradación de hemoglobina es la metaloproteasa falcilisina que degrada los fragmentos producidos por las falcipainas dando lugar a péptidos de 5-10 aminoácidos (Murata y Goldberg, 2003) que posteriormente son degradados por la dipeptidil aminopeptidasa 1 (DPAP1) (Singh *et al.*, 2007). La falcilisina es una metaloproteasa de la familia M16, que presenta zinc en su centro activo con especificidad por Ser en la posición P1 y en la posición P2 His o Met/Asn dependiendo del pH al que actúe, ácido o neutro respectivamente (Murata y Goldberg, 2003a). No se ha logrado la eliminación del gen de esta enzima lo que sugiere su esencialidad para el desarrollo del ciclo de vida de *P. falciparum* (Ponpuak *et al.*, 2007).

Por su parte, la didpeptidil aminopeptidasa 1 es una exopeptidasa de tipo cisteíno (DPAP1) que se encuentra en la vacuola digestiva del parásito (Klemba *et al.*, 2004). DPAP1 degrada los oligopéptidos derivados de la hemoglobina dando lugar a dipéptidos, esta proteasa es activa a pH ácido y tiene una especificidad de sustrato similar a su homóloga de mamíferos la cathepsina C, que prefiere Pro en la posición P2 y en la posición P1 aminoácidos ramificados (Arg, Lys y Met) (Wang *et al.*, 2011). Estudios con inhibidores de esta enzima mostraron que el ciclo de vida del parásito se detiene en la etapa de trofozoíto con una disminución de la parasitemia (Deu *et al.*, 2010). Los dipéptidos producto de la acción de DPAP1 son posteriormente degradados por aminopeptidasas que generan aminoácidos libres (Dalal y Klemba, 2007). Entre las proteasas que actúan en el último paso se encuentran la aminopeptidasa de la familia M1 (PfAM1) y la aminopeptidasa P (PfAPP) (Dalal y Klemba, 2007; Stack *et al.*, 2007). La PfAM1 es una aminopeptidasa esencial ya que el silenciamiento del gen que codifica para esta enzima es letal para el parásito (Dalal y Klemba, 2007). Por otra parte, algunos autores plantean que la enzima se localiza en el citosol del parásito (Allary *et al.*, 2002) y otros que se encuentra en el lumen de la vacuola digestiva (Ragheb *et al.*, 2011). Esta enzima tiene actividad aminopeptidasa estricta, específica para sustratos con aminoácidos hidrofóbicos o básicos en la posición P1 (Allary *et al.*, 2002).

Por otra parte la aminopeptidasa P presenta especificidad restringida a sustratos que presentan Pro en P1' y se encuentra en la vacuola digestiva y en el citosol, por lo que se postula que participa en la degradación de hemoglobina pero también en la degradación de péptidos resultantes de la actividad del proteosoma (Dalal y Klemba, 2007).

Invasión de los eritrocitos

La invasión de los eritrocitos comienza aún antes de la egresión de los merozoítos de su célula hospedera (hepatocito o eritrocito), con el proceso de activación de proteínas para una nueva ronda de infección. En este momento se libera de los exonemas (gránulos densos presentes en los nuevos merozoítos dentro del esquizonte) hacia el lumen de la vacuola parasitófora, la proteasa serino de tipo subtilisina PfSUB1 (Yeoh *et al.*, 2007). PfSUB1 actúa tanto en la egresión como en la invasión, presenta un alto grado de especificidad (Sajid *et al.*, 2000) y se expresa en los etapas

tardías de la esquizogénesis del parásito (Blackman *et al.*, 1998). Asimismo se demostró que esta enzima contribuye a la maduración de proteínas de superficie del merozoíto (MSP1/6/7), esenciales para la invasión productiva (Koussis *et al.*, 2009). Además se han identificado otras proteínas importantes para el egreso y la invasión del parásito que pudieran ser procesadas por esta subtilasa (De Monerri *et al.*, 2011).

