



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

Tesis de Pregrado

***“Evaluación de la actividad leishmanicida de péptidos
derivados de toxinas modificadoras de lípidos”***

Edgar Alejandro Pinos Tamayo

08 de octubre del 2020, Ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 10 de Septiembre de 2020

Yo, Edgar Alejandro Pinos Tamayo con documento de identidad N° 1723438196, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Edgar Alejandro Pinos Tamayo

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Evaluación de la actividad leishmanicida de péptidos derivados de toxinas modificadoras de lípidos”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Edgar Alejandro Pinos Tamayo, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 09 de Septiembre de 2020

Firma:



.....
José Rafael de Almeida

C.I: 1757448954

Agradecimientos

A mi tutor Rafael de Almeida Ph.D., un gran profesional y ser humano, del cual he aprendido muchas lecciones tanto en el ámbito académico como personal, cuyas lecciones y consejos me han servido de gran manera en la realización de mi trabajo de titulación y en la orientación hacia un futuro campo profesional.

Al investigador MSc. Bruno Mendes, quien, de igual manera, es una gran persona y profesional, el cual fue un agente fundamental para la realización de los ensayos biológicos de mi trabajo; sus enseñanzas y colaboración fueron esenciales para mi aprendizaje y desarrollo en cuanto al trabajo en un laboratorio de cultivo celular.

Al técnico del Laboratorio de Productos Naturales de Ikiam, Joel Medina, quien fue la persona que dirigió mi aprendizaje durante el manejo de equipos analíticos, los cuales fueron necesarios en las etapas de identificación y caracterización de este trabajo.

A las técnicas del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Ikiam, Giovanna Morán, Nina Espinosa de los Monteros y Andrea Carrera, quienes me colaboraron de la mejor manera en la realización de distintos ensayos en dicho laboratorio.

A mi amiga María Sol Peña, quien fue de mucha ayuda durante este arduo período, una persona de la cual he aprendido mucho y que participó de la realización y terminación de todo lo inicialmente propuesto.

Finalmente, expreso mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que colaboraron o fueron partícipes ya sea de grandes o pequeñas etapas de mi trabajo de titulación. Toda su ayuda fue necesaria y muy importante.

Dedicatoria

Este trabajo está principalmente dirigido hacia mi familia. Mis padres, Edgar y Germania, y mi hermano Juan. Ustedes son mis pilares, una de las más grandes razones para siempre seguir adelante con una buena actitud y mucha determinación. Siempre me han apoyado, más aún en los momentos difíciles; sin ustedes, su motivación y cariño yo no podría haber llegado hasta este punto. Todo mi esfuerzo lo he hecho de la mejor manera y siempre con el afán de intentar recompensar todo su sacrificio, confianza y amor hacia mí.

De igual manera, no me puedo olvidar del resto de mi familia. Mis tías, tíos, primos y mi abuelita, quienes también me han sabido brindar una sincera sonrisa y palabras de aliento para siempre progresar y continuar hacia adelante.

A mi novia, Mónica Peñafiel, mi mejor amiga, la persona más noble, admirable y especial que he tenido la suerte de conocer. A quién agradezco por permitirme caminar a su lado todo este tiempo, quien siempre ha tenido buenos deseos y una gran confianza en mí, con los cuales he podido crecer a nivel personal y durante gran parte de mi carrera universitaria.

A todos mis amigos más cercanos, con quienes compartí tantos buenos momentos durante estos años, y con los que espero contar por mucho tiempo.

A los excelentes profesores que me acompañaron y guiaron durante mi carrera universitaria.

Índice general

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	i
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	ii
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria	iv
Índice general	v
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
Lista de abreviaturas	x
1. CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	19
1.3. Justificación de la investigación.....	21
1.4. Objetivos de la investigación	22
2. CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO.	23
2.1. Análisis bioinformático de los péptidos.....	23
2.2. Síntesis, caracterización y pureza de los péptidos	24
2.3. Evaluación del potencial leishmanicida de los péptidos sintetizados	27
2.4. Análisis estadísticos	30
3. CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	31
3.1. Análisis <i>in silico</i> de las características de los péptidos	31
3.2. Síntesis, identificación y pureza de péptidos.....	35
3.3. Ensayos biológicos	35
4. CAPÍTULO IV. INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.	45
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
5.1. Conclusiones	57
5.2. Recomendaciones.....	58
6. REFERENCIAS.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. Códigos de PLA ₂ s precursoras y características físico-químicas generales de los péptidos seleccionados	23
Tabla 2. Gradiente utilizado para la determinación de la pureza de los péptidos sintetizados, utilizando RP-HPLC	26
Tabla 3. Características físico-químicas de los péptidos investigados	31
Tabla 4. Predicciones sobre la activación de Linfocitos T por parte de los tres péptidos sintetizados.....	32
Tabla 5. Predicciones de la afinidad peptídica por distintos componentes del MHC-II	34
Tabla 6. Análisis múltiple de secuencias de los 3 péptidos sintéticos	34
Tabla 7. Identificación monoisotópica y caracterización de la homogeneidad de los péptidos sintetizados.....	35
Tabla 8. Valores de EC ₅₀ obtenidos mediante la evaluación peptídica sobre promastigotes metacíclicos	38
Tabla 9. Valores de CC ₅₀ e índices de selectividad de los péptidos sintéticos sobre la morfología extracelular de <i>Leishmania</i> spp.	38

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	3
Figura 2. Ocurrencia de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador en el año 2019.	21
Figura 3. Método de introducción de los péptidos evaluados en el equipo MALDI-TOF MS	25
Figura 4. Representación del ensayo de viabilidad celular MTT realizado con los péptidos sintéticos.....	28
Figura 5. Predicción de la actividad de los péptidos como epítopos activadores de Linfocitos B....	33
Figura 6. Actividad anti- <i>Leishmania</i> de los péptidos, evaluados sobre promastigotes metacíclicos....	37
Figura 7. Actividad inhibitoria de los péptidos sintéticos sobre la infección de macrófagos primarios.....	40
Figura 8. Determinación del número de amastigotes intracelulares por cada 100 macrófagos infectados.	41
Figura 9. Determinación de los índices infectivos generados en respuesta al tratamiento peptídico.....	43
Figura 10. Evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> M2269 generada por los péptidos sintéticos.	44

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida, responsable de producir alrededor de 500 mil muertes anuales a nivel mundial, que es producida por los parásitos del género *Leishmania*. Los medicamentos convencionales contra esta enfermedad son poco eficientes, y su uso ha sido cuestionado, dados sus efectos secundarios adversos; este hecho hace que la búsqueda por nuevas alternativas terapéuticas sea imperativa. Los péptidos han demostrado tener una alta eficiencia en el tratamiento de distintas enfermedades humanas debido a sus características físico-químicas y propiedades biológicas heterogéneas. Por otro lado, las toxinas de los venenos de serpientes, dada su amplia variabilidad de componentes biológicamente activas, son fuentes promisorias para la obtención de este tipo de biomoléculas. En el presente trabajo se realizó la síntesis y evaluación (*in vitro*) del potencial anti-*Leishmania* de tres péptidos derivados de fosfolipasas A₂ de venenos de serpientes, sobre dos especies de *Leishmania* presentes en Ecuador y algunas regiones de Sudamérica (*L. amazonensis* y *L. braziliensis*). Los resultados indicaron que los péptidos producen inhibición tanto de la viabilidad parasitaria, en su morfología infectiva extracelular (siendo Cergo el péptido de mayor actividad, presentando valores de EC₅₀ = 110,4 μM sobre *L. amazonensis* y 93,69 μM sobre *L. braziliensis*), como de la cantidad parásitos intra-macrófagos, en comparación a los grupos sin tratamiento. Los péptidos no son citotóxicos hacia macrófagos primarios (CC₅₀ entre 448 y 550,83 μM). Estos resultados indican que estas biomoléculas son potenciales candidatos para el desarrollo de tratamientos futuros contra la leishmaniasis, y por lo tanto, pueden dar respuesta a esta problemática de salud de índole mundial.

Palabras clave: Anti-Leishmania, fosfolipasas, leishmaniasis, macrófagos, péptidos, síntesis.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease, responsible for producing around 500 thousand deaths annually worldwide, which is produced by parasites of the genus *Leishmania*. Conventional drugs against this disease are not very efficient, and their use has been questioned, given their adverse side effects; this fact makes the search for new therapeutic alternatives imperative. Peptides have been shown to be highly efficient in the treatment of different human diseases due to their physicochemical characteristics and heterogeneous biological properties. On the other hand, toxins from snake venoms, given their wide variability of biologically active components, are promising sources for obtaining this type of biomolecules. In the present study, the synthesis and evaluation (*in vitro*) of the anti-*Leishmania* potential of three peptides derived from phospholipases A₂ from snake venoms was carried out over two *Leishmania* species present in Ecuador and some regions of South America (*L. amazonensis* and *L. braziliensis*). The results indicated that the peptides inhibit both parasite viability, in its extracellular infective morphology (Cergo being the peptide with the highest activity, presenting EC₅₀ = 110.4 μM on *L. amazonensis* and 93.69 μM on *L. braziliensis*), as well as the number of intra-macrophage parasites, compared to the groups without treatment. Peptides are not cytotoxic towards primary macrophages (CC₅₀ between 448 and 550,83 μM). These results indicate that these biomolecules are potential candidates for the development of future treatments against leishmaniasis, and therefore, they may respond to this global health problem.

Keywords: Anti-Leishmania, phospholipases, leishmaniasis, macrophages, peptides, synthesis.

Lista de abreviaturas

ACN: Acetonitrilo

AMP: Péptido antimicrobiano

BE: Bromuro de etidio

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea

CC₅₀: Concentración citotóxica media

CHCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

DCM: Diclorometano

EC₅₀: Concentración efectiva media

FBS: Suero fetal bovino

Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonilo

HLA: Antígeno leucocitario humano

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

IL-2: Isoleucina 2

KCl: Cloruro de potasio

LAAO: L-amino oxidasa

LPS: Lipopolisacáridos

MALDI-TOF MS: Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Detección de Masas por Tiempo de Vuelo

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II

MSP: Ministerio de Salud Pública del Ecuador

MTT: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

NaCl: Cloruro de sodio

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino

pI: Punto isoeléctrico

PLA₂ Asp49: Fosfolipasa A₂ aspartato 49

PLA₂ Lys49: Fosfolipasa A₂ lisina 49

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SPPS: Síntesis de péptidos en fase sólida

TIS: Triisopropilsilano

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TFA: ácido trifluoroacético

UF: Unidad de fluorescencia

1. CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Leishmaniasis, una enfermedad desatendida

La leishmaniasis es una enfermedad tropical de tipo zoonótica (transmitida de los animales a los seres humanos) que actualmente se ha convertido en un foco de interés para la investigación, dados los efectos perjudiciales y en algunos casos mortales que genera en los individuos que la padecen, y también por los elevados índices de desatención que presenta a nivel mundial [1]. Esta afección a la salud es producida por los parásitos protozoarios flagelados del género *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae) del cual, hasta la actualidad, se han descrito aproximadamente 20 especies. Los vectores que transmiten estos parásitos a sus respectivos hospedadores son los dípteros hembra pertenecientes a la familia Phlebotominae; éstos son insectos hematófagos y mediante su picadura regurgitan los parásitos en su morfología infectiva, conocida como promastigote [2].

Una vez que el vector infectado realiza la picadura, los promastigotes metacíclicos, los cuales se caracterizan por su forma fusiforme y por la presencia de un flagelo libre en su parte anterior, se difunden rápidamente en la sangre [3]. De manera inmediata, los macrófagos y otras células del sistema inmune del hospedador fagocitan a los organismos parasitarios, los cuales dentro de los fagolisosomas de estas células de defensa cambian a su forma amastigote, caracterizada por su estructura redonda con flagelo reducido [4]. La multiplicación de amastigotes por fisión binaria aumenta con el transcurso del tiempo hasta que se llega a un punto en el que se produce la lisis del macrófago, o la transferencia celular de los amastigotes [5]. Esta última morfología que adopta el parásito durante su ciclo de vida es la responsable de la patogénesis dentro del hospedador vertebrado (**Figura 1**).

Estos flagelados presentan un tropismo, el cual dependiendo de la especie, pueden inducir manifestaciones clínicas variables: cutánea, mucocutánea y visceral, los cuales se dan a nivel de la piel, mucosas y sistémico, respectivamente [6]. La leishmaniasis cutánea presenta una prevalencia oscilante entre 0,7 y 1,2 millones de nuevos casos al año

en todo el mundo; mientras que la leishmaniasis visceral tiene una prevalencia estimada de 0,2 a 0,4 millones de nuevos casos al año [7].

La afección cutánea se produce por la infección de los macrófagos dérmicos, evento que puede traducirse posteriormente en la lenta formación de úlceras y llagas en la piel; en tanto que la afección visceral se produce a través de la infección de los macrófagos reticuloendoteliales y de la médula ósea, lo cual es más frecuente y grave en casos no diagnosticados y tratados a tiempo [8].

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su matriz de énfasis estratégico del programa de investigación en enfermedades tropicales (Tropical Disease Research), ha clasificado a la leishmaniasis en la categoría I, lo cual corresponde a una enfermedad emergente y sin control. La leishmaniasis es una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas reconocidas por la OMS. Estas enfermedades se caracterizan por perjudicar a las poblaciones pertenecientes a las clases sociales más desfavorecidas del mundo y por causar aproximadamente 500 mil muertes anuales; además, el hecho de que no hay tratamientos efectivos ni inversión para encontrar nuevas alternativas terapéuticas empeora esta realidad [9].

El principal criterio para catalogar a una enfermedad como desatendida es que ésta causa desestabilización más que muerte inmediata [10]. Una enfermedad que sea mortal y afecte otros grupos sociales apenas se contraiga va a despertar mucho más el interés de la industria farmacéutica, políticos e inversionistas, ya que querrán encontrar una solución inmediata. Por otro lado, la leishmaniasis y las otras enfermedades desatendidas provocan lesiones y daños sistémicos a largo plazo, lo cual justamente desestabiliza lentamente tanto la salud como los recursos de la persona afectada, que como se mencionó, generalmente vive en condiciones desfavorables [11].

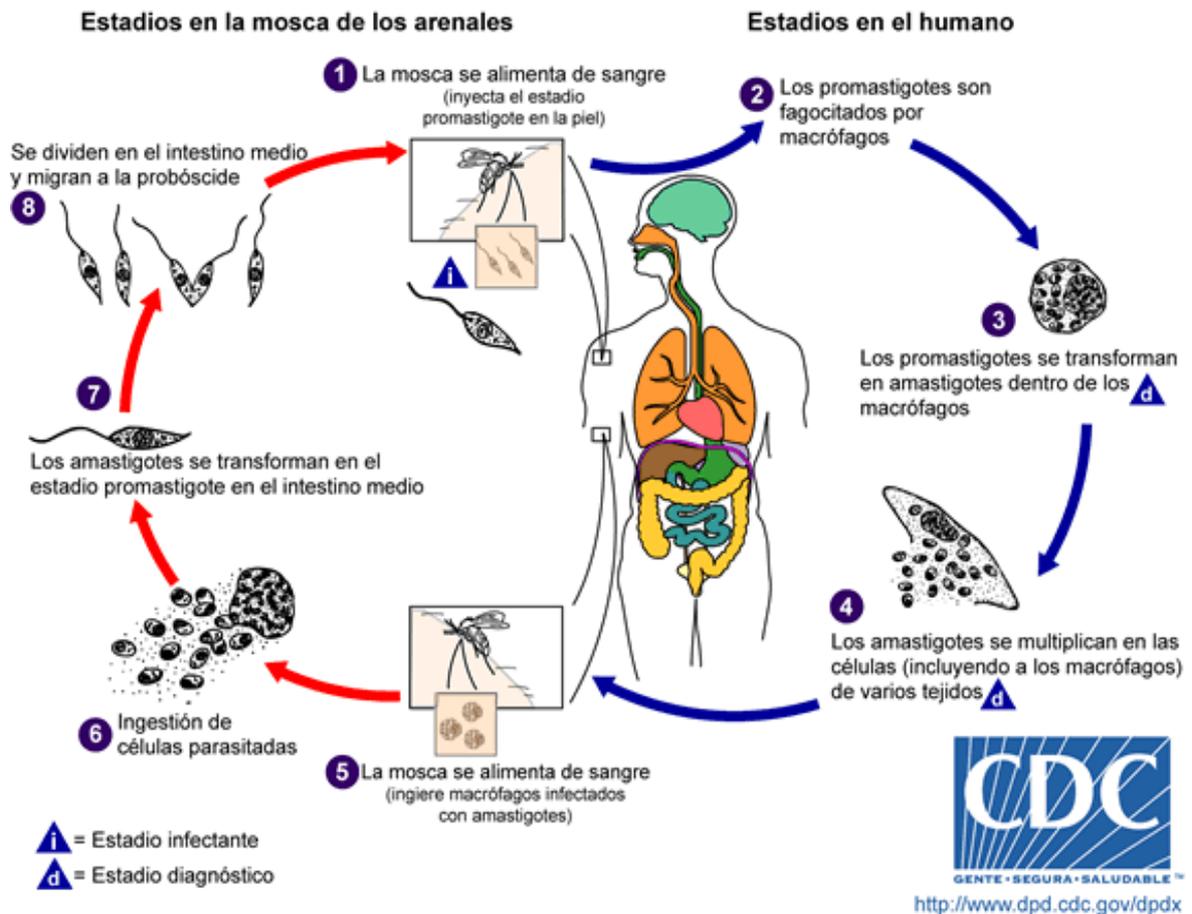


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. El protozoario se caracteriza por presentar dos principales formas de vida: extracelular conocida como promastigote y la forma intracelular clínicamente relevante descrita como amastigote. Las etapas señaladas con flechas azules son aquellas que ocurren dentro de los humanos y otros reservorios mamíferos, mientras las flechas rojas describen los eventos que suceden en el vector transmisor de la enfermedad [12].

1.1.2. Leishmaniasis en Ecuador

En Ecuador, la población se ve afectada principalmente por la leishmaniasis cutánea y mucocutánea, mismas que se han presentado en 23 de las 24 provincias que componen la totalidad del territorio nacional (Galápagos es la única que no ha presentado casos) [12]. Las regiones de mayor prevalencia son tanto los valles interandinos como los bosques húmedos tropicales y subtropicales de la región Insular y de la Amazonía [13].

Adicionalmente, el reciente crecimiento de la transmisión y dispersión de esta enfermedad se atribuye a diversos factores, tales como el aumento de las actividades humanas en ambientes silvestres y la adaptación de los vectores a las zonas urbanas [13].

Se han tomado algunas medidas para controlar la dispersión de la enfermedad en el país. En el año 2012, se capacitaron 187 microscopistas promoviendo un diagnóstico

preciso de la enfermedad. Además de esto, se han abastecido de los medicamentos necesarios a las principales comunidades afectadas. El control del vector no se ha considerado dentro del plan del Ministerio de Salud Pública (MSP) contra la leishmaniasis, dada la dificultad de controlar su naturaleza silvestre así como otras características de su entorno; en contra parte, se han tomado medidas de concientización y prevención de la picadura, mediante la socialización de hábitos de higiene y mantenimiento de condiciones salubres en el hogar [14].

La detección de especies de *Leishmania* en los casos clínicos que se dan en el país es muy deficiente. Los datos del MSP son claros en el número de casos y la distribución de los mismos, pero no lo son en la determinación de las especies de mayor prevalencia. El estudio de Kato et al. [15], en el que se realiza el análisis de secuencias del gen del citocromo B para determinar la distribución de *Leishmania* en el Ecuador a partir de muestras clínicas, determinó que las especies de mayor prevalencia son *L. (Viannia.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*, ambas causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. La región con el mayor número de especies encontradas fue la Costa, y seguidamente, la Amazonía, tal y como ha sido señalado previamente por el MSP [14]. Aunque es interesante destacar que *L. (V.) braziliensis* tiene una mayor prevalencia en la región amazónica, específicamente en las provincias de Orellana y Sucumbíos [15].

Los estudios realizados sobre la leishmaniasis en Ecuador describen aspectos como la prevalencia, dispersión (tanto de los parásitos como del vector), medidas de control y las connotaciones sociales producidas por esta enfermedad en la población [16–19]. Uno de los trabajos más representativos sobre este tema, fue realizado por Hashiguchi & Gómez (1990), en donde se describen las investigaciones sobre la leishmaniasis llevadas a cabo desde 1920 hasta 1989, abordando tópicos como la distribución geográfica, estudios sobre la transmisión, formas clínicas reportadas, aislamiento parasitario, métodos de diagnóstico y tratamientos farmacológicos aplicados en la época [20]. Por otro lado, el libro de León (1957), es también un trabajo de alta importancia, en el que se detalla varios aspectos de los parásitos *Leishmania* como su morfología, hábitat, evolución y forma de transmisión, todo esto con un enfoque en el campo de la medicina [21].

Adicionalmente, estudios técnicos sobre la leishmaniasis empleando herramientas moleculares han permitido la detección precisa de los parásitos dentro de un

individuo infectado [22–25] y dentro de los insectos vectores [26,27]. Pese a esta diversidad de investigaciones, hasta la fecha hay pocos estudios que evalúen el potencial de moléculas específicas contra *Leishmania* spp., que puedan convertirse en candidatas para el desarrollo de nuevos productos de interés biotecnológico. Un ejemplo, es el trabajo realizado por Gachet et al. [28], en el que se evalúa el potencial anti protozoario de plantas tradicionalmente utilizadas en Ecuador. Todo esto señala un escenario amplio por explorar, lleno de nuevas oportunidades para la investigación.

1.1.3. Tratamientos convencionales contra la leishmaniasis

Las investigaciones acerca de la respuesta inmune producida en el ser humano ante una infección por *Leishmania* son múltiples [29]. Algunas de éstas indican que varias células de defensa como los linfocitos Th1, neutrófilos y células dendríticas, además de su estimulación por parte de interferones y quimiocinas, pueden generar respuestas adaptativas protectoras, las cuales están mediadas por diferentes mecanismos [30–32]. Esta información ha dado lugar al diseño de varias vacunas contra la leishmaniasis, las cuales han mostrado una eficiencia limitada o nula. Esto se debe a que la traducción de datos obtenidos en modelos animales a casos humanos aún no se ha conseguido, y también está el hecho del limitado entendimiento tanto de los mecanismos de respuesta inmunológica desencadenados por una infección por *Leishmania* spp., como del desarrollo de memoria inmunológica en el individuo [33].

Por estas razones, la protección de un individuo contra la leishmaniasis a través de la vacunación aún no es algo posible; esto hace que el tratamiento con distintos fármacos en respuesta a una infección ya establecida, sea la única vía de mitigación de los efectos producidos por esta enfermedad parasitaria.

Desde hace algunas décadas, los antimoniales pentavalentes han sido utilizados como medicamentos de primera línea contra la leishmaniasis [29]. Sin embargo, su uso ha sido ampliamente cuestionado debido a la toxicidad que generan en los pacientes y a la posibilidad de resistencia que han adquirido los parásitos con el pasar de los años [34], siendo necesario un monitoreo intensivo y permanente en el tratamiento para evitar complicaciones posteriores.

Otro de los factores que impide el uso de estos fármacos es su excesivo costo en el mercado, siendo muy complicada su adquisición para las personas de escasos recursos [35]. Un ejemplo importante sobre esta realidad es el de la miltefosina, un medicamento relativamente eficiente contra la leishmaniasis visceral, pero cuyo tiempo de tratamiento dura aproximadamente 30 días, ocasionando nuevamente efectos secundarios a nivel sistémico y aumento de costo en la compra de las dosis necesarias [36].

La catalogación de esta enfermedad dentro del grupo de las enfermedades desatendidas a nivel mundial se debe justamente al hecho de que afecta a las comunidades y regiones de mayores índices de desigualdad social, desnutrición, condiciones deplorables de vivienda y falta de recursos; esto se suma al hecho que los gobiernos no brindan el seguimiento político adecuado, por lo que no hay financiamiento ni una adecuada cooperación entre la industria farmacéutica y las autoridades políticas [37].

Esta problemática ha complicado el descubrimiento de nuevos fármacos capaces de superar todas las dificultades de los medicamentos convencionales. Por lo tanto, una opción que ha sido explorada es la modificación de los medicamentos convencionales en lugar de buscar nuevos agentes terapéuticos [37]. La tecnología de las nanopartículas y las formulaciones en liposomas ha contribuido en el direccionamiento de los medicamentos de primera línea contra la leishmaniasis tanto para su óptima acción como para la reducción de efectos secundarios, aunque de nuevo su producción implica procesos complejos que hacen que el producto final sea muy costoso [8].

Éstos y otros problemas de los fármacos convencionales representan un desafío para la búsqueda de mejores alternativas terapéuticas que generen la menor cantidad de efectos secundarios, que tengan un mayor y mejor direccionamiento, que inhiban el desarrollo de resistencia por parte de los parásitos, y por sobre todo, que sean de costo accesible para las regiones y poblaciones más afectadas.

1.1.4. Péptidos, una alternativa terapéutica prometedora

Los péptidos se han convertido en una de las biomoléculas de mayor interés en la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a un gran número de enfermedades. Estas moléculas son estructuralmente diversas, lo cual permite su clasificación en algunos grupos, como los péptidos catiónicos helicoidales, péptidos ricos

en cisteína, péptidos con estructura hoja β , péptidos ricos en aminoácidos regulares, entre otras [38,39]. La mayoría de péptidos con interés terapéutico tienen como principal blanco biológico a la membrana plasmática; este hecho sumado a la diversidad estructural descrita, también permite que las interacciones moleculares con el organismo objetivo sean diferentes, lo cual genera una nueva manera de clasificación, misma que es en base a los mecanismos de acción descritos. Algunos de éstos son, la permeabilización de la membrana plasmática, apertura de poros en forma de barril o en forma de agujero de gusano, y el mecanismo de alfombra, en el que la unión de los péptidos propicia cambios en la fluidez de la membrana que generan que su propiedad de barrera biológica se pierda [40].

Esta heterogeneidad y distintos criterios de clasificación son las razones para que los péptidos sean evaluados sobre diferentes afecciones humanas como el cáncer, diabetes, malaria, infecciones bacterianas [41], e incluso, infecciones por los flagelados *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*, los cuales son parásitos transmitidos por vectores y agentes causales de enfermedades tropicales desatendidas (leishmaniasis y enfermedad de chagas, respectivamente) [42].

Un péptido está constituido por una cadena de dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El número límite de estos bloques de construcción difiere en cuanto al tipo de péptido, pero en el caso de aquellos que son de alta relevancia para la industria farmacéutica, se considera que deben poseer menos de 50 aminoácidos [41].

La producción de péptidos terapéuticos a gran escala se ha convertido en una industria de alta importancia en las últimas décadas, y las tecnologías mayoritariamente desarrolladas y aplicadas son la recombinación heteróloga y la síntesis química [43]. La tecnología de ADN recombinante y los avances que se han producido en esta rama con el transcurso de los años, han permitido que la metodología de producción de péptidos mediante expresión heteróloga sea rentable y sostenible [44]. Esta metodología se basa en la introducción de los genes que codifican el péptido de interés en un microorganismo, ya sea bacteriano o fúngico, para, una vez se haya conseguido inducir la expresión, proceder con la implementación de un sistema de cultivo celular a gran escala utilizando biorreactores [45]. Algunos de los organismos mayormente utilizados son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* [46].

Generalmente, en la expresión heteróloga se realiza una fusión del péptido con otra proteína, la cual sirve como identificador de la correcta expresión del péptido y como agente facilitador para los posteriores procesos de purificación [45]. Pese al amplio desarrollo de esta tecnología, existen algunas limitantes, como el hecho de que la mayoría de péptidos de interés terapéutico son catiónicos, y tienen como blanco las membranas aniónicas, por ende, pueden destruir a aquellos microorganismos utilizados para la expresión. Es por esto que es importante realizar un proceso de selección cuidadoso tanto del péptido de interés y los plásmidos en los que se ingresará la secuencia de nucleótidos, como del organismo receptor, lo cual no tiene una regla general, sino que se basa en el empirismo [44].

Dependiendo de las características del péptido y del fin para el cual éste va a ser utilizado, se puede escoger una u otra técnica de producción a gran escala. También se puede optar por obtener péptidos directamente de su fuente biológica (ya sea un órgano o tejido); éstos son los que mayor actividad terapéutica han presentado sobre distintos blancos, lo cual puede deberse a que la selección natural ha favorecido su estabilidad en el individuo así como su actividad biológica [47]. Sin embargo, esta forma de obtención de un péptido ha resultado ser la menos eficiente debido a la dificultad para purificar la molécula de interés y a la interferencia de otros componentes biológicos, lo cual radica en una limitada eficiencia en la actividad.

Justamente, esta poca eficiencia de los péptidos extraídos de fuentes naturales ha hecho que la técnica de síntesis química posea ciertas ventajas sobre las demás debido que permite: la conjugación de los péptidos con otras biomoléculas (carbohidratos, lípidos o proteínas), la utilización de aminoácidos no naturales en configuración D en lugar de su isómero natural L, o simplemente el reemplazo de aminoácidos puntuales con la finalidad de potenciar la acción biológica esperada o predicha [41].

La introducción de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en 1963, sumado al posterior desarrollo del protector de cadenas laterales 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) a inicios de la década de los 70s, permitió la magnificación en la producción de diversos péptidos pequeños en las siguientes décadas y forjó los protocolos y estándares para que este proceso se pueda realizar de manera automática en la actualidad [48].

A diferencia de la biosíntesis proteica, la síntesis en fase sólida se da desde el extremo C-terminal al N-terminal. El extremo C-terminal del primer aminoácido se acopla a una resina que sirve como soporte para el resto de la síntesis; los aminoácidos se agregan secuencialmente, uno por uno, en un ciclo constante de desprotección, activación y acoplamiento, para finalmente, cuando se haya formado toda la molécula, se produzca la separación del péptido de la mencionada resina utilizando un tratamiento con ácidos fuertes [49].

En la actualidad, los aminoácidos para la síntesis química se consiguen comercialmente. El compuesto Fmoc es uno de los grupos protectores del extremo N-terminal más utilizados en la síntesis química de péptidos. En general, las estrategias de síntesis que usan este protector, emplean t-Butyl para limitar la reactividad de la cadena lateral, y enlazadores basados en hidroximetilfenoxi para la unión a la resina; todo esto genera una protección de tipo ortogonal, requiriendo de una base fuerte para retirar los grupos Fmoc, y un tratamiento con ácidos fuertes para retirar los grupos protectores de las cadenas laterales y para la escisión del péptido de la resina [50].

Si estos grupos no están acoplados a sus respectivas regiones del aminoácido, se pueden producir formaciones erróneas de enlaces peptídicos u otras reacciones químicas aleatorias que formen productos no deseados [51]. El compuesto Fmoc es el más utilizado ya que posee muchas ventajas sobre otros compuestos con el mismo fin; provee de una protección ortogonal al grupo α -amino y su eliminación en el proceso se realiza utilizando piperidina [52].

La síntesis química en fase sólida no es libre de complicaciones y desventajas. Éstas están dadas principalmente por el tamaño final de la molécula. Un péptido muy grande puede hacer que en los ciclos de desprotección y acoplamiento ocurran plegamientos o agregaciones no deseadas entre aminoácidos. Si bien esto no es necesariamente fatal, sí puede disminuir el rendimiento de la síntesis, y para obtener el péptido puro para posteriores evaluaciones se requieren de técnicas cromatográficas, principalmente cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) [48].

Además de su acción biológica, otra gran fortaleza de los péptidos es la simplicidad en el descubrimiento de nuevos candidatos terapéuticos. El desarrollo de técnicas

moleculares, como la presentación sobre fagos o la generación de herramientas bioinformáticas que aprovechen la gran cantidad de librerías disponibles, han permitido que el descubrimiento de nuevos péptidos con actividades prometedoras sea más eficiente, sencillo, y de bajo costo [53].

La existencia de un gran número de bases de datos de acceso abierto sobre péptidos de interés terapéutico ha permitido la identificación y categorización de estas biomoléculas de acuerdo a parámetros como las secuencias, características físico-químicas, objetivos celulares, entre otros. Un claro ejemplo de estas bases de datos es 'The Antimicrobial Peptide Database' (Wang & Wang, 2015), la cual tiene diferentes entradas de búsqueda en función de los organismos a los cuales están dirigidos los péptidos (antibacteriano, antiparasitario, anticancerígeno). La entrada de péptidos antiparasitarios presenta 113 resultados, pero no se especifica ni el género ni la especie, por lo que es necesario ingresar a la fuente original para conocer si se trata de un péptido con acción leishmanicida.

Otros ejemplos importantes de este tipo de base de datos son: 'Colección de péptidos antimicrobianos' (CAMPR3, por sus siglas en inglés) [54], 'SATPdb' [55] y 'Repositorio de datos de péptidos antimicrobianos' (DRAMP, por sus siglas en inglés) [56]; es importante destacar que algunos de los resultados obtenidos en estos repositorios informáticos pertenecen a péptidos provenientes de simulaciones y no de datos experimentales.

La producción de péptidos terapéuticos a gran escala es una industria en auge debido a su elevada demanda, lo cual se traduce en millones de dólares en ganancias [57]. Además, todos los procesos que involucran la síntesis y purificación de un péptido destinado a fines farmacéuticos son más baratos y menos complejos en comparación al campo de producción de fármacos cuyos compuestos activos son moléculas de alta complejidad química [53], como es el caso de los antimoniales pentavalentes. Los péptidos que en los últimos años han tomado relevancia en la búsqueda de nuevas soluciones para la leishmaniasis son los péptidos antimicrobiales.

Los péptidos antimicrobiales (AMPs por sus siglas en inglés) se han convertido en los candidatos principales para el desarrollo de nuevas alternativas farmacéuticas con

acción leishmanicida. Pese a que generalmente su actividad es específica contra microorganismos bacterianos y fúngicos, han surgido varios estudios que utilizan estas moléculas contra varias especies de *Leishmania* obteniendo resultados alentadores, siempre teniendo como indicadores la especificidad hacia los parásitos y la mínima toxicidad hacia las células del hospedador [58].

Los AMPs son moléculas multifuncionales pertenecientes al sistema inmune innato de vertebrados e invertebrados, siendo la primera línea de defensa ante agentes exógenos. Su ubicación en los organismos está en aquellos sitios más propensos a invasiones bacterianas o fúngicas [59]. La estructura de estos péptidos es diversa y heterogénea dada su presencia en un amplio rango de organismos.

Su principal mecanismo de acción contra los patógenos es la disrupción y permeabilización de la membrana plasmática, aunque también se ha demostrado que pueden unirse a dianas intracelulares, desencadenando eventos como la alteración de los niveles de calcio e irrupción de las funciones mitocondriales, lo que finalmente deriva en efectos como necrosis, autofagia y apoptosis [60]. Otra interesante forma de acción de este tipo de péptidos es la modulación del sistema inmune del hospedero para que haya una mayor y mejor respuesta contra el patógeno [61].

Los organismos fuente de los cuales se han aislado y caracterizado la mayoría de AMPs contra *Leishmania* han sido anfibios, mamíferos, insectos, animales acuáticos y plantas. Es por esto que las principales familias de péptidos caracterizados, que presentan acción leishmanicida, son las Temporinas, Bombininas, Magaininas (las tres aisladas de anfibios) y las Catelicidinas (aisladas de mamíferos) [62]. Las Temporinas son los péptidos más pequeños y con menor carga neta (entre 0 y +3) de todos los AMPs reportados; pese a esto, su actividad biológica sobre diversos organismos, incluidos los parásitos *Leishmania*, son altamente promisorias [63]. Si bien no se conoce a detalle las interacciones y actividades de estas familias de péptidos, se hipotetiza que la interacción con las membranas y la subsecuente inducción de cambios en esta barrera (como la formación de poros o el mecanismo de carpeta), es el principal mecanismo de acción.

La síntesis química de péptidos también ha permitido la obtención de moléculas prometedoras, que han generado resultados de alta relevancia. Un ejemplo es el péptido

híbrido CA (1–8) M (1–18), el cual fue sintetizado por Díaz-Achirica et al. (1998). Esta molécula (de 26 aa) es una combinación del péptido cecropina A (37 aa, aislado de la hemolinfa de la polilla de seda gigante) y del péptido melitina (26 aa, aislado del veneno de abeja). La evaluación de este péptido sintético sobre promastigotes de *L. donovani* resultó en una inhibición significativa de la viabilidad parasitaria, en comparación al control negativo, lo cual se refleja en el valor de $EC_{50} = 1,3 \mu\text{M}$ obtenido [64]. Años después, Khalili et al. (2019), sintetizaron su propio péptido híbrido a partir del extremo N-terminal de la cecropina A y el extremo C-terminal de la melitina; el resultado fue un péptido de 11 aa llamado CM11, el cual, al ser evaluado sobre promastigotes de *L. major*, generó inhibición de la viabilidad parasitaria ($EC_{50} = 6,59 \mu\text{M}$) [65].