Una vez que el merozoíto es liberado del eritrocito infectado se encuentra expuesto a los bajos niveles de potasio de la sangre, lo que provoca la liberación de calcio (posiblemente del retículo endoplasmático) y activa la secreción de adhesinas e invasinas de los micronemas hacia la superficie del parásito (Singh *et al.*, 2010). Una proteasa muy importante en esta etapa es la PfSUB2, localizada en los micronemas desde donde es secretada y translocada a la parte posterior de la superficie del merozoíto durante la invasión (Harris *et al.*, 2005; Child *et al.*, 2013). Durante la translocación, la PfSUB2 corta los ectodominios de adhesinas como la proteína de superficie del merozoíto (MSP1), el antígeno 1 de membrana apical (AMA1) y la proteína apical del merozoíto relacionada a la trombospodina (PTRAMP). Se cree que este procesamiento contribuye a desacoplar los complejos de adhesión liberando el parásito hacia la vacuola parasitófora (Harris *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2006).

Igualmente se ha descrito la participación de las proteasas romboides (PfROM) en la invasión. Estas enzimas de membrana identificadas en *P. falciparum* también procesan algunas adhesinas durante la invasión. PfROM1 y PfROM4 son capaces de cortar varios sustratos que poseen dominios transmembrana, y se sugiere que están involucradas en todas las etapas de invasión de *P. falciparum* (Baker *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2009).

En *P. falciparum* también se ha sugerido que la falcipaina 1 está implicada en la invasión del eritrocito aunque posteriormente se determinó que no es esencial para la invasión (Sijwali *et al.*, 2004).

Egresión de los eritrocitos

La actividad proteolítica es también indispensable para la egresión de los merozoítos de *P. falciparum* de la célula hospedera. En este sentido, se ha observado que algunas proteínas del citoesqueleto (ankyrina y espectrina) son degradadas por la FP-2 y la plasmepsina II, lo que provoca inestabilidad del eritrocito y por tanto la salida de los merozoítos (Hanspal *et al.*, 2002).

Asimismo se ha demostrado que la PfSUB1 procesa varias proteínas específicas de la vacuola parasitófora como son SERA4, 5 y 6 (De Monerri *et al.* 2011). Recientemente se demostró que esta enzima es activada por la plasmepsina X (PMX) y no por DPAP3 como se pensaba hasta hace poco tiempo (Ghosh *et al.*, 2018).

Los antígenos de serina repetida (SERA) presentan altos niveles de expresión en los estadios tardíos del ciclo eritrocítico en *Plasmodium* y se caracterizan por presentar un dominio de proteasa cisteína de tipo papaína. Dentro de la familia, solo SERA6-8 presentan el sitio activo canónico con el residuo de cisteína típico de las cisteína proteasas de la familia de la papaína. Mientras que SERA1-5 tienen un residuo de serina en lugar de una cisteína (Blackman, 2004). Esta familia de proteínas no se encuentra presente en otros parásitos del Phylum Apicomplexa.

SERA5 es la proteína más abundante de la familia y se encuentra en la vacuola parasitófora donde es procesada por PfSUB1 cerca del momento del egreso. Esta proteasa es una de las dos SERAs cuyos genes no han podido ser eliminados, lo que vislumbra su importancia para el ciclo de vida de *Plasmodium* (McCoubrie *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido definir si la enzima endógena es activa, no obstante esta enzima posee plegamiento semejante a una proteasa cisteína tipo papaína y un residuo de serina en el centro activo por lo que, pudiera participar en el procesamiento proteolítico durante el egreso y la invasión (Hodder *et al.*, 2009).

La única proteína de la familia de las SERAs a la que se ha asociado directamente con el egreso es SERA8. En *P. berghei*, la eliminación del gen del ortólogo de SERA8 produce inhibición del egreso de los esporozoítos del ooquiste (Aly y Matuschewski, 2005). Por tanto, las proteínas SERAs pudieran mediar el egreso tanto en las etapas schizogónicas como esporogónicas del ciclo de vida de *P. falciparum*.

Además de la acción de las proteasas de *Plasmodium* durante la egresión, se ha descrito la participación de la calpaína 1 del eritrocito en este proceso (Chandramohanadas *et al.*, 2009). Estos autores proponen que la calpaína-1 es activada por el calcio intracelular y participa en la degradación de proteínas del citoesqueleto. Esta teoría está fundamentada por el hecho de que el calcio del parásito que se almacena en la vacuola digestiva (Rohrbach *et al.*, 2005) puede ser detectado en el lumen de la vacuola parasitófora previo a la ruptura de su membrana y el proceso de egresión (Chandramohanadas *et al.*, 2009).