Los AMPs poseen características físico-químicas esenciales para efectuar su acción antiparasitaria: su corta longitud (no mayor a 15 aa), su naturaleza anfipática y su carga positiva (catiónicos). Su carácter catiónico les permite unirse, por medio de interacciones electrostáticas, a la membrana de los promastigotes, misma que se compone del polisacárido lipofosfoglicano aniónico (el cual cubre más del 60% de la membrana). Por otro lado, su tamaño y naturaleza anfipática les permite atravesar la membrana parasitaria sin dificultad, alterando la estabilidad de la misma o con la finalidad de unirse a dianas intracelulares [8].

En el caso de los amastigotes, no tienen una alta densidad de polisacáridos aniónicos, de hecho, su membrana se compone de polisacáridos sin carga fusionados con otros propios de las células hospederas [66]; en este caso, la anfipaticidad de los péptidos es la que rige la interacción con el blanco, por lo tanto es una característica que no se debe tomar en un segundo plano al momento de evaluar un posible nuevo candidato contra *Leishmania* spp., ya que se deben inhibir sus dos morfologías, siendo amastigote en cierto modo la de mayor importancia, dado que es la morfología patogénica.

A pesar de las marcadas ventajas de los AMPs sobre otros candidatos terapéuticos, también hay ciertas desventajas y limitantes para la realización de sus acciones biológicas. Algunas de estas desventajas son la baja biodisponibilidad tras la administración oral, limitado tiempo de vida *in vivo* debido a la acción de enzimas proteolíticas, baja capacidad de penetrar barreras biológicas y posible generación de reacciones inmunes [67]. Aunque nuevamente se debe resaltar el hecho que la síntesis química permite realizar

modificaciones puntuales haciendo que estas limitantes se reduzcan de manera significativa.

1.1.5. Fosfolipasas A₂ de venenos de serpiente como una fuente de AMPs contra *Leishmania*

Los venenos de serpientes son una de las fuentes biológicas más abundantes de proteínas y polipéptidos con propiedades farmacológicas de alto interés [68]. La extensa variedad de componentes de estas matrices biológicas las convierten en una biblioteca bioquímica de amplio espectro para el desarrollo de nuevos insumos farmacéuticos y de interés biotecnológico [69].

Los componentes de estos venenos tienen distintas funcionalidades para la serpiente, siendo las principales la inmovilización y digestión de sus presas; aunque generalmente se tiene la percepción de los efectos negativos o mortales que generan las toxinas de un veneno tras una mordedura de serpiente, lo cierto es que su estudio y comprensión ha representado, desde hace décadas, un gran avance en campos como la bioquímica, la medicina y la farmacéutica [70].

El estudio de los venenos de serpiente puede tener diferentes enfoques, tal como lo es la comprensión del mecanismo de acción de las toxinas sobre sus presas y por ende sus posibles vías de neutralización, estudio de procesos fisiológicos o el uso de las toxinas como modelos para el desarrollo de prototipos de interés farmacológico [70]; éste último vendría a ser el enfoque por el cual muchos científicos, en diversas áreas, han logrado diseñar nuevos agentes terapéuticos dirigidos a varias enfermedades humanas [71].

A partir de estas complejas matrices se han logrado desarrollar varios fármacos que actualmente se comercializan en todo el mundo. El Captopril, Eptifibatida y Enalapril son solo algunos ejemplos de fármacos aprobados y distribuidos que se desarrollaron a partir de las componentes de los venenos de serpientes que se utilizan como tratamiento para la hipertensión, trombosis y como compuestos anticoagulantes [72]. Esto se suma al importante número de compuestos que ahora están siendo evaluados en estudios clínicos y pre-clínicos, y a las otras diversas actividades relevantes como su acción antibacterial, antitumoral, antiviral y antiparasitaria.

De entre todas las moléculas bioactivas presentes en estos venenos, las que usualmente son las más abundantes son las enzimas fosfolipasas A₂ (PLA₂s); éstas son proteínas modificadoras de lípidos dependientes de Ca²⁺ que se encargan específicamente de la hidrólisis de fosfolípidos, aunque también se conoce que poseen actividades de importancia farmacológica independientes a su actividad catalítica [73]. Estas proteínas están ampliamente distribuidas en la naturaleza lo cual ha permitido que se clasifiquen en más de 15 grupos incluyendo algunos subgrupos [74].

La categoría A₂ se debe al sitio de escisión sn-2 en los glicerofosfolípidos que conforman las membranas, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos [75]. Dentro de las serpientes se destacan dos grupos de PLA₂ evolutivamente relacionados pero estructuralmente diferentes. El grupo IA perteneciente a la familia Elapidae, y el grupo IIA perteneciente a la familia Viperidae [76].

Dentro del grupo IIA existe una nueva subdivisión: las isoformas PLA₂ Aspartato 49 (PLA₂ Asp49) y PLA₂ Lisina 49 (PLA₂ Lys49), mismas que son catalíticamente activa e inactiva respectivamente [77]. La posición 49 pertenece al centro catalítico de la enzima, y un solo cambio en dicha posición hace que estas dos isoformas difieran en su actividad, haciendo que para las PLA₂ Lys49 no se de la unión de Ca²⁺, el cual es fundamental para desempeñar la actividad enzimática [78].

Las PLA₂ Lys49 han sido las proteínas de venenos de serpiente mayor estudiadas y mejor caracterizadas en cuanto a su actividad antibacterial; sin embargo esto no significa que la isoforma enzimáticamente activa no cumpla otros roles importantes además de su actividad catalítica; de hecho, lo hace, y es por esto que independientemente de la isoforma, estas proteínas pueden ser diversamente funcionales [79].

Las razones que pueden explicar la gran variedad funcional de las PLA₂s provenientes de venenos de serpientes son las interacciones fisicoquímicas que ciertas regiones de su composición pueden tener con los blancos terapéuticos. En el caso de las bacterias y otros organismos estructuralmente similares, como lo son *Leishmania* spp., parece ser que el extremo C-terminal de estas enzimas es la región responsable de la interacción y la posterior muerte del patógeno, dado el hecho que es rica en residuos de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos [73].

Dadas estas premisas, se puede inferir que péptidos que mimeticen la región C-terminal de PLA₂s pueden realizar la acción esperada contra los parásitos de interés. A continuación se presenta una recopilación bibliográfica de los estudios más importantes sobre el aislamiento y caracterización de péptidos a partir de proteínas PLA₂ presentes en los venenos de serpientes que hayan presentado actividad leishmanicida, así como algunas de sus principales observaciones y resultados.

1.1.6. Evidencias de la acción de PLA₂s de venenos de serpiente y péptidos derivados de sus secuencias contra *Leishmania* spp.

Actualmente, la investigación sobre la acción leishmanicida de proteínas PLA₂s derivadas de venenos de serpientes y péptidos que mimeticen regiones específicas de estas proteínas se ha diversificado en gran medida. Las similitudes en la composición de la membrana de bacterias y organismos *Leishmania* [80] han hecho que se realicen evaluaciones de dichas proteínas sobre estos parásitos, presentando resultados altamente favorables. La mayoría de autores se han enfocado en la neutralización de la forma infectiva del parásito, es decir, la forma promastigote; la morfología amastigote representa un importante desafío dada su localización dentro de células del sistema inmune del hospedador.

Los efectos que pueden poseer estas nuevas moléculas son diversos. Más allá de la inhibición celular y la reducción de la capacidad infectiva, varios de los péptidos caracterizados hasta la fecha pueden tener distintas finalidades y blancos celulares. Tal es el caso de la investigación realizada por Stábeli et al., [81], en el que se evalúa la acción de la fosfolipasa miotóxica MjTX-II aislada del veneno de *Bothrops moojeni* contra *Leishmania* spp., bacterias, hongos y células tumorales. En cada uno de los casos, esta molécula tuvo actividad altamente significativa.

El aislamiento de enzimas PLA₂s Lys49 ha logrado la obtención de resultados y observaciones de alta relevancia. La miotoxina II aislada del veneno de *B. asper* pertenece a este tipo de PLA₂; ésta posee una potente actividad antibacteriana *in vitro* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esta miotoxina presenta en su secuencia una cantidad importante de aminoácidos catiónicos que son los responsables de su unión a los lipopolisacáridos (LPS) de las membranas bacterianas. Los estudios realizados con la

miotoxina II revelaron por primera vez un mecanismo de acción contra agentes patógenos independiente a la habitual hidrólisis de fosfolípidos de estas enzimas [82].

La independencia catalítica también se ha observado en estudios específicos realizados con *Leishmania*. En el trabajo de Costa et al., [83], se aislaron dos PLA₂s miotóxicas del veneno de *Bothrops brazili*, mismas que fueron etiquetadas como MTX-I (PLA₂ Asp49) y MTX-II (PLA₂ Lys49). Se probó su actividad ante dos especies de *Leishmania* observando finalmente que ambas, independientemente de las diferencias en su actividad catalítica, produjeron efectos citotóxicos directos y significativos en los parásitos.

En el estudio de los autores de Moura et al., [84], se realizó la purificación y caracterización de tres miotoxinas aisladas del veneno de *Bothrops matogrossensis*; dos de ellas, catalogadas como BmatTX-I y BmatTX-II, las cuales son del tipo Lys49, mientras que BmatTX-III es del tipo Asp49. Se encontró una actividad significativa de las tres miotoxinas contra parásitos de *L. (L.) amazonensis*; se concluyó que probablemente la región C-terminal es la responsable de promover la perturbación en la membrana.

Pese a la diversidad estructural y funcional de las proteínas PLA₂s, no todas pueden presentar efectos esperados sobre los parásitos *Leishmania* dado su diferente metabolismo interespecie, tal como se evidencia en el estudio de Torres et al. [85], en el que la fracción PLA₂ del veneno de *Bothrops marajoensis* no presentó ninguna actividad inhibitoria contra *L. chagasi* y *L. (L.) amazonensis* en comparación al veneno crudo y a un fracción L-amino oxidasa (LAAO) que si presentaron actividad.

Uno de los casos más intrigantes de la acción de las PLA₂s sobre los parásitos en forma amastigote se dio en el estudio realizado por Barros et al. [86], en el que se determinó el efecto *in vitro* e *in vivo* de la PLA₂ aislada del veneno de *Crotalus durissus terrificus* y de una fracción peptídica derivada de esta enzima. Los experimentos *in vitro* indicaron una importante reducción de los promastigotes (mayor al 50%). Por otro lado, los análisis *in vivo* corroboraron los resultados obtenidos en el estudio de Passero et al. [87], en el cual se indica que esta enzima (aislada de la misma serpiente) es un factor de progresión de la leishmaniasis cutánea a concentraciones específicas. Los macrófagos de ratón sometidos a esta molécula presentaron elevados niveles de prostaglandina E₂, la cual es una mediadora de lípidos inflamatorios e inhibidora de la interleucina 2 (IL-2), misma que

tiene acción directa en la respuesta de los linfocitos Th1. La inhibición de IL-2 producida no permite la activación de los macrófagos. Ambos estudios llegaron a conclusiones similares. En el caso de Barros et al. (2015), las concentraciones más diluidas de PLA₂ que se utilizaron para tratar los macrófagos peritoneales infectados por amastigotes de *L. infantum chagasi* indujeron la proliferación parasitaria dentro de estas células, mientras que en dosis superiores a 50 µg/mL se pudo disminuir la infección hasta en un 27,3% [86].

Una aplicación novedosa que revela el potencial de las PLA₂s Asp49 derivadas de venenos de serpiente que tengan acción contra *Leishmania* es la creación de un posible sistema de vacunación, tal como se presenta en el trabajo de Podešvová et al. [88]. Esta propuesta se basa en inducir la expresión de una de estas toxinas, denominada como BnSP-7, que anteriormente ya había presentado acción leishmanicida [89]. Determinadas cepas de *Leishmania* fueron transformadas para expresar esta toxina más un desestabilizador que propicia la degradación de la misma. Si posteriormente se agrega un inhibidor de este desestabilizador, la toxina no será degradada y por lo tanto matará a los parásitos. Todo este sistema cumple las dos condiciones para conseguir una vacunación exitosa: tener parásitos vivos para que generen una respuesta inmune en el individuo, e inducir la muerte parasitaria para que no se generen lesiones graves.

Otra técnica que se ha desarrollado recientemente para la aproximación a nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis es la obtención de péptidos sintéticos a partir de las secuencias conocidas de venenos y toxinas previamente caracterizados. En este tipo de metodologías se analiza la probabilidad que tiene una región proteica de realizar la acción antiparasitaria esperada en base a los aminoácidos que la conforman. Lomonte, Angulo & Moreno [73] explican que los determinantes estructurales para la toxicidad de las enzimas PLA₂s se encuentra en su extremo C-terminal, el cual combina aminoácidos catiónicos y aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos. Por lo tanto, péptidos pequeños que mimeticen esta región pueden tener un efecto antiparasitario importante. De igual manera, ciertas modificaciones pueden potenciar estos efectos y disminuir la toxicidad hacia las células del hospedador.

Desde la implementación de este tipo de estudios se ha sintetizado un gran número de péptidos nuevos a partir de proteínas de serpientes, que cuentan con actividades antibacteriales, antifúngicas, antiparasitarias y antitumorales [73,90,91]; éstos

no han sido probados contra *Leishmania* spp., pero pueden ser posibles candidatos para futuros análisis o también pueden utilizarse como línea base para nuevas investigaciones. En contraste, el trabajo de Mendes et al. (2019), es uno de los más recientes e importantes en esta área, ya que en él se realiza la síntesis química de péptidos derivados de PLA₂s de venenos de serpiente, mismos que presentaron resultados de inhibición de dos cepas de *L. amazonensis* y una de *L. infantum*, tanto en la morfología promastigote como amastigote.

Las evidentes propiedades biológicas de los AMPs y los esfuerzos de ciertos grupos de investigación que han realizado la mayoría de trabajos sobre estas moléculas no deben quedar como simples datos académicos, más bien todo esto se debe enfocar en perspectivas a futuro en donde los resultados obtenidos se complementen con la tecnología y los avances industriales.

De hecho, un término muy importante en este ámbito es el “reciclaje de péptidos” el cual se basa en la utilización de péptidos, que no tuvieron resultados significativos para un determinado blanco celular, sobre otros blancos patogénicos. Recientemente, algunos trabajos han evidenciado que péptidos antibacteriales o antitumorales, además de su eficiencia sobre estas células, pueden ser multifuncionales y en algunas situaciones, incluso más eficientes en contra de parásitos causantes de enfermedades tropicales [81,83,84]. Es en esta línea que se puede mencionar que el grupo de investigación sobre venenos de serpientes de la Universidad Regional Amazónica Ikiám ha sintetizado tres péptidos derivados de PLA₂s Asp49 de venenos de serpientes, denominados como Cergo, BmTxJ y Bmje, los cuales poseen una moderada acción antibacterial y antitumoral [92]. La evaluación de estas moléculas sobre otros organismos celulares patogénicos, como es el caso de *Leishmania* spp., puede presentar resultados prometedores y ampliar el conocimiento de sus potenciales terapéuticos.

Previamente, los péptidos Cergo, BmTxJ y Bmje fueron evaluados, a escala *in vitro*, sobre tres líneas celulares cancerígenas, las cuales fueron: MCF-7 (cáncer de mama), CACO-II (cáncer de colon) y HepG2 (cáncer de hígado). Los resultados de estas evaluaciones mostraron que la línea MCF-7 fue la más susceptible al tratamiento peptídico, siendo el péptido Bmje el que generó una mayor reducción de la viabilidad de esta línea celular.

En contra parte, la evaluación del potencial inhibitorio de los péptidos sobre dos organismos bacterianos (*E. coli* y *S. aureus*) y un organismo fúngico (*C. albicans*) demostró que Cergo fue la molécula que generó reducción de la viabilidad de los tres microorganismos, obteniendo valores de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de 75 μM para *E. coli* y 150 μM para *S. aureus* y *C. albicans*. El péptido BmTxJ por su parte, redujo la viabilidad de *S. aureus*, con un MIC de 37,5 μM .

La actividad antibacterial, anti-cancerígena y ausencia de hemólisis demostradas experimentalmente en el trabajo de Peña et al. [92], dan lugar a una alta expectativa de que estos péptidos también posean actividad anti-*Leishmania*, en sus dos morfologías. De ser así, estas moléculas representarían una importante alternativa para el desarrollo de nuevos productos farmacológicos con acción leishmanicida.

El enfoque de reaprovechamiento peptídico puede favorecer la obtención de productos nuevos que serán de suma importancia para una de las principales demandas de la sociedad, la cual es una adecuada atención médica [90]. Este aspecto es mucho más importante cuando se trata de una enfermedad desatendida y progresiva como la leishmaniasis.

1.2. Planteamiento del problema

En Ecuador, la leishmaniasis es una enfermedad desatendida y de manifestaciones clínicas variables, cuya prevalencia y dispersión han incrementado en los últimos años, siendo los valles interandinos de la provincia de Pichincha la región con el mayor número de casos reportados, seguido de la provincia de Morona Santiago en la región amazónica (**Figura 2**).

De acuerdo al MSP, durante el período de 2002 al 2012 se han registrado un promedio de 1,537 casos anuales y una tasa de incidencia que se encuentra en un rango de 6,14 a 19,15 por 100 mil habitantes [14]. La tasa de incidencia aumentó en el año 2017 de acuerdo a los reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), siendo de 22,6 por 100 mil habitantes [93].

Este hecho se atribuye a la alteración del equilibrio ecológico provocado por el aumento de actividades humanas, como la minería y deforestación, en localidades donde

prevalecen los vectores de transmisión, y a la adaptación de dichos vectores a los ambientes urbanos.

Pese a que entidades públicas y gubernamentales han puesto en marcha planes con gran impacto social, como el Proyecto de vigilancia y control de vectores para la prevención de la transmisión de enfermedades metaxénicas en Ecuador [14], el cual tiene como principales objetivos: disminuir la transmisión de la enfermedad mediante una socialización que promueva hábitos de higiene y mantenimiento de condiciones salubres en los hogares para el control del vector, y realizar un rápido diagnóstico para el inicio de un tratamiento óptimo [13], lo cierto es que la poca efectividad de los medicamentos actuales incrementa el riesgo de adquisición de resistencia por parte de los parásitos, lo cual posteriormente deriva en complicaciones médicas que incluso pueden tornarse mortales.

Además, estos fármacos presentan otras desventajas relevantes como su alto costo y largos períodos de tiempo que requieren para completar el tratamiento. La Amazonía ecuatoriana es una de las regiones mayormente afectadas por la leishmaniasis cutánea y mucocutánea; pese a que para el año 2018 hubo una reducción del 54% en la tasa de incidencia en comparación al 2017 [94], y que por ende, los valores de riesgo de transmisión actuales no son alarmantes, la aún presente dispersión de la enfermedad, el deficiente registro de casos a nivel de especies, y la poca eficiencia en los tratamientos se da en casi toda la región. Este aspecto, ligado a los problemas ya mencionados de los fármacos convencionales incrementa el riesgo de un aumento en los índices de riesgo para años futuros, generando así un problema de mayor complejidad que requiere urgentemente de una alternativa eficiente.

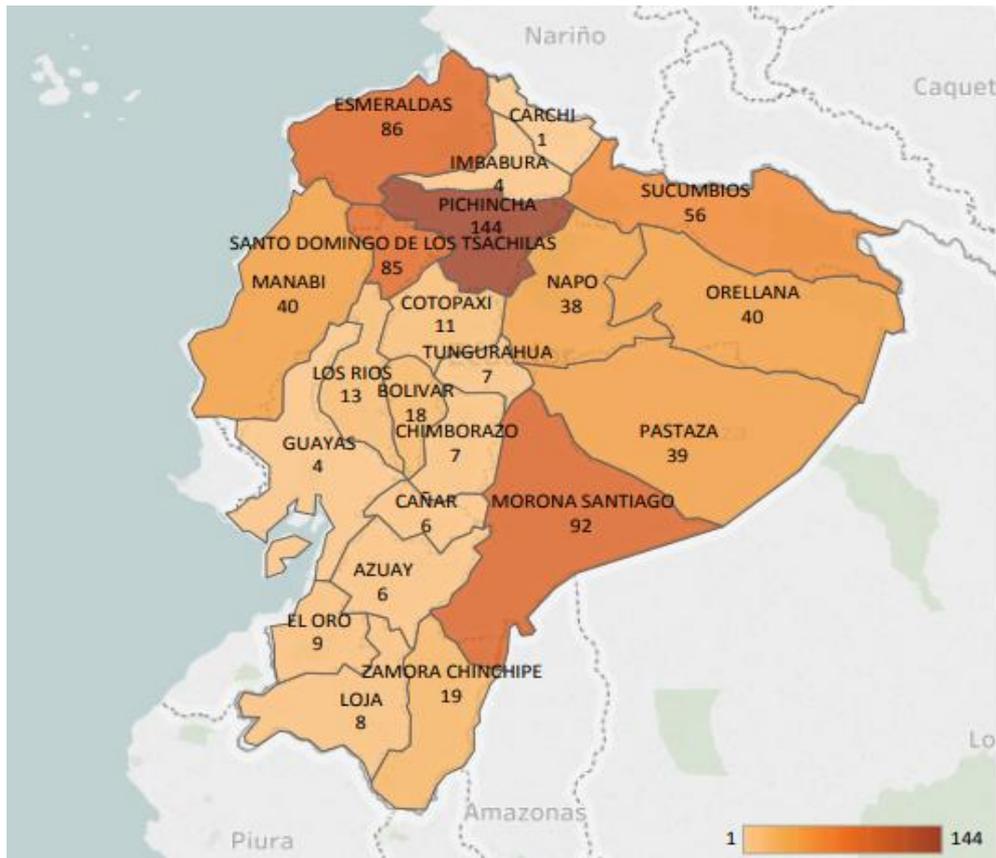


Figura 2. Ocurrencia de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador en el año 2019. Las principales provincias afectadas por esta enfermedad en Ecuador se ubican en Costa, Sierra y Amazonia. Napo tiene un número significativo de infectados como se evidencia en la gráfica [13].

1.3. Justificación de la investigación

La investigación sobre posibles moléculas bioactivas con acción leishmanicida, que representen una mejor alternativa a los medicamentos convencionales tanto en acción biológica como en citotoxicidad sobre las células del hospedador, no ha sido intensamente explorado en el país. Esto representa un escenario actual poco alentador, pero a la vez es una oportunidad para la elaboración de estudios sobre nuevas moléculas con potencial anti-*Leishmania*, en los cuales los resultados obtenidos sean utilizados como una línea base para el futuro desarrollo de nuevos insumos terapéuticos.

Recientemente, nuestro grupo de investigación identificó tres moléculas peptídicas derivadas de fosfolipasas A₂ Asp49 con moderada actividad antitumoral y antibacteriana. Estas moléculas no demostraron efecto hemolítico en las concentraciones evaluadas. El reposicionamiento o reciclaje de péptidos surge como una oportunidad valiosa para enfrentar los efectos de las enfermedades parasitarias tropicales. En este contexto, estas moléculas, previamente caracterizadas, representan una ventana para

profundizar y entender mejor la aplicabilidad de los péptidos derivados de toxinas de venenos de serpientes.

La creciente necesidad de que Ecuador deje de ser un país productor de materias primas se ha plasmado en los últimos años; por lo tanto, esta investigación se puede convertir en un producto de alto valor para aportar en el desarrollo científico y tecnológico del país. La generación de nuevos conocimientos y difusión de éstos a través de los medios adecuados puede potenciar dicho desarrollo, lo cual es necesario y muy importante en el constante avance por encontrar solución a una problemática no solo del Ecuador, sino también del resto del mundo.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

- Evaluar el potencial leishmanicida de tres péptidos derivados de PLA₂s Asp49 de venenos de serpientes, que han presentado moderada acción antibacterial y antitumoral, con la finalidad de ampliar el conocimiento acerca de sus aplicaciones terapéuticas.

1.4.2. Objetivos específicos

- Realizar un análisis *in silico* de las características físico-químicas y homología con otros péptidos con actividad leishmanicida derivados de PLA₂s Asp49.
- Analizar *in silico* la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos Cergo, BmTxJ y Bmje.
- Sintetizar los tres péptidos seleccionados por medio de la metodología SPPS.
- Determinar las concentraciones inhibitorias de los péptidos contra promastigotes y amastigotes intracelulares, de dos cepas de las especies *L. amazonensis* y *L. braziliensis*.
- Determinar la citotoxicidad de los péptidos hacia macrófagos primarios.
- Evaluar la actividad membranolítica de los péptidos.

2. CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO.

2.1. Análisis bioinformático de los péptidos

Para esta etapa del trabajo se seleccionaron tres péptidos derivados de la región C-terminal de PLA₂s Asp49 de venenos de serpientes, identificadas como Q6EER5 (PA2B_CERGO), POC8M1 (PA2B1_BOTMO) y P86803 (PA2B1_BOTMA) en la base de datos Uniprot (<https://ebi14.uniprot.org/>), que fueron previamente evaluados contra cáncer y bacterias por nuestro grupo de investigación (ver **Tabla 1**). Las características físico-químicas de los tres péptidos, tales como: masa, punto isoeléctrico (pI), carga, hidrofobicidad, entre otras, fueron predichas empleando el paquete 'Peptides', de los autores Osorio et al. [95], del programa estadístico R Studio [96]. Por otro lado, se utilizaron las distintas herramientas bioinformáticas encontradas en el servidor 'IEDB Analysis Resource' (<http://tools.iedb.org/main/>), para determinar si las secuencias de los péptidos seleccionados corresponden a epítopos inmunes para la activación de células de defensa. Específicamente se usaron: Predicción de epítopos de anticuerpos (Linfocitos B), Inmunogenicidad de Clase I, Predicción de inmunogenicidad de células T CD4+ y Unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-II). Finalmente, se utilizó la herramienta CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para realizar un análisis múltiple de secuencias entre los tres péptidos seleccionados, y péptidos con acción leishmanicida, derivados de diferentes PLA₂s reportados en bibliografía.

Tabla 1. Códigos de PLA₂s precursoras y características físico-químicas generales de los péptidos seleccionados. Los péptidos poseen actividad antitumoral y antibacteriana moderada.

Características	Péptidos		
	Código Uniprot PLA ₂	Q6EER5 PA2B_CERGO)	POC8M1 (PA2B1_BOTMO)
Nombre	Cergo	BmTxJ	Bmje
Secuencia	NLRTYKKRYMFY- NH₂	YNKKYMKHLKPCKK A-NH₂	YNKKYRYHLKSCCKADK -NH₂
Porcentaje de aa catiónicos y aromáticos (%)	Catiónicos (33%) Aromáticos (33%)	Catiónicos (46,6%) Aromáticos (20%)	Catiónicos (47%) Aromáticos (23,5%)
Masa teórica (Da)	1680,8896	1878,0453	2171,1751

2.2. Síntesis, caracterización y pureza de los péptidos

2.2.1. Síntesis en fase sólida

Los tres péptidos seleccionados se sintetizaron de manera individual mediante la técnica Fmoc. Ésta se realizó con el equipo CEM Liberty Blue™ 1, el cual permite la síntesis peptídica automática asistida por microondas en sentido C-terminal a N-terminal, mediante ciclos de acoplamiento y desprotección. Para iniciar, se pesó una cantidad de 0.192 g de la resina Rink Amide Norabiochem (100-200 mesh), la cual tiene un valor de 0.52 de granulación y fue utilizada como soporte para la construcción de la cadena polipeptídica. El disolvente utilizado para la síntesis fue N, N'-dimetilformamida. Los grupos protectores Fmoc de cada aminoácido fueron retirados con piperidina. Una vez terminada la polimerización, se realizó la escisión del péptido de la resina y la eliminación de grupos protectores permanentes (grupos protectores de las cadenas laterales reactivas de los residuos de aminoácidos) mediante una solución ácida compuesta de 95% de TFA, 2.5% de triisopropilsilano (TIS) y 2.5% de H₂O a temperatura ambiente. Los péptidos obtenidos de este proceso fueron precipitados con éter frío y posteriormente liofilizados en el equipo BenchTop Pro con Omnitronics de 9 litros, para su almacenamiento a 4 °C.

2.2.2. Caracterización

La masa/carga de los péptidos sintetizados se confirmó mediante espectrometría de masas empleando el equipo MALDI-TOF MS de la marca Shimadzu, modelo iD Plus Axima Confidence. Para esto se pesó 0,1 mg del péptido crudo y se disolvió en 10 µL de agua destilada. Posteriormente se cargó 1 µL de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico CHCA) y se adicionó 2 µL de la muestra del péptido en el pocillo de la placa y se dejó secar completamente. Seguidamente, se introdujo la placa en el equipo, tal como se ejemplifica en la **Figura 3**. El análisis fue configurado para realizarse mediante el método Reflectron con un poder de 40, el cual permite realizar dos disparos del láser por cada perfil, obteniendo un total de 500 perfiles por muestra. La relación m/z de cada péptido fue determinada.

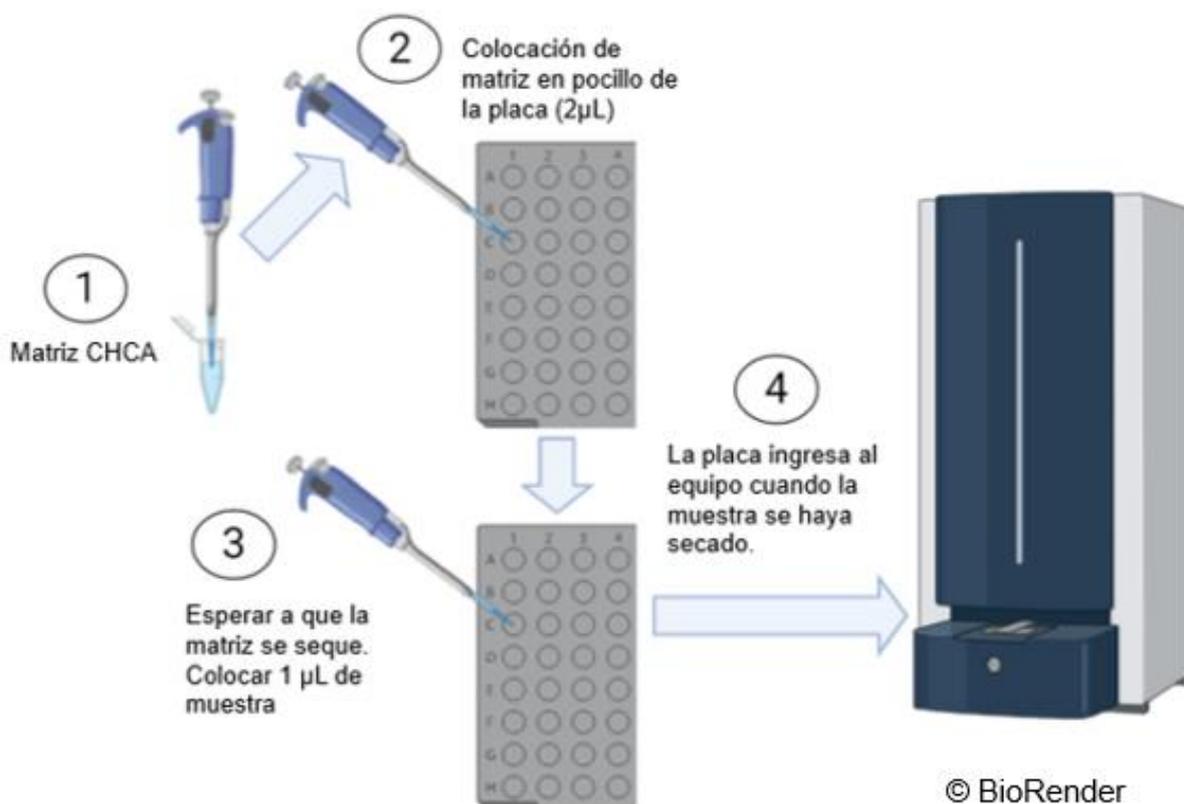


Figura 3. Método de introducción de los péptidos evaluados en el equipo MALDI-TOF MS. Es importante destacar que dependiendo del tipo de análisis se puede optar por usar otra matriz, y por lo tanto los volúmenes utilizados pueden variar. Figura creada en BioRender.com.

2.2.3. Determinación de la pureza

La pureza de cada péptido después de la síntesis fue determinada mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC, siglas en inglés), utilizando un equipo HPLC de la marca Waters, modelo Breeze QS de inyección automática. Para esta etapa se utilizó una columna C-18 preparativa de la marca Waters (10 mm x 250 mm; 0,5 µm de tamaño de partícula de la resina) específica para péptidos. Se realizó un análisis cromatográfico en gradiente (**Tabla 2**) utilizando como fases móviles: A = H₂O / Ácido fórmico (0,1%) y B = Acetonitrilo (ACN) / Ácido fórmico (0,1%). 0,5 mg de los péptidos crudos fueron disueltos en H₂O / Ácido acético glacial (1%). Se inyectaron 500 µL de la solución peptídica y la separación cromatográfica tuvo una duración de 1 hora con un flujo de 1 mL/min. El detector UV-Vis con el que cuenta el cromatógrafo se configuró para una longitud de onda (λ) de 220 nm. En los casos en los que se obtuvieron porcentajes de pureza inferiores al 90%, los péptidos fueron sometidos a purificación por cromatografía de baja

presión utilizando un cromatógrafo Flash de la marca BUCHI, modelo Sepacore X10, al cual se acoplo una columna C-18 (40 μm de 4g) de la misma marca. Las fases móviles utilizadas fueron las mismas que en el proceso de RP-HPLC. 10 mg del péptido liofilizado fueron pesados y disueltos en 1 mL de una solución H_2O / ácido acético glacial (1%). El volumen de inyección fue de 1 mL, con un flujo de 2,5 mL/min; el tiempo total del desarrollo cromatográfico fue de 30 minutos. Una vez finalizada esta etapa, las fracciones recolectadas fueron nuevamente sometidas al mismo proceso de determinación de pureza por RP-HPLC, y a la metodología de caracterización descrita en el punto 2.2.2., aseverando la presencia y alto grado de pureza peptídicas.

Tabla 2. Gradiente utilizado para la determinación de la pureza de los péptidos sintetizados, utilizando RP-HPLC. La separación cromatográfica tuvo una duración de 1 hora, y el detector UV-Vis fue configurado a una $\lambda=220\text{nm}$.

Tiempo (min)	%A	%B
0-20	95	5
20-30	0	100
30-40	0	100
40-50	95	5
50-60	95	5

2.2.4. Liofilización y almacenamiento

Después de asegurar la presencia y alta pureza de los péptidos, se procedió a su liofilización para su correcto almacenamiento. Los péptidos se colocaron en tubos Falcon de 50 mL; en todos se aforó el volumen hasta 15 mL utilizando agua destilada. Posteriormente, los tubos se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas para después introducirlos en nitrógeno líquido por media hora. Los tubos se taparon con parafilm y fueron colocados en el liofilizador, de la marca BenchTop Pro con Omnitronics de 9 litros, a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a una presión de 9 mTorr; los péptidos fueron dejados en el equipo por 5 días. Posteriormente, el producto liofilizado se colocó en un desecador al vacío con esferas de sílica para evitar la captación de humedad.

2.3. Evaluación del potencial leishmanicida de los péptidos sintetizados

2.3.1. Cultivo de *Leishmania* spp.

Se obtuvieron promastigotes de cepas de las especies *L. (L.) amazonensis* (MHOM / BR / 1973 / M2269) y *L. (V.) braziliensis* (MHOM / BR / 75/2903), a partir de LEBIL-UNICAMP (Laboratorio de Estudios de Biología de la Infección por *Leishmania*). Estas células se cultivaron en medio M199 (Sigma Aldrich), suplementado con diferentes componentes según el tipo de parásito. Para ambas especies, el medio se complementó con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, adenina 10 mM, L-glutamina 5 mM, penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). La única diferencia entre estos cultivos fue que *L. (V.) braziliensis* requirió de 2% de orina estéril masculina humana, mientras que *L. (L.) amazonensis* no necesitó de este suplemento [73].

2.3.2. Ratones

Se obtuvieron ratones Balb/C hembra de 4 a 8 semanas de edad mediante CEMIB-UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigación Biológica). Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en el LEBIL-UNICAMP, los cuales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas – UNICAMP (Brasil).