Los datos acerca de la egresión de los merozoítos dan lugar a un modelo (Fig. 4) en el que la liberación de proteasas, como PfSUB1, de los exonemas hacia el lumen de la vacuola parasitófora es inducida por la señal de egresión (aún desconocida) (Fig. 4 A y B). Posteriormente la vacuola parasitófora comienza a hincharse por la entrada de agua proveniente del citosol del eritrocito y se rompe mediante un mecanismo aún desconocido (Fig. 4 C y D) (Wirth y Pradel, 2012).

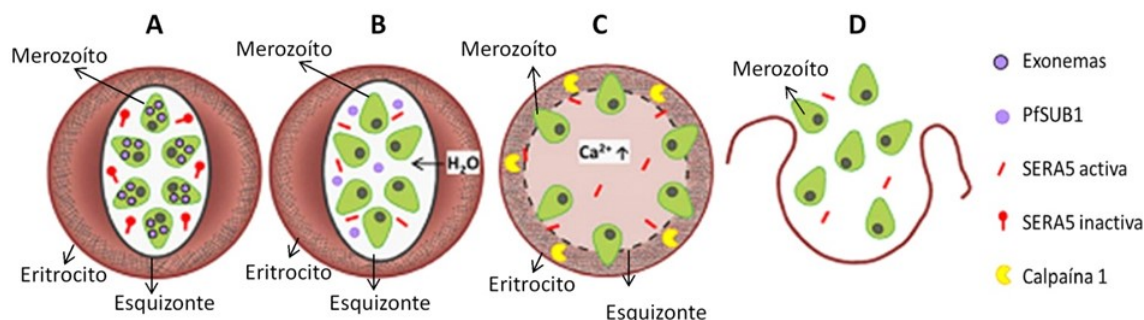


Figura 4. Mecanismo de egresión de los nuevos merozoítos del eritrocito infectado, con la participación de las proteasas y la regulación por el calcio intracelular. Adaptado de Wirth y Pradel (2012).

Figure 4. Egression mechanism of the new merozoites from the infected red blood cell, with the involvement of proteases and intracellular calcium regulation. Adapted from Wirth and Pradel (2012).

Momentos antes de la egresión comienza el debilitamiento del citoesqueleto. Seguidamente ocurre la ruptura de la membrana del eritrocito, mientras, el resto del citoesqueleto es desmantelado, mediante la acción de la calpaína 1 del eritrocito (Fig. 4C). Por último, la abertura de un poro en la membrana del eritrocito (proceso no dependiente de la actividad proteolítica) provoca que esta se doble rápidamente hacia el exterior y disperse eficientemente los merozoítos al torrente sanguíneo (Fig. 4D) (Wirth y Pradel, 2012).

Procesamiento proteolítico general

Además de las proteasas que participan en los diferentes procesos descritos anteriormente, también existen otras que participan en etapas de procesamiento proteolítico esenciales y por tanto son consideradas posibles dianas terapéuticas.

A diferencia de la plasmepsina I-IV, la plasmepsina V no está localizada en la vacuola digestiva, sino que está restringida a la membrana del retículo endoplasmático (Klemba y Goldberg, 2005). Esta proteasa aspártico corta los motivos de secuencias PEXEL, proceso esencial para la exportación hacia el citosol de las proteínas que contienen esta secuencia (Boddey *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2010). La exportación de estas proteínas permite al parásito la remodelación de la célula hospedera lo que puede ser un mecanismo para evadir las defensas del hospedero. Por tanto la inhibición de la plasmepsina V, pudiera ser una estrategia para la eliminación de los parásitos (Goldberg y Cowman, 2010).

Por otra parte *P. falciparum* presenta un proteosoma eucariótico funcional localizado en el citosol del parásito y un complejo proteico tipo treonino peptidasa bacteriana ClpQ/hslV situado en la mitocondria (Tschan *et al.*, 2010). También se ha observado un máximo de proteínas ubiquitinadas en los estadios eritrocíticos de trofozoito y esquizonte (Ponts *et al.*, 2011). El proteosoma de *P. falciparum* es considerado una diana terapéutica multietapa, aunque es un desafío importante encontrar inhibidores específicos del proteosoma del microorganismo (Nigel *et al.*, 2012).

Asimismo, en *P. falciparum* el ortólogo de la proteasa ClpP de cianobacterias (PfClpP) se expresa en los estadios asexuales eritrocíticos y presenta actividad de proteasas serino. Esta enzima fue localizada en el apicoplasto y se demostró que es esencial para la supervivencia del parásito (Rathore *et al.*, 2010).