2.3.3. Inhibición de promastigotes

Se incubaron 5×10^6 promastigotes metacíclicos/mL de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en placas de 96 pocillos empleando Medio 199. La evaluación del potencial anti-*Leishmania* se realizó mediante ensayos con concentraciones crecientes de los péptidos (0-200 µM) durante 24 horas a 26 °C. Los grupos utilizados como control negativo estuvieron determinados por pocillos de la placa que solo contaban con los parásitos más el medio. La viabilidad parasitaria se cuantificó con el ensayo colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). El MTT es un compuesto químico fotosensible de color amarillo, el cual puede ser transformado a formazán (color violeta) a partir de las mitocondrias de células vivas (**Figura 4**). Al darse el cambio de color, el porcentaje de viabilidad celular puede ser cuantificado mediante la medición de la intensidad de color a una determinada

longitud de onda (λ). En este caso se usó una $\lambda = 600\text{nm}$, y la medición fue realizada en un lector de placas de la marca Labsystems, modelo Multiskan EX. Cuando se agrega el MTT a los pocillos de la placa, se debe realizar una incubación de 3 horas antes de realizar la lectura. Posteriormente se agregó Dodecil sulfato de sodio (SDS), para lisar las células. La concentración efectiva para llegar al 50% de inhibición (EC_{50}) se calculó con el paquete estadístico del programa GraphPad Prism 8 [97]. Todos los experimentos se realizaron en triplicado, expresando los resultados como la media \pm desviación estándar.

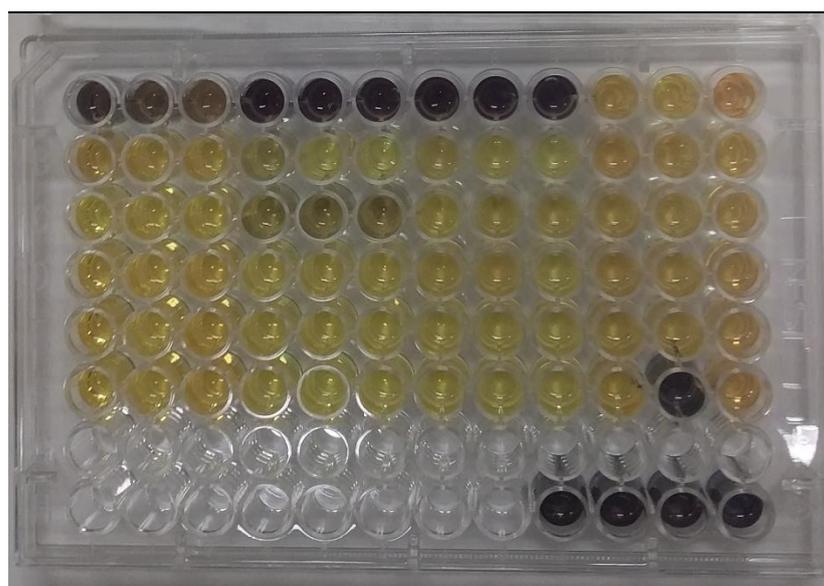


Figura 4. Representación del ensayo de viabilidad celular MTT realizado con los péptidos sintéticos. Los pocillos de la placa de color amarillo no tuvieron células vivas (los péptidos generaron inhibición celular), por ende el MTT no fue metabolizado. Los pocillos oscuros (violeta) indican presencia de células vivas con mitocondrias activas, es decir, no hubo actividad peptídica, y por lo tanto, se da la formación de formazán.

2.3.4. Obtención de macrófagos primarios

Para esta etapa se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de tibia y fémur de ratones Balb/C basado en la metodología de Real et al., [5]. Los animales fueron eutanizados para posteriormente, de manera muy cuidadosa, extraer los huesos antes mencionados bajo apropiadas condiciones asépticas. El contenido de estos huesos se lavó con una jeringa con 5 mL de medio R2020, el cual permite que los monocitos extraídos se diferencien en macrófagos. El medio R2020 contiene: medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich), 20% de FBS y 20% de sobrenadante de cultivo de fibroblastos L929. El lavado se realizó en una placa de Petri que contenía penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Después de este proceso se añadieron otros 10 mL de medio R2020. Los lavados

de tibia y fémur se realizaron en placas separadas, incluso si provenían del mismo ratón. Las placas se incubaron durante 7 días a 37 °C con 5% de CO₂. Al cuarto día de incubación se añadieron otros 10 mL de medio R2020.

2.3.5. Determinación de la citotoxicidad de los péptidos hacia macrófagos primarios

Una cantidad de 5×10^5 macrófagos/mL se colocaron en placas de 96 pocillos y se incubaron por 3 horas, con 5% de CO₂, a 37 °C. Posteriormente se añadieron concentraciones crecientes de los péptidos para nuevamente incubar por 24 horas bajo las mismas condiciones. Se utilizó el ensayo colorimétrico de viabilidad celular MTT. La determinación de los valores de citotoxicidad celular del 50% (CC₅₀) se realizó con el paquete estadístico del programa GraphPad Prism 8. Todos los experimentos se realizaron en triplicado, expresando los resultados como la media \pm desviación estándar.

2.3.6. Efecto de los péptidos sobre la progresión infectiva de *Leishmania* spp.

La metodología que se realizó en esta etapa se basa en la presentada por Parra et al., [98]. Los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones hembra Balb/C fueron infectados en una relación 10:1 (parásito: macrófago) y posteriormente incubados en medio R2020 por 24 horas a 34 °C con 5% de CO₂. Los promastigotes que no lograron ingresar en el macrófago fueron retirados mediante un lavado con PBS 1X. Se cambió el medio de cultivo y se añadió concentraciones crecientes de los péptidos para nuevamente incubar durante 24 horas bajo las mismas condiciones. Los macrófagos fueron fijados en un porta objetos y se les sometió a una tinción con Instant Prov kit (Newprov, Pinhais, Brasil). Utilizando el Sistema de microscopio Leica LAS Core, se contaron los amastigotes diferenciados mediante el conteo de 300 macrófagos infectados en triplicado. El índice de infección se expresó como porcentaje del grupo control (grupo no tratado con los péptidos).

2.3.7. Análisis del efecto de los péptidos sobre las membranas parasitarias

La permeabilidad de las membranas parasitarias se determinó usando el agente intercalante de ADN, Bromuro de Etidio (BE). Los ensayos se realizaron en base a la metodología descrita por Mendes et al., [99]. Los promastigotes de *L. (L.) amazonensis* M2269 y BMDMs se centrifugaron a 1500 x g por 10 min, luego se lavaron con una solución buffer compuesta por cloruro de potasio (KCl) 11 mM, cloruro de sodio (NaCl) 140 mM y Tris-HCl 75 mM, a pH 7,6. A esta solución se agregó glucosa (10 mM) y los parásitos se re suspendieron en una cubeta (10^7 células/mL). Cada péptido, en la concentración EC_{50} determinada, se añadió a las cubetas más BE a 10 μ M. La fluorescencia producida por el BE que ingresó en las células y expresada en función del tiempo como unidades de fluorescencia (UF), fue utilizada para analizar la permeabilización de las membranas parasitarias. La medición de este parámetro se realizó con un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2500 a 37 °C: (excitación = 590 nm, emisión = 560 nm). El control positivo utilizado para determinar el valor máximo de permeabilidad fue el detergente digitonina (100 mM),

2.4. Análisis estadísticos

Los resultados fueron comparados y analizados mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) con la posterior realización de la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey, usando el paquete estadístico del programa GraphPad Prism 8. Una significancia de $p < 0.05$ se consideró como significativa [97].

3. CAPÍTULO III. PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.

3.1. Análisis *in silico* de las características de los péptidos

Los tres péptidos seleccionados para este estudio se caracterizan por su naturaleza catiónica e hidrofóbica, altos puntos isoeléctricos y carga, siendo Cergo el péptido más corto (menor longitud), menos cargas positivas y menor momento hidrofóbico. La **Tabla 3** resume las principales características físico-químicas de estas moléculas, las cuales fueron obtenidas mediante el paquete 'Peptides' de R Studio. Adicionalmente, estos péptidos son amidados en los extremos C-terminal en virtud de la resina Rink Amide Norabiochem utilizada en la síntesis automática.

Tabla 3. Características físico-químicas de los péptidos investigados. Los valores de cada propiedad fueron obtenidas mediante 'Peptides' de R Studio.

Propiedades	Péptidos		
	Cergo	BmTxJ	Bmje
Longitud (aa)	12	15	17
Punto isoeléctrico (pI)	10,57	10,64	10,46
Carga teórica	+5	+7	+7
Índice de momento hidrofóbico	0,28	0,46	0,54
Índice hidrofóbico	-1,37	-1,62	-2,04
Índice alifático	32,50	32,66	28,82
Índice de Boman	3,36	2,30	3,76

Posteriormente, se realizó la determinación *in silico* de la actividad de los péptidos sintetizados como epítopos, ya sea para la activación de linfocitos T o B utilizando las herramientas bioinformáticas del servidor 'IEDB Analysis Resource'. La **Tabla 4** muestra los valores de las predicciones realizadas para la inmunogenicidad de Clase I y la de Linfocitos T CD4+. La primera predicción generó valores negativos para los tres péptidos, lo cual indica que ninguno puede propiciar una respuesta de este tipo.

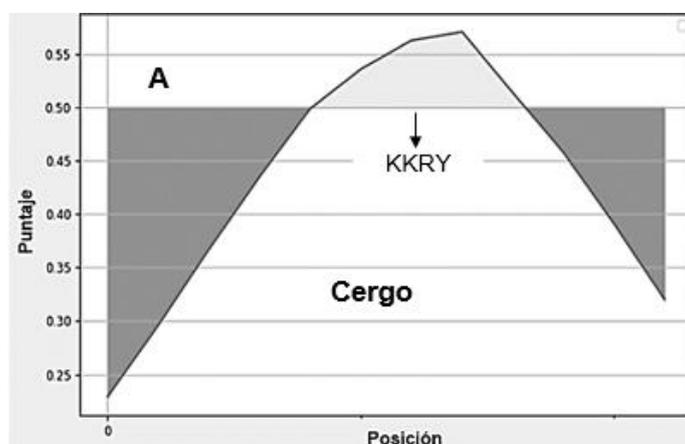
Por otro lado, la inmunogenicidad de células T CD4+ mostró que, para el caso de Cergo no se pudo realizar la predicción debido a su corta longitud (<15 aa), y en el caso de

Bmje no se encontró ningún tipo de inmunogenicidad probable. Sin embargo, para el péptido BmTxJ si se encontró un valor de inmunogenicidad, el cual fue de 61.1187, y que corresponde a la región ubicada desde la posición 6 hasta 14 en la secuencia. Dicho valor representa una inmunogenicidad probable muy baja, ya que de acuerdo al funcionamiento de esta herramienta, los valores más cercanos a cero indican una probable acción inmune elevada.

Tabla 4. Predicciones sobre la activación de Linfocitos T por parte de los tres péptidos sintetizados. Estos resultados se obtuvieron mediante las herramientas del servidor IEDB, e indican que los péptidos no son activadores de estas células de defensa

Propiedades predichas	Péptidos		
	Cergo	BmTxJ	Bmje
Inmunogenicidad Clase I	-0,40062	-1,23045	-1,01372
Inmunogenicidad células T CD4+	No hay predicción (longitud muy corta)	61,1187 (MKHLKPKKK)	No hay predicción

El análisis de la actividad de los péptidos como epítomos activadores de Linfocitos B se muestra en la **Figura 5**, la cual indica que las regiones que superan la asíntota horizontal ubicada en $Y = 0.5$, poseen una determinada probabilidad de efectuar este tipo de respuesta. Las secuencias de las regiones con probable actividad dentro de los péptidos son: KKRY (Cergo), YMKHLKP (BmTxJ) y YRYHLK (Bmje). Sin embargo, pese a que los tres poseen regiones probables, ninguna de éstas es muy alta.



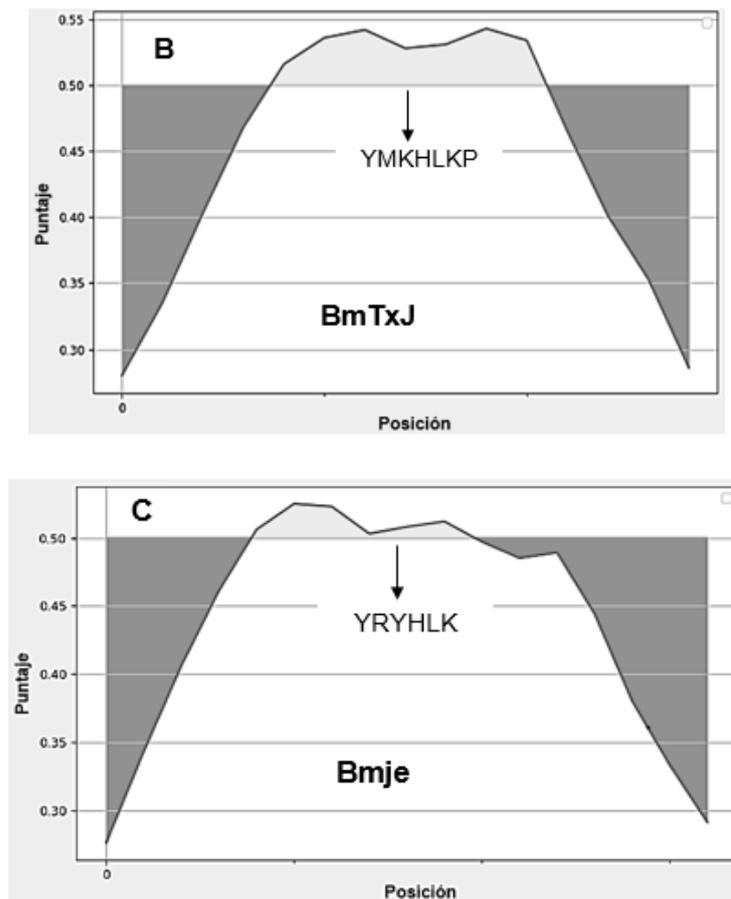


Figura 5. Predicción de la actividad de los péptidos como epítopos activadores de Linfocitos B. Las regiones de las gráficas que superan el valor $Y = 0.5$ representan las regiones con probable actividad dentro del péptido.

Además de estos resultados, también se realizó la predicción de la capacidad de los péptidos para unirse al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II (MHC-II), el cual es una molécula presente en las células presentadoras de antígenos. De acuerdo a las características de la herramienta utilizada, el rango percentil representa la comparación entre la puntuación del péptido en cuestión con cinco millones de péptidos aleatorios obtenidos de la base de datos SWISSPROT. Un valor muy pequeño de rango percentil significa una alta afinidad del péptido con el MHC-II, y por lo tanto, esto significaría la generación de una posible reacción inmunogénica.

En la **Tabla 5** se detallan los valores más bajos de rango percentil encontrados en la predicción realizada y con cuál alelo del MHC-II, en humanos, existe la probable afinidad. En la predicción obviamente se obtuvo un valor para cada uno de los alelos de esta molécula; sin embargo, se optó por presentar aquellos que poseen los valores que indican mayor afinidad.

Tabla 5. Predicciones de la afinidad peptídica por distintos componentes del MHC-II. Estos análisis fueron realizados por las herramientas del servidor IEDB. Los valores de rango percentil más bajos indican una alta afinidad por los alelos establecidos.

Péptidos	Alelos usados para predicción	Rango percentil
Cergo	HLA-DBR1	4,60
BmTxJ	HLA-DBR5	1,70
Bmje	HLA-DBR5	3,00

Por último, después de haber seleccionado las secuencias, determinado sus principales características físico-químicas y su posible acción inmunogénica, se procedió a realizar un análisis múltiple de secuencias con la herramienta CLUSTAL Omega; los tres péptidos fueron comparados con secuencias de péptidos cortos derivados de PLA₂s de venenos de serpientes, cuya acción leishmanicida ya ha sido experimentalmente comprobada (Tabla 6). En estas moléculas se puede apreciar una alta densidad de aminoácidos catiónicos e hidrófobos, representados en rosa y rojo respectivamente.

Tabla 6. Análisis múltiple de secuencias de los 3 péptidos sintéticos. Las estructuras primarias fueron comparadas con otras secuencias peptídicas con acción leishmanicida reportadas en bibliografía, mediante la herramienta CLUSTAL Omega. Los aminoácidos catiónicos (rosa) e hidrófobos (rojo) componen gran parte de las secuencias. Los péptidos sintetizados están resaltados en rojo.

Péptidos	Secuencias	Isoforma de PLA ₂	Serpiente precursora	Referencia
Cergo	NLRTYKKRYMFY-----	Asp49	<i>Cerrophidion godmani</i>	Presente trabajo
p-AclR7	-----RRYRAYFRFCRR--	Lys49	<i>Agkistrodon contortrix</i>	[99]
p-Acl	-----KKYKAYFKFKCKK--	Lys49	<i>laticinctus</i>	
pepMTX-I	-----RKYMAYLRVLCCK--	Asp49	<i>Bothrops</i>	[83]
pepMTX-II	-----KKYRYHLKPLCKK--	Lys49	<i>brazili</i>	
BmTxJ	----YNKKYMKHLKPKCKA--	Asp49	<i>Bothrops moojeni</i>	Presente trabajo
Bmje	----YNKKYRYHLKSCCKADK	Asp49	<i>Bothrops marajoensis</i>	Presente trabajo

3.2. Síntesis, identificación y pureza de péptidos

La síntesis peptídica automática generó masas por encima de los 100 mg para los tres péptidos. El rendimiento de síntesis para cada péptido fue de 44,42% (Cergo), 45,01% (BmTxJ) y 43,98% (Bmje).

Los análisis cualitativos de identificación de la presencia de los péptidos post síntesis se realizaron mediante el uso del equipo MALDI-TOF, mientras que la determinación cuantitativa de la pureza se realizó por RP-HPLC. En la **Tabla 7** se detallan los valores obtenidos por estas técnicas analíticas. De manera general, los resultados de la espectrometría de masas indican la presencia de los péptidos, con picos de masa/carga que corroboran con las masas teóricas previamente calculadas por herramientas bioinformáticas. Adicionalmente, los cromatogramas obtenidos señalan una ausencia de componentes no requeridos y valores porcentuales de pureza altos (calculados en base a los picos del cromatograma), los cuales son parámetros esenciales para la realización de ensayos biológicos.

Tabla 7. Identificación monoisotópica y caracterización de la homogeneidad de los péptidos sintetizados. Los péptidos fueron sometidos a análisis por RP-HPLC para determinar su grado de pureza, y por MALDI-TOF MS para su identificación post síntesis.