También se ha identificado y caracterizado funcionalmente la proteasa DegP de *P. falciparum*. Se postula que esta enzima se encuentra formando un complejo con la proteína de choque térmico 70, la superóxido

dismutasa y la enolasa. Su expresión es inducida por choque térmico o estrés oxidativo por lo que pudiera jugar un rol importante en la fisiología del microorganismo. Además se demostró que anticuerpos contra esta enzima inhiben el crecimiento *in vitro* de *P. falciparum* (Sharma *et al.*, 2014).

Por otra parte la metionina aminopeptidasa (MetAP) de la familia M18 cataliza la eliminación del residuo de Met del N-terminal de las proteínas nacientes durante la síntesis de proteínas en el citosol (Lowther y Matthews, 2000). Asimismo la aminopeptidasa PfAM17 regula la concentración de los aminoácidos en general y es muy importante para la obtención de leucina libre, que posteriormente puede ser intercambiada por isoleucina (único aminoácido que no se encuentra en la hemoglobina y el parásito no es capaz de sintetizar) mediante transportadores (McGowan, 2013). Esta enzima presenta especificidad restringida por aminoácidos voluminosos e hidrofóbicos, especialmente Leu (Poreba *et al.*, 2012).

En cuanto a las carboxipeptidasas, solo se ha identificado un gen que codifica para este tipo de enzimas. Esta enzima denominada PfNna1, pertenece a las metalo carboxipeptidasas de la familia M14D y se encuentra conservada en el género *Plasmodium*. Inhibidores de carboxipeptidasas como el *Parthenolide* son capaces de causar la lisis de *P. falciparum* en las primeras 6 horas del tratamiento por lo que se postula que la PfNna1 es una carboxipeptidasa involucrada en el procesamiento proteolítico de los extremos carboxilos de proteínas y péptidos. Esta enzima se sobreexpresa en la fase de gametocitos y en la fase de esquizogonia tardía (Rodríguez de la Vega 2010).

Por otra parte se ha informado la presencia de metacaspasas en *P. falciparum*, estas enzimas (MCA) presentan un dominio C14 con una díada catalítica similar a cisteína/histidina y teniendo en cuenta su homología con las caspasas se postula que las metacaspasas están involucradas en la muerte celular mediante apoptosis (Meslin *et al.*, 2011).

Inhibidores de proteasas como antimaláricos.

Teniendo en cuenta que las proteasas constituyen importantes dianas terapéuticas y muchos de los inhibidores conocidos tradicionalmente solo han sido útiles para demostrar este principio, no se detiene la búsqueda de nuevos inhibidores de proteasas con actividad antimalárica. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de inhibidores de proteasas de diferentes clases mecánicas que inhiben el crecimiento *in vitro* de *P. falciparum*.

Tabla 1. Inhibidores de proteasas que inhiben el crecimiento *in vitro* de *P. falciparum*.

Tabla 1. *Protease inhibitors that disrupts P. falciparum growth in vitro.*

Inhibidor	Estructura	Blanco / Clase mecanística	IC ₅₀ <i>P. falciparum</i> <i>in vitro</i> ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	IC ₅₀ Enzima diana ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Referencia
JCP04	Cloroisocumarina	PfSUB1 /serino	22,0	18	Arastu-Kapur <i>et al.</i> (2008)
β -lactona	β -lactona	PfClpP/serino	7,5	<10	Rathore <i>et al.</i> (2010)
PR709A	Vinilsulfona	Subunidad $\beta 5$ del proteo- soma /serino	0,5	10	Li <i>et al.</i> (2014)
KBE009	Peptidomimético derivado de la bes- tatina	PfAM1/metalo	18,0	0,8	González-Bacerio <i>et al.</i> (2017)
CHR-2863	Hidroxamato relacionado con el Tosedostat	PfAM17/metalo	0,37	1,413	Skinner-Adams <i>et al.</i> (2012)
4u	Derivado de ácido hidroxámico y pipe- razina	Falcilisina / metalo	1,4	1,5	Chance <i>et al.</i> (2018)
NvCI	Péptido	Carboxipeptidasa A	82,9	5,8	Covalada <i>et al.</i> (2012)
Péptido PEXEL	Péptido	plasmepsina V/ aspártico	2,5	0,02	Sleebs <i>et al.</i> (2014)
49c	Peptidomimético basado en hidro- xietilamina	Plasmepsina IX y X/ aspár- tico	0,0006	ND (inhibició n total con 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Pino <i>et al.</i> (2017)
Plextatin	Péptido	Falcipaína 2 /cisteíno	0,52	1,35	Salas-Sarduy <i>et al.</i> (2013)
Odanacatib	Derivado de tetraci- clina	Falcipaína 2 /cisteíno	50	0,98	Alberca <i>et al.</i> (2019)