Péptidos	MALDI-TOF MS	RP-HPLC	
	Masa monoisotópica (Da)	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de pureza (%)
Cergo	1681,07	13,5	90,05%
BmTxJ	1878,85	7,98	100%
Bmje	2173,28	10	97,17%

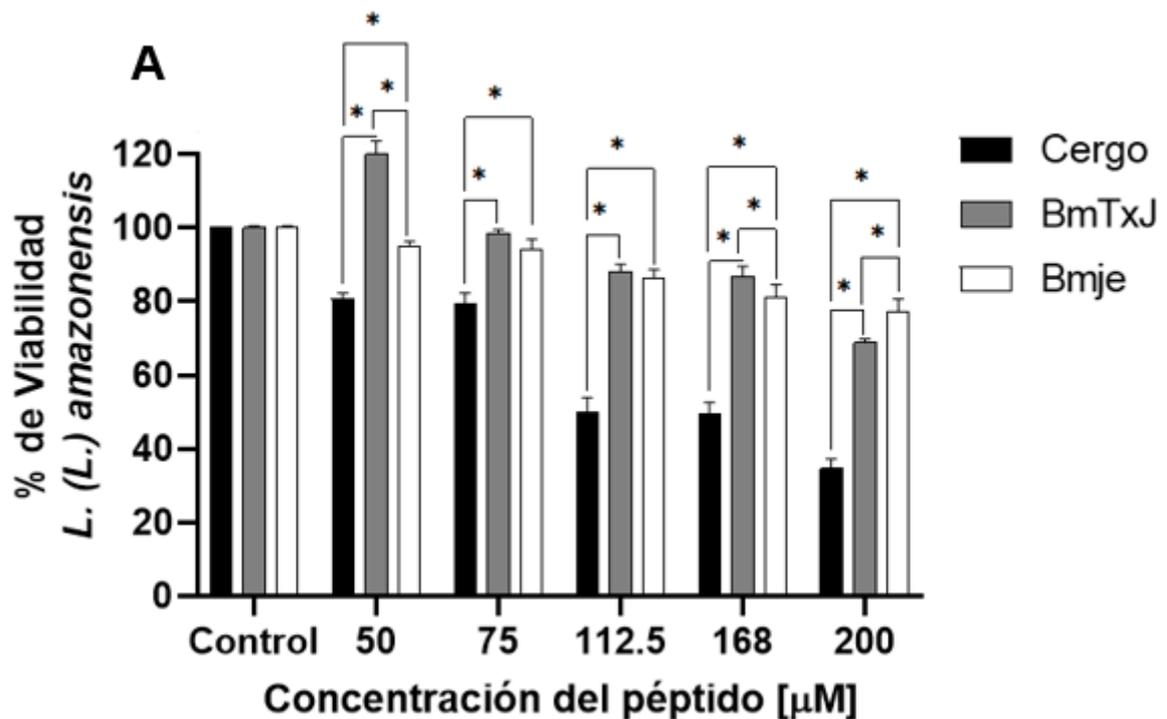
3.3. Ensayos biológicos

3.3.1. Efecto de los péptidos sintéticos sobre la morfología promastigote metacíclica

La actividad inhibitoria de los tres péptidos sintetizados fue evaluada sobre dos cepas de especies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* M2269 (LA) y *L. (V.) braziliensis* 2903 (LB). La **Figura 6** muestra una inhibición de la viabilidad parasitaria dependiente de la dosis, después de 24 horas de incubación con los péptidos. Se puede apreciar que el péptido

Cergo es el que presenta una mayor reducción de células viables para ambas especies, aunque la inhibición de LB es más marcada, sobre todo a partir de 75 μM .

Las visualizaciones bajo el microscopio óptico permitieron determinar cambios estructurales y de movimiento en los promastigotes sometidos a los tratamientos (**Figura 6C**). Se observa que el grupo control presenta una elevada densidad poblacional, e incluso existe un agrupamiento parasitario en forma de roseta; la morfología alargada y la presencia del flagelo característico es fácilmente apreciable. Por otro lado, el grupo tratado con 100 μM de Cergo presenta una densidad poblacional baja comparada con el control, y cambios morfológicos como la transición de una morfología alargada a una globular, en la que el núcleo ocupa casi la totalidad del espacio celular delimitado por la membrana.



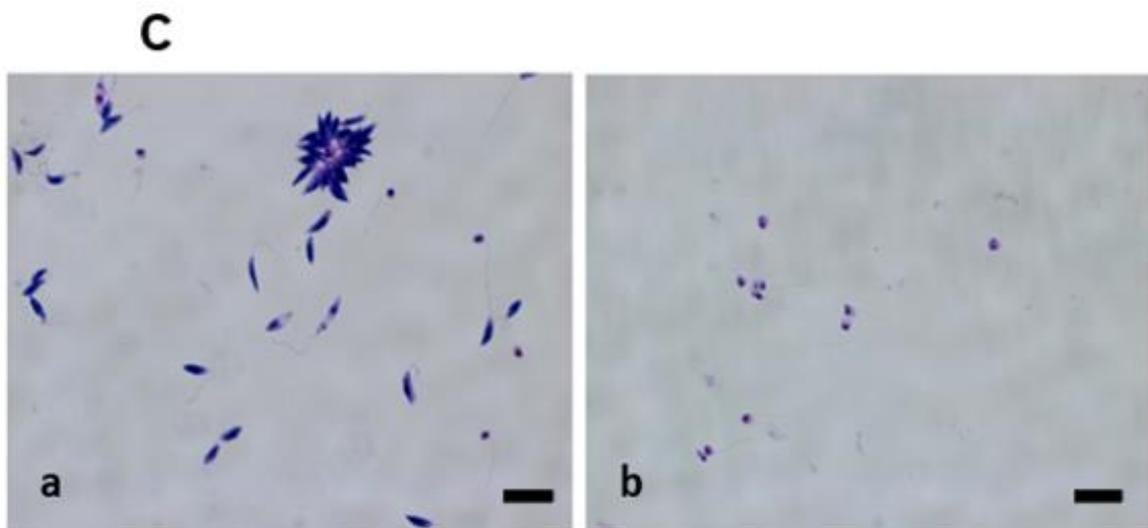
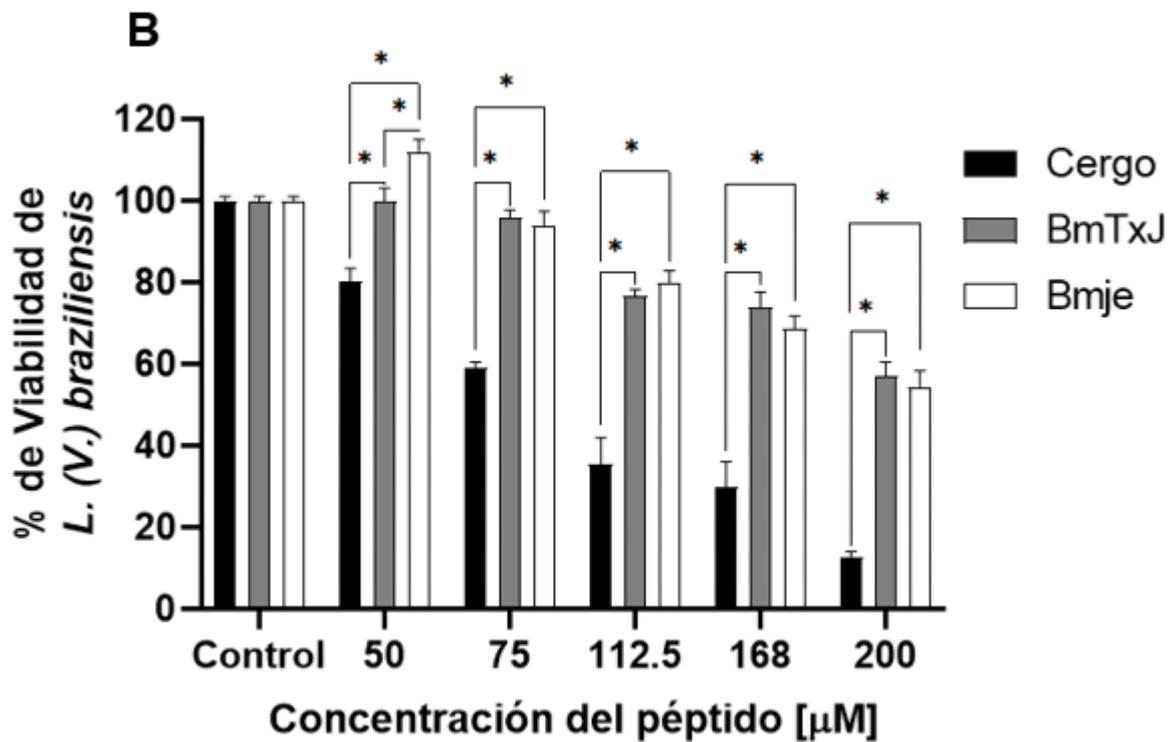


Figura 6. Actividad anti-*Leishmania* de los péptidos, evaluados sobre promastigotes metacíclicos. Los promastigotes de (A) LA y (B) LB fueron incubados en placas de 96 pocillos con concentraciones crecientes de los péptidos (0-200 µM) por 24 horas, para después realizar el ensayo MTT. Las barras con asteriscos indican diferencia significativa entre los péptidos ($p < 0,05$), las cuales fueron determinadas usando el análisis ANOVA en GraphPad Prism 8. (C) Fotomicrografías de promastigotes de LB obtenidas mediante la utilización del sistema de microscopio Leica LAS Core; se muestra (a) el grupo control y (b) el tratamiento con el péptido más activo (100 µM de Cergo). El control (grupos sin ningún tratamiento) se consideró como 100% de viabilidad celular. Barra = 10 µm.

Los valores de EC_{50} calculados para cada péptido y especie en base a los ensayos de viabilidad están reportados en la **Tabla 8**. El péptido Cergo fue el que presentó una

mayor actividad inhibitoria, ya que para la especie LA se obtuvo un valor de $EC_{50} = 110.40 \mu M$ y para LB se obtuvo $93.69 \mu M$. Los valores de EC_{50} de los otros péptidos fueron mayores.

Tabla 8. Valores de EC_{50} obtenidos mediante la evaluación peptídica sobre promastigotes metacíclicos. Los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT fueron analizados para la obtención de estos valores, mediante GraphPad Prism 8

Péptido	EC_{50} (μM)	
	LA	LB
Cergo	110,40	93,69
BmTxJ	142,88	264,24
Bmje	184,50	125,31

3.3.2. Efecto de los péptidos sintéticos sobre macrófagos primarios

Posteriormente se realizó la determinación *in vitro* de la citotoxicidad de los péptidos hacia macrófagos primarios derivados de ratones Balb/C. Este parámetro es muy importante en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra *Leishmania*. Los valores de CC_{50} obtenidos en la experimentación fueron altos en comparación a los valores previos de EC_{50} (Tabla 9). Entre los tres péptidos, el que obtuvo un valor más alto de CC_{50} , y por ende, menos citotóxico, fue Bmje

En la misma Tabla 9 también se indican los valores de índice de selectividad para cada especie de *Leishmania* evaluada. Este parámetro define una relación entre los valores de CC_{50} obtenidos en los ensayos con macrófagos y los valores de EC_{50} obtenidos en los ensayos con promastigotes. Mientras más alto sea el valor de este índice, mayor será la selectividad sobre los parásitos; el péptido Cergo es el de mayor selectividad sobre ambas especies parasitarias, siendo LB ligeramente más susceptible.

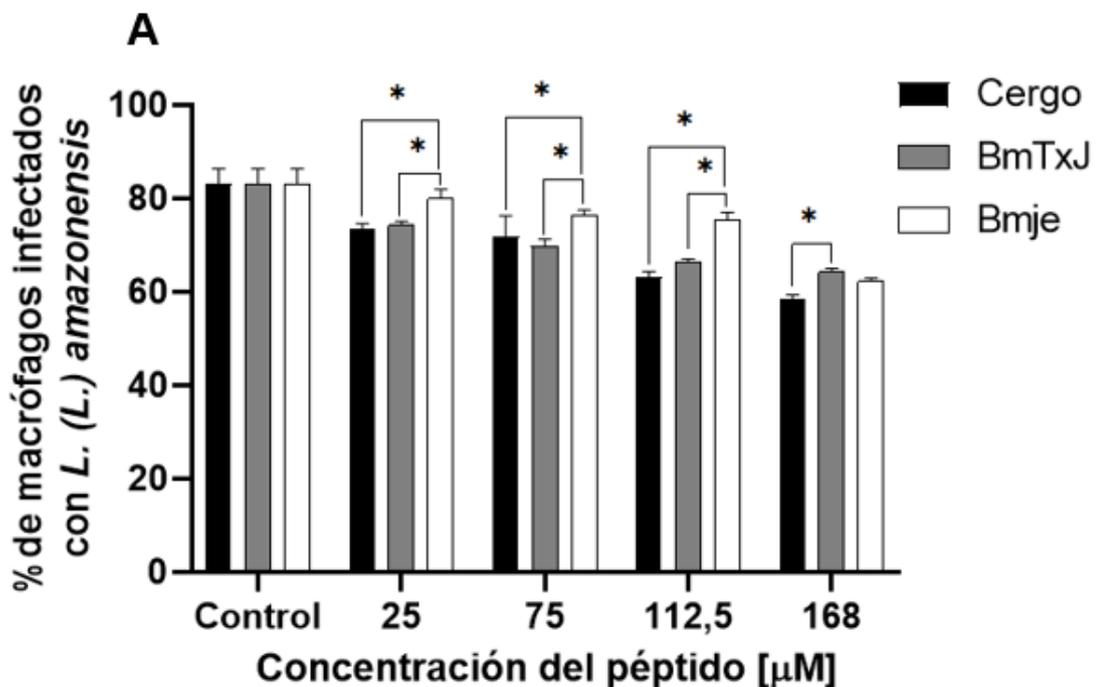
Tabla 9. Valores de CC_{50} e índices de selectividad de los péptidos sintéticos sobre la morfología extracelular de *Leishmania* spp. Estos resultados fueron obtenidos mediante GraphPad Prism 8, e indican baja citotoxicidad de los péptidos hacia macrófagos y selectividad hacia promastigotes.

Péptidos	CC_{50} sobre BMDMs (μM)	Índice de selectividad (CC_{50}/EC_{50})	
		LA	LB
Cergo	448	4,05	4,78
BmTxJ	492	3,44	1,86
Bmje	550,83	2,98	4,39

3.3.3. Efecto de los péptidos sintéticos sobre la progresión infectiva de *Leishmania* spp.

El potencial inhibitorio de los péptidos sobre el desarrollo de la infección parasitaria fue evaluado en diferentes enfoques. En primer lugar se realizó la determinación del porcentaje de macrófagos infectados por las especies de *Leishmania* utilizadas. Para esto se realizó la incubación conjunta de promastigotes y macrófagos, en una relación 10:1, durante 24 horas. Después se agregaron concentraciones crecientes de los péptidos (0–168 μM) y se incubó nuevamente durante 24 horas. Posteriormente, se contaron 300 macrófagos infectados más *n* no infectados para cada concentración, y se determinaron las relaciones correspondientes.

Los péptidos generaron una reducción porcentual de macrófagos infectados, a medida que aumentaba la dosis. En el caso de LA, se observó una reducción significativa, en comparación a los resultados del grupo control (sin tratamiento); sin embargo, dicha reducción no fue menor al 50% en las concentraciones utilizadas. Por otro lado, LB mostró ser más susceptible que LA a la mayor concentración (168 μM), siendo Cergo el péptido de mayor actividad, ya que presentó un porcentaje de infección de 36.77% (Figura 7).



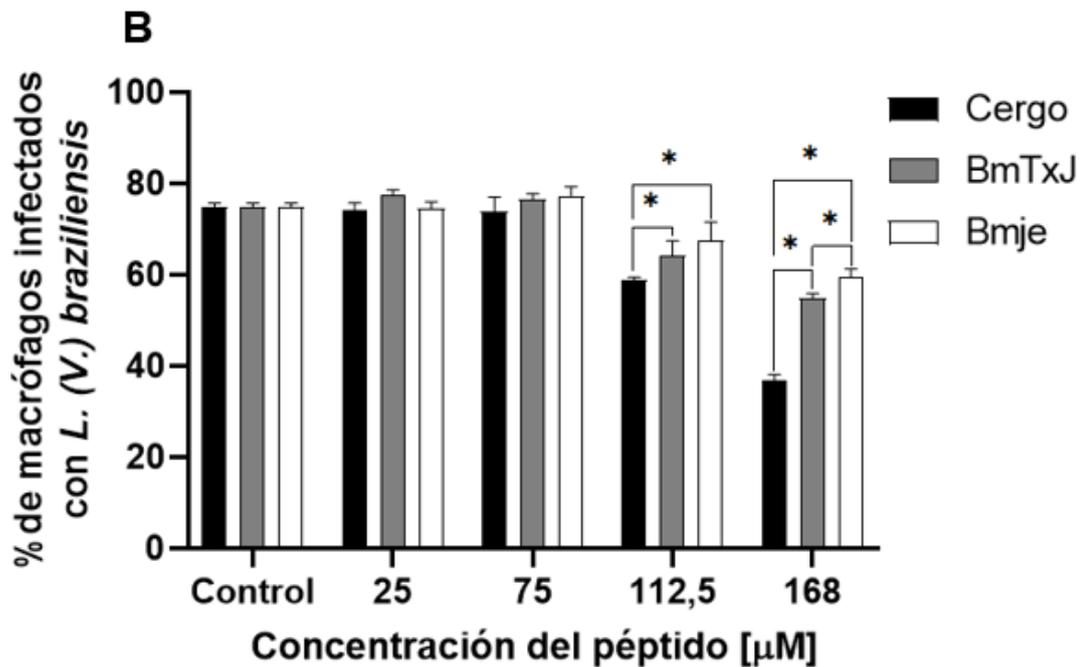


Figura 7. Actividad inhibitoria de los péptidos sintéticos sobre la infección de macrófagos primarios. Los péptidos (en un rango de 0 a 168 μM) fueron incubados en conjunto con macrófagos y promastigotes de (A) LA y (B) LB, en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas se determinó el número de macrófagos infectados mediante una tinción y posterior conteo con microscopía óptica. El control (grupos sin ningún tratamiento) se consideró como 100% de infectividad en macrófagos. Las barras con asteriscos indican diferencia significativa entre los péptidos ($p < 0.05$) las cuales fueron determinadas usando el análisis ANOVA en GraphPad Prism 8.

A la par de estos ensayos, se realizó la determinación del número específico de amastigotes en 100 macrófagos infectados. Pese a que los resultados previos mostraron que la reducción de la infección de macrófagos no fue elevada o superior a determinado valor (55% para LA y 36% para LB) para todos los péptidos, en comparación al control, el conteo de amastigotes si muestra una reducción más notoria (**Figura 8**). Esto señala que si bien un macrófago puede estar infectado, la carga de amastigotes en su interior no es tan alta, cuando se compara con el grupo control.

Los tres péptidos, evaluados sobre las dos especies, presentaron una reducción de amastigotes a medida que aumenta la dosis. Nuevamente, el péptido Cergo fue el que presentó los mejores resultados en cuanto a este parámetro, ya que generó una reducción de amastigotes mucho más prominente, en comparación a BmTxJ y Bmje. La especie LB fue la que presentó mayor susceptibilidad al tratamiento.

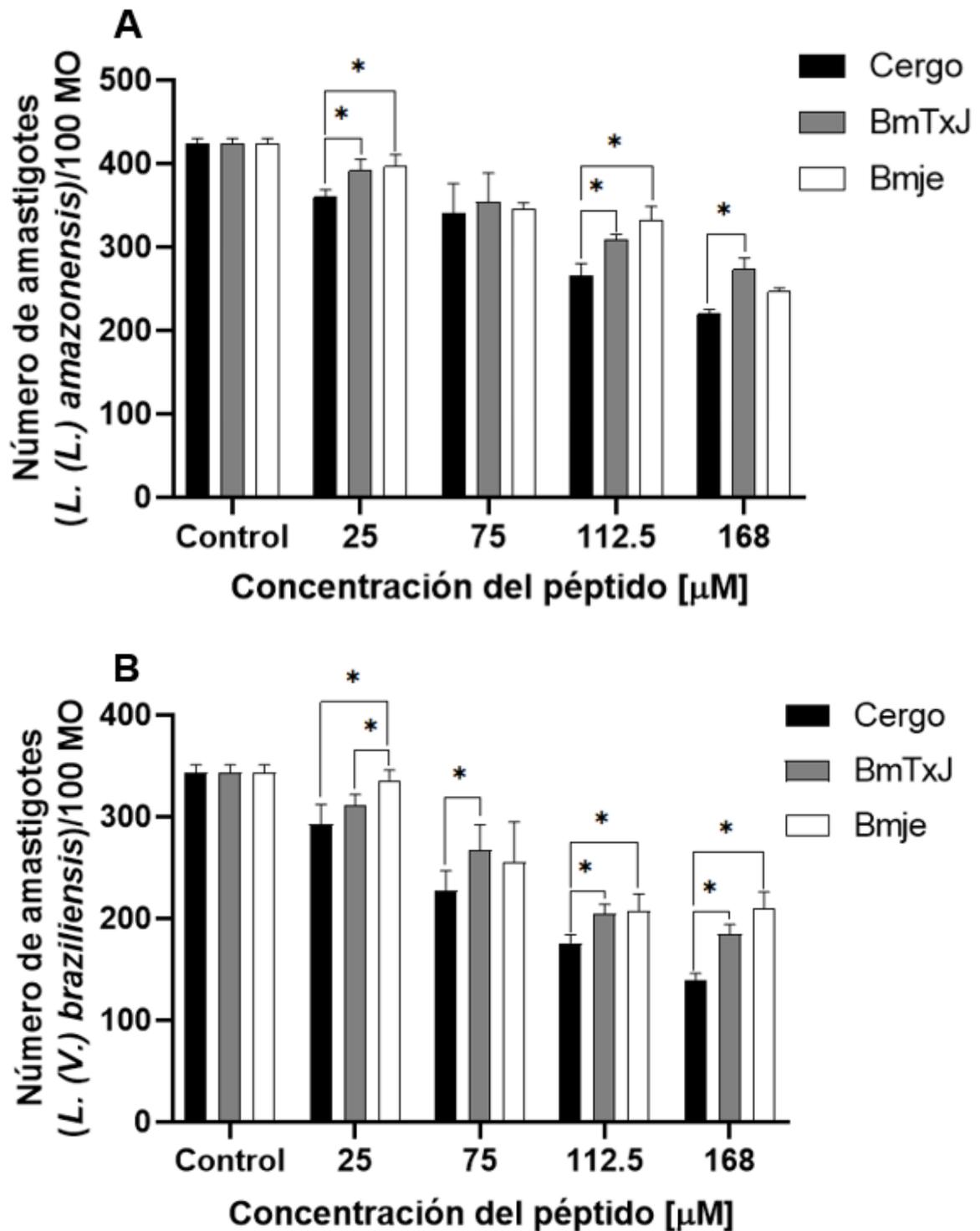
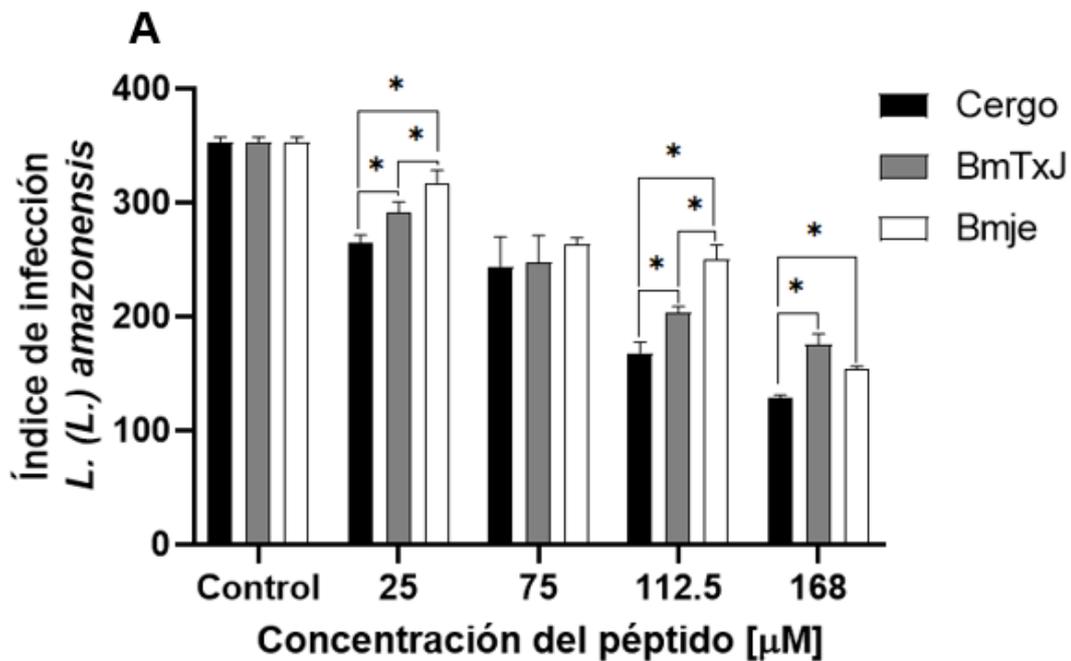


Figura 8. Determinación del número de amastigotes intracelulares por cada 100 macrófagos infectados. Los péptidos (en un rango de 0 a 168 μ M) fueron incubados en conjunto con macrófagos y promastigotes de **(A)** LA y **(B)** LB, en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, se realizó el conteo de amastigotes diferenciados mediante una tinción y posterior conteo con microscopía óptica. Los resultados muestran una reducción dependiente de la dosis del número de amastigotes. El control representa el número de amastigotes contados en los macrófagos sin ningún tratamiento. Las barras con asteriscos indican diferencia significativa entre los péptidos ($p < 0.05$) las cuales fueron determinadas usando el análisis ANOVA en GraphPad Prism 8.

Finalmente, también se determinó el índice de infección de cada especie en respuesta a los tratamientos peptídicos. Este parámetro fue calculado mediante el porcentaje de macrófagos infectados por el número promedio de amastigotes por macrófago. Este resultado representa una complementación entre los dos resultados anteriormente expuestos, y básicamente ejemplifica de mejor manera la capacidad que tienen los péptidos en la reducción de la infectividad parasitaria, a nivel de macrófagos y de amastigotes formados.

Los tres péptidos presentaron una disminución significativa, dependiente de la dosis, del índice de infección (**Figura 9**). El péptido Cergo vuelve a destacar en este apartado, ya que fue el que presentó una mayor reducción de dicho índice para ambas especies. La especie LB vuelve a presentar una susceptibilidad mayor al tratamiento en comparación a LA. Las fotomicrografías obtenidas (**Figura 9C**) evidencian la reducción de amastigote intracelulares inducida por el péptido más activo, Cergo en comparación al grupo control.



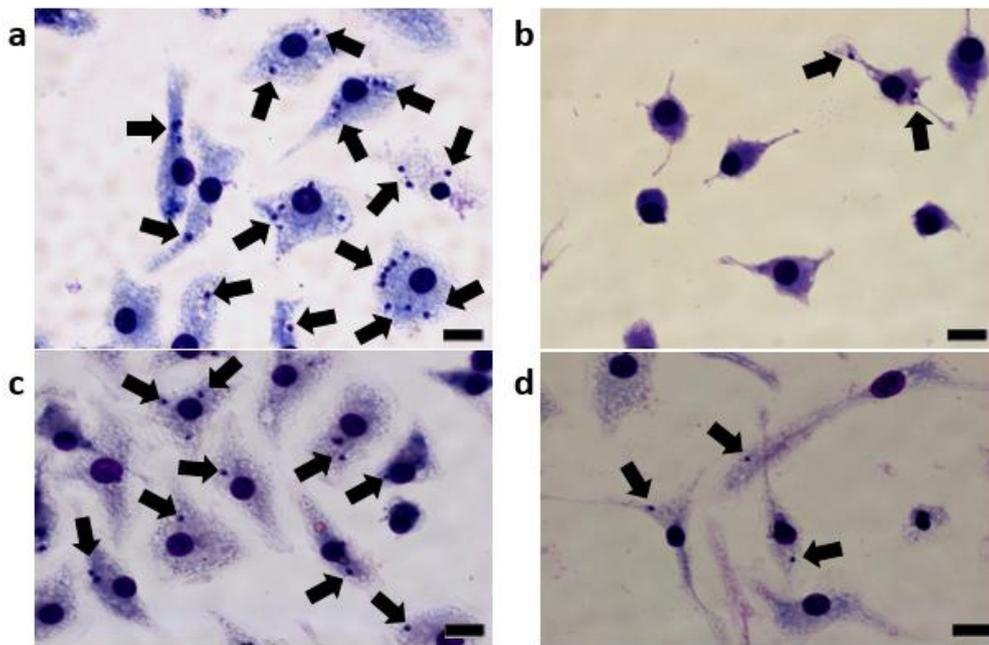
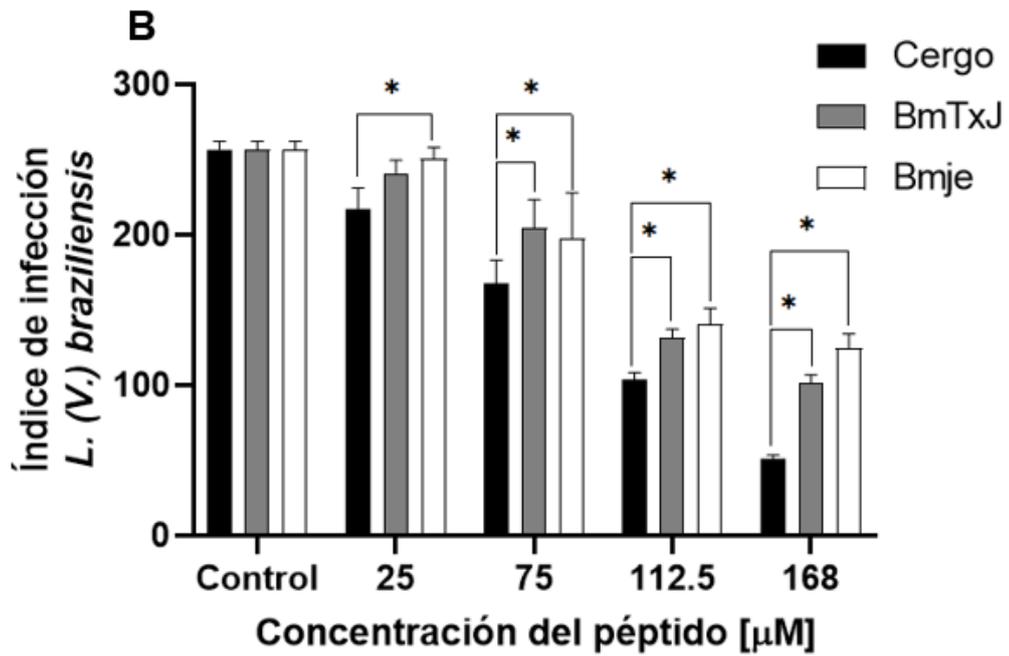


Figura 9. Determinación de los índices infectivos generados en respuesta al tratamiento peptídico. Se muestra una reducción dependiente de la dosis del índice de infección de (A) LA y (B) LB, al ser tratados con los péptidos en un rango de 0 a 168 μM . Las barras con asteriscos indican diferencia significativa entre los péptidos ($p < 0.05$) las cuales fueron determinadas usando el análisis ANOVA en GraphPad Prism 8. (C) Fotomicrografías, obtenidas con el sistema de microscopio Leica LAS Core, de los grupos controles de (a) LA y (b) LB, y a su derecha los tratamientos correspondientes; tratamiento de (c) LA y (d) LB, a 200 μM del péptido Cergo (más activo). Las flechas negras señalan los amastigotes intracelulares. El control representa el índice de infectividad de células sin tratamiento. Barra = 10 μm .

3.3.4. Efecto de los péptidos sintéticos sobre la progresión infectiva de *Leishmania* spp.

Se determinó la capacidad membranolítica de los péptidos mediante un ensayo de fluorescencia, el cual determina la unión de BE al núcleo celular parasitario. Ninguno de los péptidos sintéticos generó la mencionada actividad, ya que no se produjo ninguna señal de fluorescencia en la concentración de EC_{50} usada en el ensayo (**Figura 10**). Al no darse la lisis de la membrana por parte de los péptidos, el BE no atravesó esta barrera biológica, por lo tanto, no hubo unión de este compuesto con el ADN y por ende no hubo señal espectrofluorométrica.

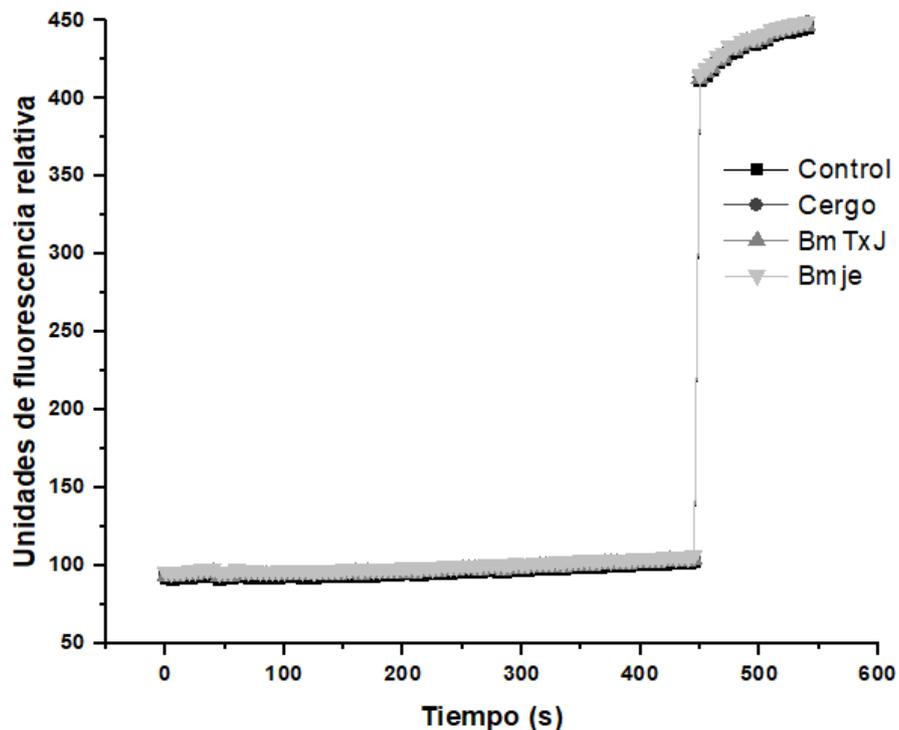


Figura 10. Evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática de promastigotes de *L. amazonensis* M2269 generada por los péptidos sintéticos. Los péptidos (EC_{50}) no produjeron lisis de la membrana de los promastigotes de LA, por lo tanto, no se generó ninguna señal de fluorescencia. El detergente digitonina fue el control de este ensayo.

4. CAPÍTULO IV. INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN.

La leishmaniasis es una de las 17 enfermedades desatendidas reconocidas por la OMS, y la segunda enfermedad parasitaria de este grupo de mayor gravedad, ya que es responsable de causar millones de infecciones y muertes anuales a nivel mundial [100]. La principal limitante en el efectivo tratamiento de este padecimiento es la poca efectividad de los tratamientos de primera línea y la baja inversión de recursos en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas en el ámbito farmacéutico; esto representa una realidad adversa y desalentadora que requiere de nuevos planteamientos científicos y tecnológicos que den respuesta a esta problemática mundial.

Los AMPs, a pesar de poseer ciertas limitaciones estructurales y funcionales, se han convertido en candidatos terapéuticos prometedores para el tratamiento de diversas afecciones humanas, incluida la leishmaniasis. Esto se debe a que ciertas propiedades como su diversidad, heterogeneidad y sobre todo, su maleabilidad para la realización de modificaciones específicas, permiten potenciar sus propiedades en función de las características del blanco patogénico de interés [43].

En teoría, los AMPs pueden ser sintetizados *de novo*, utilizando secuencias pre-existentes como molde y optando por realizar modificaciones puntuales con el fin de obtener un molécula de elevada actividad y selectividad hacia el organismo objetivo [101]. Esta metodología fue realizada en este trabajo, ya que se utilizaron distintas secuencias de PLA₂s Asp49 de venenos de serpientes, para la obtención de nuevos AMPs.

Los péptidos sintetizados en este trabajo reproducen parte de la estructura primaria de determinadas enzimas presentes en los venenos de serpientes, toxinas que de hecho tienen la particularidad de tener una alta afinidad con los fosfolípidos de membrana, debido a la elevada densidad de aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos y catiónicos en sus extremos C-terminal [73], lo cual las convierte en modelos idóneos y altamente prometedores para la obtención de péptidos con acción leishmanicida.