ND: No determinada

Hasta el momento las propiedades farmacocinéticas de algunos de los inhibidores o la falta de especificidad no han permitido que los esfuerzos en la identificación de estas moléculas sean coronados con el éxito como antimaláricos, por lo que se precisa de más esfuerzos en la búsqueda de nuevos inhibidores. En este sentido, la identificación de nuevos compuestos orientada hacia sitios de unión fuera del centro activo de la enzima, como los inhibidores alostéricos, es una alternativa interesante con respecto a la tradicional búsqueda de moléculas que se unen al centro activo y pudiera contribuir a la obtención de inhibidores más selectivos (Pant *et al.*, 2018.; Alberca *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos y tienen un rol fundamental en el ciclo de vida de muchos organismos. Debido a la participación de proteasas de diferentes mecanismos de los procesos fisiológicos esenciales del ciclo de vida de *P. falciparum*, muchas de estas enzimas se han reconocido como dianas terapéuticas. Este hecho justifica los esfuerzos realizados por muchos investigadores en el aislamiento/diseño y obtención de inhibidores que pudieran tener potencialidades como antimaláricos.

LITERATURA CITADA

- Allary, M., Schrével, J., y Florent, I. (2002). Properties, stage-dependent expression and localization of *Plasmodium falciparum* M1 family zinc-aminopeptidase. *Parasitology*, 125 (Ppt1): 1–10.
- Aly, A. S. I., y K. Matuschewski, (2005). A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J. Exp. Med.*, 202(2): 225–230.
- Arastu-Kapur, S., Ponder, E. L., Grainger, M., Phillips, et al. (2008). Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Chem. Biol.*, 4(3): 203–213.
- Baker, R. P., Wijetilaka, R., y S. Urban, (2006). Two *Plasmodium rhomboid* proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS Pathogens*, 2(10): 0922–0932.
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L et al. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *P. Nat. Acad. Sci. USA*, 99(2): 990–995.
- Beyer, B., Johnson, J., Chung, A., Li, T., et al. (2005). Active-site specificity of digestive aspartic peptidases from the four species of *Plasmodium* that infect humans using chromogenic combinatorial peptide libraries. *Biochemistry*, 44: 1768–1779.
- Blackman, M. J., Fujioka, H., Stafford, W. H. L., Sajid, M., et al. (1998). A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Biol. Chem.*, 273 (36), 23398–23409.
- Boddey, J. A., Hodder, A. N., Gunther, S., Gilson, P. R., et al. (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature*, 463, U627–U652.
- Bonilla, J. A., Moura, P. A., Bonilla, T. D., Yowell, C. A., et al. (2007). Effects on growth, hemoglobin metabolism and paralogous gene expression resulting from disruption of genes encoding the digestive vacuole plasmepsins of *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.*, 37, 317–327.
- Chance, J. P., Fejzic, H., Hernandez, O., Istvan, E. S., et al. (2018). Development of piperazine-based hydroxamic acid inhibitors against falcilysin, an essential malarial protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 28(10): 1846–1848.
- Chandramohanadas, R., Davis, P. H., Beiting, D. P., Harbut, M. B., et al. (2009). Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science*, 324: 794–797.
- Child, M. a., Harris, P. K., Collins, C. R., Withers-Martinez, C., et al. (2013). Molecular determinants for subcellular trafficking of the malarial sheddase PfSUB2. *Traffic*, 14(10): 053–1064.
- Coombs, G. H., Goldberg, D. E., Klemba, M., Berry, C., et al. (2001). Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol.* 17(11): 532–537.
- Cotrin, S. S., Gouvêa, I. E., Melo, P. M. S., Bagnaresi, P., et al. (2013). Substrate specificity studies of the cysteine peptidases falcipain-2 and falcipain-3 from *Plasmodium falciparum* and demonstration of their kininogenase activity. *Mol. Biochem. Parasit.*, 187(2): 111–116.
- Covalada, G., Alonso del Rivero, M., Chávez, M A., Avilés, FX., Reverter D. (2012). Crystal Structure of Novel Metallo-carboxypeptidase Inhibitor from Marine Mollusk *Nerita versicolor* in Complex with Human Carboxypeptidase A4. *J Biol Chem.* 287(12): 9250–9258.
- Cowman, A. F., Berry, D., y J. Baum (2012). The cell biology of disease: The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J. Cell. Biol.*, 198 (6): 961–971.
- Dahl, E. L., y P. J. Rosenthal, (2005). Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasit.*, 139(2): 205–212.
- Dalal, S., & Klemba, M. (2007). Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 282, 35978–35987.
- De Monerri, N. C. S., Flynn, H. R., Campos, M. G., Hackett, F., et al. (2011). Global identification of multiple substrates for *Plasmodium falciparum* SUB1, an essential malarial processing protease. *Infect. Immun.*, 79(3), 1086–1097.
- Deu, E., Leyva, M. J., Albrow, V. E., Rice, M. J., et al. (2010). Functional studies of *Plasmodium falciparum* dipeptidyl aminopeptidase I using small molecule inhibitors and active site probes. *Chem. Biol.*, 17, 808–819.
- Drew, M. E., Banerjee, R., Uffman, E. W., Gilbertson, S., et al. (2008). *Plasmodium* food vacuole plasmepsins are activated by falcipains, *J. Biol. Chem.* 283, 12870–12876.
- Ghosh, S., Chisholm, S. A., Dans, M., Lakkavaram, A., et al. (2018). The cysteine protease dipeptidyl aminopeptidase 3 does not contribute to egress of *Plasmodium falciparum* from host red blood cells. *PLoS ONE*, e0193538: 1–16.
- Goldberg, D. E., y A. F. Cowman (2010). Moving in and renovating: exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8: 617–621.
- González-Bacerio, J., El Chamy, S., Méndez, Y., Pascual, I., et al. (2017). KBE009: An antimalarial bestatin-like inhibitor of the *Plasmodium falciparum* M1 aminopeptidase discovered in an Ugi multicomponent reaction-derived peptidomimetic library. *Bioorg. Med. Chem.*, 25: 4628–4636.
- Green, J. L., Hinds, L., Grainger, M., Knuepfer, E., et al. (2006). *Plasmodium thrombospondin* related apical merozoite protein (PTRAMP) is shed from the surface of merozoites by PfSUB2 upon invasion of erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasit.*, 150(1): 114–117.
- Hafalla, J. C., Silvie, O., y K. Matuschewski, (2011). Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev*, 240(1): 297–316.

- Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A. H., *et al.* (2002). *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood*, 100(3): 1048–1054.
- Harris, P. K., Yeoh, S., Dluzewski, A. R., O'Donnell, R. A., *et al.* (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathogens*, 1(3): 0241–0251.
- Hodder, A. N., Malby, R. L., Clarke, O. B., Fairlie, W. D., *et al.* (2009). Structural Insights into the Protease-like Antigen *Plasmodium falciparum* SERA5 and Its Noncanonical Active-Site Serine. *J. Mol. Biol.*, 392(1): 154–165.
- In silico Guided Drug Repurposing: Discovery of New Competitive and Non-competitive Inhibitors of Falcipain-2. (2019). Alberca, L.N., Chuguransky, Sara R., Álvarez, CL., Talevi A. y Salas-Sarduy, E. *Front. Chem.*: 7 (354).
- Klemba, M., Gluzman, I., y D. E. Goldberg (2004). *Plasmodium falciparum* dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. *J. Biol. Chem.*, 279: 43000–43007.
- Klemba, M., y D. E. Goldberg (2005). Characterization of plasmeprin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasit.*, 143: 183–191.
- Koussis, K., Withers-Martinez, C., Yeoh, S., Child, M., *et al.* (2009). A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *The EMBO Journal*, 28 (6): 725–735.
- Lee, C. E., Adeeba, K., y G. Freigang (2010). Human *Plasmodium knowlesi* infections in Klang Valley, Peninsula Malaysia: a case series. *Med J Malaysia*, 65(1): 63–65.
- Li, H., Child, M. a., y M. Bogyo (2012). Proteases as regulators of pathogenesis: Examples from the Apicomplexa. *BBA - Proteins and Proteom*, 1824(1): 177–185.
- Li, H., Linden, W. A. Van Der, Verdoes, M., *et al.* (2014). Assessing subunit dependency of the *Plasmodium* proteasome using small molecule inhibitors and active site probes. *ACS Chem. Biol.*, 9(8): 1869–1876.
- Liu, J., Istvan, E. S., Gluzman, I. Y., Gross, J., *et al.* (2006). *Plasmodium falciparum* ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *P. Nat. Acad. Sci USA*, 103: 8840–8845.
- Lowther, W., y B. Matthews, (2000). Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta*, (1477): 157–167.
- M.J. Blackman. (2004). Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. *Cell. Microbiol.*, 6: 893–903.
- McCoubrie, J. E., Miller, S. K., Sargeant, T., Good, R. T., *et al.* (2007). Evidence for a common role for the serine-type *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen proteases: Implications for vaccine and drug design. *Infect. Immun.*, 75 (12): 5565–5574.
- McGowan, S. (2013). Working in concert: The metalloaminopeptidases from *Plasmodium falciparum*. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23(6): 828–835.
- Meslin, B., Beavogui, AH., Fasel N Hent Picot S. (2011) *Plasmodium falciparum* metacaspase PfMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. *PLoS One*6: e23867.
- Milani, K. J., Schneider, T. G., y T. F. Taraschi, (2015). Defining the morphology and mechanism of the hemoglobin transport pathway in *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes. *Eukaryot. Cell*, 14(4): 415–426.
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., y T. Wellems (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Natur. Med.*, 19(2): 156–167.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., y O. K. Doumbo, (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872): 673–679.
- Murata, C. E., y D. E. Goldberg, (2003). *Plasmodium falciparum* falcilysin: an unprocessed food vacuole enzyme. *Mol. Biochem. Parasit.*, 129: 123–126.
- Murata, C., y D. E. Goldberg, (2003). *Plasmodium falciparum* falcilysin. A metalloprotease with dual specificity. *J. Biol. Chem.*, 278(39): 38022–38028.
- Nigel, M., Arndt, H., y G. Pradel (2012). The proteasome of malaria parasites: A multi-stage drug target for chemotherapeutic intervention? *Int. J. Parasitol-Drug.*: 2, 1–10.
- Pant, A., Kumar, R., Wani, N. A., , S. Verma, Sharma R., *et al.* (2018). Allosteric site Inhibitor disrupting auto-processing of malarial cysteine proteases. *Sci. Report.* 8: 16193.
- Pino, P., Caldelari, R., Mukherjee, B., Vahokoski, J., *et al.* (2017). A multistage antimalarial targets the plasmeprins IX and X essential for invasion and egress. *Science*, 358: 522–528.
- Ponpuak, M., Klemba, M., Park, M., Gluzman, I. Y., *et al.* (2007). A role for falcilysin in transit peptide degradation in the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Mol. Microbiol.* 63 (2): 314–334.
- Ponts, N., Saraf, A., Chung, D. W., Harris, A., *et al.* (2011). Unraveling the human malaria parasite's ubiquitome. *J. Biol. Chem.*, 286, 40320–40330.
- Poreba, M., McGowan, S., Skinner-Adams, T., Trenholme, K. R., *et al.* (2012). Fingerprinting the substrate specificity of M1 and M17 neutral aminopeptidases of human malaria, *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, 2: e31938.
- Ragheb, D., Dalal, S., Bompiani, S., Ray, W. K., *et al.* (2011). Distribution and biochemical properties of an M1-family aminopeptidase in *Plasmodium falciparum* indicate a role in vacuolar hemoglobin catabolism. *J. Biol. Chem.*, 286: 27255–27265.
- Rathore, S., Sinha, D., Asad, M., Böttcher, T., *et al.* (2010). A cyanobacterial serine protease of *Plasmodium falciparum* is targeted to the apicoplast and plays an important role in its growth and development. *Mol. Microbiol.*, 77(4): 873–890.

- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., y R. Finn, (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, 44: 343–350.
- Rodriguez de la Vega, M. (2010). Una nueva familia de peptidasas M14 relacionadas con la tubulina: Implicaciones funcionales, estructurales y evolutivas. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Rohrbach, P., Friedrich, O., Hentschel, J., Plattner, H., et al. (2005). Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Biol. Chem.*: 280: 27960–27969.
- Russo, I., Babbitt, S., Muralidharan, V., Butler, T., et al. (2010). Plasmepsin V licenses *Plasmodium* proteins for export into the host erythrocyte. *Nature*, 463: 632–636.
- Sajid, M., Withers-Martinez, C., y M. J. Blackman, (2000). Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *J. Biol. Chem.*, 275(1): 631–641.
- Salas-Sarduy, E., Cabrera-Muñoz, A., Cauherff, A., González-González, Y. et al. (2013). Antiparasitic effect of a fraction enriched in tight-binding protease inhibitors isolated from the Caribbean coral *Plexaura homomalla*. *Exp. Parasitol.*, 135(3): 611–622.
- Sharma, S., Jadli, M., Singh, A., Arora, K., et al. (2014). A secretory multifunctional serine protease, DegP of *Plasmodium falciparum*, plays an important role in thermo-oxidative stress, parasite growth and development. *FEBS Journal*, 281: 1679–1699.
- Shenai, B. R., Sijwali, P. S., Singh, A., y P. J. Rosenthal (2000). Characterization of native and recombinant falcipain 2 a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 275: 29000–29010.
- Sijwali, P. S., Kato, K., Seydel, K. B., Gut, J., et al. (2004). *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *PNAS*, 101 (23): 8721–8726.
- Sijwali, P. S., Shenai, B. R., Gut, J., Singh, A., et al. (2001). Expression and characterization of the *Plasmodium falciparum* haemoglobinase falcipain-3. *Biochem. J.*, 360: 481–489.
- Singh, N., Sijwali, P. S., Pandey, K. C., y P. J. Rosenthal (2006). *Plasmodium falciparum*: Biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2. *Exp. Parasitol.*, 112(3): 187–192.
- Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J., et al. (2010). Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathog.*, 6(2): e1000746.
- Singh, S., Plassmeyer, M., Gaur, D., y L. H. Miller, (2007). Mononeme: a new secretory organelle in *Plasmodium falciparum* merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. *P. Nat. Acad. Sci. USA*, 104(50): 20043–20048.
- Skinner-Adams, T. S., Peatey, L., Anderson, K., Trenholme, R., et al. (2012). The aminopeptidase inhibitor CHR-2863 is an orally bioavailable inhibitor of murine malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(6): 3244–3249.
- Sleebs, B. E., Lopaticki, S., Marapana, D. S., O'Neill, M. T., et al. (2014). Inhibition of Plasmepsin V activity demonstrates its essential role in protein export, PfEMP1 display, and survival of Malaria parasites. *PLoS Biology*, 12(7): 1–16.
- Srinivasan, P., Coppens, I., y M. Jacobs-Lorena, (2009). Distinct roles of *Plasmodium rhomboid 1* in parasite development and Malaria pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 5(1): e1000262.
- Stack, C. M., Lowther, J., Cunningham, E., Donnelly, S., et al. (2007). Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 Leucyl Aminopeptidase a protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. *J. Biol. Chem.*, 282(3): 2069–2080.
- Surbramanian, S., Hardt, M., Choe, Y., Niles, R., et al. (2009). Hemoglobin cleavage site-specificity of the *Plasmodium falciparum* cysteine proteases Falcipain 2 and 3. *PLoS ONE*, 4(4): e5156.
- Tschan, S., Kreidenweiss, A., Stierhof, Y., Sessler, N., et al. (2010). Mitochondrial localization of the threonine peptidase PfHsIV, a ClpQ ortholog in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.*, 40: 1517–1523.
- Valiente, P. A., Batista, P. R., Pupo, A., Pons, T., et al. (2008). Predicting functional residues in *Plasmodium falciparum* plasmepsins by combining sequence and structural analysis with molecular dynamics simulations. *Proteins*, 73(2): 440–457.
- Wang, F., Krai, P., Deu, E., Bibb, B., et al. (2011). Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* dipeptidyl aminopeptidase 1. *Mol. Biochem. Parasit.*, 175: 10–20.
- Wirth, C. C., y G. Pradel, (2012). Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int. J. Med. Microbiol.*, 302 (4-5): 172–178.
- Wu, Y., Wang, X., Liu, X., y Y. Wang, (2003). Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasite. *Genome Res.*, 13(4): 601–616.
- Yeoh, S., Donnell, R. A. O., Koussis, K., Dlugowski, A. R., et al. (2007). Subcellular discharge of a Serine Protease mediates release of invasive Malaria parasites from host erythrocytes. *Cell*, 131: 1072–1083.