Para determinar cuantitativamente la pureza de los péptidos se utilizó RP-HPLC, el cual mostró que la síntesis fue exitosa, generando moléculas con purezas mayores al 90%. Los tiempos de retención obtenidos varían entre péptidos, lo cual puede deberse a las diferencias en cuanto a longitud e hidrofobicidad, generando mayores interacciones con la

columna apolar, y por ende, aumentando los tiempos de retención. Los perfiles de elución cromatográfica concuerdan con los resultados determinados por Peña et al. [92], en el primer trabajo con estas moléculas.

Por otro lado, la caracterización de los péptidos por espectrometría de masas en el equipo MALDI-TOF MS demostró presencia de las masas esperadas. Este parámetro es de naturaleza cualitativa, es decir que indica la presencia de los péptidos después de la purificación, más no la cantidad de los mismos; en este caso, se apreció que en la muestra, obtenida después del proceso por RP-HPLC, no hubo presencia de masas de contaminantes considerables o productos no deseados.

La potencialidad y alcance de las herramientas bioinformáticas permitió realizar predicciones de la posible respuesta inmune que pueden generar los péptidos. Las herramientas del servidor 'IEDB Analysis Resource' permitieron determinar si las secuencias de estas moléculas poseen regiones que puedan cumplir la función de epítomos para la activación de Linfocitos B o T. Para ambos casos, los resultados indicaron que los péptidos no cumplen la función de activadores de estas células de defensa.

La inmunogenicidad es más común en péptidos sintéticos que en naturales, y esto depende de aspectos como la dosis del compuesto, la reactividad inmune del hospedero, y el tipo de afección tratada [102]. En este caso, las predicciones realizadas demostraron que los péptidos no son inmunogénicos, la cual es una característica que favorece su uso en el tratamiento contra la leishmaniasis.

Además de estos resultados, también se estableció la posible unión de los péptidos con el MHC-II, el cual se expresa en las denominadas células presentadoras de antígenos. El Antígeno Leucocitario Humano (HLA) también conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es un complejo proteico transmembrana, que se encarga de presentar partes o fragmentos de patógenos previamente reconocidos, para que otro tipo de células, con mayor especialización, induzcan una respuesta adecuada. Este complejo es un heterodímero formado por una subunidad α y otra β [103].

Para la predicción se utilizó el alelo HLA-DR, ya que éste es expresado al momento de producirse una infección, ya sea bacteriana, fúngica o parasitaria [104]. Este alelo posee un solo gen para la expresión de la subunidad α y 4 posibles genes para la expresión de la

subunidad β (HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 y HLA-DRB5). La predicción realizada utilizó los genes HLA-DRB1 y HLA-DRB5, lo cual indica la probabilidad de unión de los péptidos con estas variantes de cadena β

El MHC-II es un complejo polimórfico, mismo que tiene una extensa variabilidad de aminoácidos que conforman el centro y los alrededores del bolsillo de unión a péptidos exógenos. Esto genera que sus diferentes alelos puedan unirse a péptidos de distintas características, dadas la variabilidad de aminoácidos que conforman sus cadenas [105].

Como lo explica Wang et al. [106], los menores valores de rango percentil obtenidos en la predicción, indican una alta probabilidad de unión al MHC-II, en un rango de 1.7 a 4.6. Los parámetros de salida dados por la herramienta se expresan como valores de concentración mínima inhibitoria (IC_{50}) en unidades de nM. Es por eso que las cifras más pequeñas indican una elevada afinidad. Los valores obtenidos para los péptidos fueron bajos, especialmente para BmTxJ (1.70), lo cual puede representar una desventaja, ya que esto implica la generación de una respuesta inmunogénica y una posible producción de efectos secundarios. Sin embargo, estas predicciones deben ser confirmadas *in vitro*, ya que tal vez dicha modulación del sistema inmune puede ser también favorable para la eliminación del parásito.

El potencial anti-*Leishmania* de los tres péptidos sintetizados en este trabajo fue evaluado sobre las dos morfologías de dos cepas; éstas fueron: *L. (L.) amazonensis* (2269) y *L. (V.) braziliensis* (2903), mismas que son responsables de causar leishmaniasis cutánea en Ecuador y en varias regiones de América [94].

La evaluación peptídica sobre la morfología parasitaria infectiva (promastigotes metacíclicos) resultó en una respuesta inhibitoria del crecimiento celular a medida que aumentaba la dosis. Este procedimiento permitió la obtención de valores de EC_{50} para cada péptido, los cuales mostraron que Cergo es la molécula más eficiente en la inhibición de promastigotes de ambas especies. Todos los valores de EC_{50} obtenidos se encuentran dentro del rango de concentraciones de otros péptidos que han mostrado acción efectiva sobre las mismas especies [66].

Refiriéndose específicamente a péptidos derivados de PLA₂s de venenos de serpientes, se puede mencionar al análisis múltiple de secuencias realizado, el cual mostró

que los péptidos sintetizados y las secuencias utilizadas como referencias para el análisis ([83,99]) poseen una similitud en la posición de aminoácidos específicos y en su alta densidad de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos, independientemente de la isoforma precursora.

La similitud encontrada se debe a que todos los péptidos (propios y referenciales) provienen del extremo C-terminal de sus proteínas precursoras. Los péptidos derivados de la región C-terminal de PLA₂s de venenos de serpientes (desde el aminoácido 115 hasta el 129) poseen la particularidad de mimetizar la acción de la proteína entera, es decir, interactuar con las membranas de los patógenos mediante atracciones electrostáticas, debido al tipo de aminoácidos que posee [82].

Además, es importante destacar las similitudes filogenéticas encontradas, el cual es un campo poco explorado pero de alta importancia en el estudio de vipéridos de interés médico [107]. En este caso, Cergo, el cual fue el péptido de mayor actividad, proviene de una PLA₂ producida por una serpiente del género *Cerrophidion*, mismo que es un género hermano de *Bothrops*; de este último han surgido varios péptidos con acción anti-*Leishmania*, tal como los utilizados en el análisis múltiple de secuencias.

La comparación de los valores de EC₅₀ entre péptidos debe ser analizada cuidadosamente, ya que éstos van a depender tanto de los procedimientos experimentales, y sobre todo, de las especies y cepas utilizadas, mismas que son altamente variables [108]. El trabajo de Mendes et al., [99], reportó la evaluación de sus péptidos (p-Acl y p-AclR7, utilizados en el análisis múltiple de secuencias) sobre la misma cepa de LA usada en este trabajo, hecho que generó valores de EC₅₀ menores a los obtenidos en esta investigación (EC₅₀ (p-Acl) = 50,98 µM, EC₅₀ (p-AclR7) = 27,19 µM); por lo tanto, nuestros péptidos son menos efectivos.

Por otro lado, Costa et al., [83], evaluó la actividad anti-*Leishmania* de sus péptidos (pep-MTXI y pep-MTXII, también usados en el análisis múltiple de secuencias) sobre los promastigotes de las dos especies aquí presentadas (no se mencionan las cepas). De igual manera, estas moléculas presentaron una mayor actividad inhibitoria de los promastigotes, en comparación a los resultados del presente trabajo, lo cual se evidencia en valores de EC₅₀ menores (29,92 µM, para ambas especies).

Estas diferencias en la eficiencia inhibitoria posiblemente se relacionen con la arquitectura de las estructuras primarias. Los cuatro péptidos presentados por los autores anteriormente citados, y que fueron utilizados en el análisis realizado con CLUSTAL Omega, comparten varias similitudes. En primer lugar, todos poseen una longitud de 13 aa, mientras que nuestros péptidos presentan longitudes variadas (entre 12 y 17 aa).

Otra diferencia importante es que los dos primeros y los dos últimos aa de los péptidos presentados por Mendes et al. [99], y Costa et al. [83], son catiónicos, y en el medio de estas estructuras se observa una combinación entre aa hidrofóbicos y catiónicos, separados por algunos residuos de Tirosina (Y) y Asparagina (N); este aspecto es diferente en nuestro estudio, ya que se observa que las secuencias poseen residuos de N e Y en el inicio, e incluso, en el caso de Bmje, hay la presencia de un residuo de Aspartato (D) al final, el cual posee carga negativa; esto pudo haber disminuido la efectividad de estas moléculas.

La hidrofobicidad posicional es un parámetro que explica la formación de ciertas regiones hidrofóbicas dentro de una secuencia, y cómo éstas pueden agregarse con el objetivo de aumentar la concentración local de un péptido en solución [109]. Pese a que los valores de hidrofobicidad pueden ser similares entre péptidos, ya que se determinan en base a la cantidad de residuos específicos, la hidrofobicidad posicional vendría a ser un indicador de la eficiencia de ciertas combinaciones y posiciones de amino ácidos en las secuencias, las cuales generan una mayor efectividad en los trabajos de Costa et al. [83] y Mendes et al. [99].

Sin embargo, independientemente de estas diferencias, los péptidos sintéticos presentados (Cergo, BmTxJ y Bmje) tuvieron actividad sobre promastigotes. Si bien este es un aspecto positivo, es importante analizar la potencialidad de los efectos generados, misma que fue diferente para cada péptido, siendo Cergo la molécula de mayor actividad inhibitoria. Si bien estas moléculas son secuencialmente similares, hay características puntuales no compartidas que pueden ser la causa de los resultados encontrados.

Dos de las diferencias más importantes son, que Cergo posee el mismo valor porcentual de aa catiónicos e hidrofóbicos que componen su secuencia (33 %), mientras que para BmTxJ (% catiónicos = 46,6%, % aromáticos = 20%) y Bmje (% catiónicos = 47%, % aromáticos = 23,5%) estos valores claramente difieren; y por otro lado, Cergo es el péptido

de menor longitud de los tres presentados (12 aa). Estas características pueden favorecer tanto la acumulación y el aumento de la concentración local de este péptido, como ciertas transiciones conformacionales que afecten la estabilidad de la membrana parasitaria [8].

La carga neta es otra de las propiedades físico-químicas peptídicas responsables de los efectos encontrados, ya que determina la atracción electrostática que se dará con los fosfolípidos aniónicos de membrana. La mayoría de péptidos derivados de venenos de serpiente con actividad leishmanicida poseen carga positiva [83,86,99]. En los tres péptidos sintetizados esta característica se cumple, debido a la alta densidad de residuos de arginina (R) y lisina (K), lo cual indujo selectividad hacia las membranas de los promastigotes y generó los efectos inhibitorios presentados.

Una estrategia importante para aumentar la carga positiva de los AMPs sin interferir en la naturaleza de su secuencia, es agregar una amidación en el extremo C-terminal, lo cual se realizó en los tres péptidos a través de la resina utilizada en la SPPS. Dicha modificación retira la carga negativa del grupo carboxilo, haciendo que la carga neta aumente en +1, todo esto a pH fisiológico, haciendo que la selectividad del péptido mejore; también menora la susceptibilidad peptídica hacia la acción de proteasas [110].

Este tipo de modificación se ha demostrado que logra estabilizar la estructura secundaria α -hélice peptídica, la cual está relacionada con el aumento en la interacción con los fosfolípidos de membrana, y en la actividad antimicrobiana [111]. El trabajo realizado por Konno et al. [112], es una evidencia de los efectos de esta amidación, ya que muestra que el péptido Decoralina, aislado del veneno de la avispa solitaria, presentó actividad significativa sobre *L. major*, obteniendo un $EC_{50} = 72 \mu\text{M}$. Una vez realizada la amidación en el extremo C-terminal de este péptido, se comprobó que el valor de EC_{50} disminuyó a $11 \mu\text{M}$, lo cual indica un aumento en el potencial inhibitorio de esta molécula.

Pese a estas ventajas, la amidación en el extremo C-terminal también puede aumentar la actividad hemolítica del péptido, lo cual es un efecto adverso no deseado. Peña et al. [92], evaluaron la acción de los péptidos presentados sobre células bacterianas y tumorales, obteniendo actividades moderadas. En la mencionada investigación se determinó, mediante un análisis, *in silico* que la estructura secundaria de los péptidos es α -hélice, así como también se pudo comprobar experimentalmente que los péptidos no son

hemolíticos, lo cual es una propiedad fundamental para que estas biomoléculas sean candidatos contra una determinada enfermedad; ninguna célula del hospedero, en el caso de la leishmaniasis, debe verse afectada por el posible agente terapéutico.

El aumento de la helicidad de un péptido significa aumento de las propiedades hidrofóbicas y, a la par, de sus interacciones con fosfolípidos de membrana. Los resultados obtenidos por el paquete informático 'Peptides' permiten clarificar las propiedades hidrofóbicas de estas biomoléculas. Los péptidos con alta probabilidad de ser transmembrana poseen valores de índice de momento hidrofóbico menores a 0.2, de acuerdo a las características del paquete 'Peptides' [95]. En este caso, los valores de este índice para los tres péptidos superan dicho umbral, lo cual indica que poseen una baja propiedad transmembrana.

El índice hidrofóbico representa una fuerza importante de estabilización que dictamina el plegamiento proteico en un medio determinado, y su unión a las membranas [95]. Los péptidos con alta probabilidad de unirse al núcleo de las membranas fosfolípicas poseen valores negativos, lo cual se cumple para los tres péptidos.

Por otro lado, el índice alifático proporciona información sobre la estabilidad térmica de un péptido, en función de los residuos alifáticos de su secuencia. En el caso de los tres péptidos, los valores de índice alifático son bajos, debido a que no hay una alta densidad de aminoácidos alifáticos (Alanina, Isoleucina, Leucina y Valina).

Finalmente, el índice de Boman indica si un péptido tendrá mayor afinidad a interactuar con una proteína, [95]. Si los valores de este índice son negativos o cercanos a cero, se indica una baja interacción proteína-proteína; en el caso de los tres péptidos los valores obtenidos fueron mayores a 2.3, lo cual indica una mayor interacción con los fosfolípidos de membrana.

Todas estas propiedades, especialmente los índices hidrofóbico y de Boman, sumadas a las elevadas cargas netas de los péptidos, permiten explicar la inhibición de promastigotes metacíclicos encontrada en este trabajo.

La atracción entre la carga positiva de los péptidos y la negativa de las membranas de promastigotes, propicia que ciertos cationes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} se desprendan de los fosfolípidos que componen estas barreras biológicas, generando tanto su

desestabilización como una permeabilización peptídica, que al final derivan en la muerte celular [82].

Cergo fue el péptido que presentó mayor inhibición de promastigotes, y además, es el que posee la menor longitud (12 aa) y carga neta (+5) de los tres péptidos sintetizados en este trabajo. Este aspecto parece representar una ventaja estructural que favorece la mayor potencialidad encontrada en los ensayos realizados. Este tipo de casos también se ha visto en otros péptidos, como por ejemplo las temporinas (familia de AMPs con acción leishmanicida, de menor longitud y carga neta en comparación a otros grupos [63]); por lo tanto, al igual que esta familia, la cationicidad no sería la característica determinante que explique la interacción entre Cergo y las membranas parasitarias.

Es por esto que la complementariedad entre la estructura secundaria α -hélice y los valores bajos tanto del índice hidrofóbico (alta afinidad para la unión con el núcleo de las membranas) como del índice de Boman (favorecimiento de interacción péptido-fosfolípido) podría explicar los efectos de Cergo sobre los parásitos (siendo LB la especie más susceptible al tratamiento, debido a que es una especie menos infectiva, y con un metabolismo lento en comparación con LA). El péptido Cergo puede haberse unido a la membrana parasitaria de manera perpendicular, propiciando apertura de poros o desplazamiento de fosfolípidos, tal como se ha visto en algunas temporinas [113].

La reducción de la viabilidad parasitaria de los promastigotes observada podría justificar esta teoría, lo cual se puede ver también en las fotomicrografías, en las cuales se evidencian cambios en la morfología, cantidad y dispersión de LB a una concentración de 100 μ M de Cergo, en comparación con el grupo control.

Dado el hecho que los parásitos *Leishmania* son intracelulares obligados, para que un nuevo candidato terapéutico sea considerado como prometedor para el tratamiento de la leishmaniasis, debe presentar una mínima o nula acción citotóxica sobre los macrófagos, los cuales son las células del hospedero donde se produce el cambio parasitario de promastigotes a amastigotes [3].

En este caso, dicha condición se cumple en los resultados obtenidos, ya que las concentraciones citotóxicas (expresadas como CC_{50}) son mayores a aquellas con las que se logra la inhibición de promastigotes (ubicadas en un rango de 448 a 550 μ M). Además, la

determinación de los índices de selectividad, obtenidos mediante la relación de los valores de CC_{50} y EC_{50} , permitió establecer justamente la selectividad que tienen los péptidos hacia los promastigotes de las dos especies, siendo Cergo el más selectivo. Este tipo de resultados también se han visto en casos experimentales, específicamente en el estudio de Oliveira et al., [114], en el que distintos péptidos derivados de las secreciones cutáneas de ranas presentaron valores de CC_{50} mayores a $500 \mu\text{M}$.

Algunas investigaciones sobre AMPs con acción leishmanicida han reportado valores de índice de selectividad mayores a los presentados en este trabajo, incluso en aquellos derivados de toxinas de serpientes [99,115,116], lo cual también puede deberse a los mayores valores de EC_{50} obtenidos y a los parámetros de arquitectura de las secuencias previamente establecidos.

La mencionada selectividad tiene su razón en las diferencias estructurales entre las membranas parasitarias y de células hospederas. El esteroles primario en las membranas de *Leishmania* es el ergosterol, mientras que en las membranas mamíferas es el colesterol. Además, las membranas de células mamíferas poseen fosfolípidos zwitteriónicos (carga neta igual a cero), mientras que en los parásitos se encuentran fosfolípidos aniónicos, los cuales componen aproximadamente el 60% de esta estructura en los promastigotes [62,117], y dan cabida a interacciones electrostáticas con moléculas catiónicas como los péptidos presentados.

En los resultados de progresión infectiva se pudo observar una reducción de la densidad de amastigotes de ambas especies, en respuesta al tratamiento con los péptidos. Pese a que la infección no se redujo significativamente en términos porcentuales, ya que el hecho que haya un solo amastigote por macrófago ya indica infección, la carga de amastigotes se redujo a medida que aumentaba la dosis, lo cual es un indicador de la eficiencia de uso de estas moléculas.

Los amastigotes poseen una composición de membrana diferente a los promastigotes, ya que se ha demostrado que esta morfología no presenta una gran densidad de fosfolípidos aniónicos, al contrario, se compone de lípidos zwitteriónicos más otros glucolípidos propios de las células hospederas [66], lo cual provee la capacidad de evadir el sistema inmune y modular la producción de citoquinas [5]. La anfipaticidad,

mediada por la estructura secundaria, sería la propiedad determinante en la inhibición de esta morfología. Esta fase experimental mostró que los amastigotes de LB fueron más susceptibles a los tratamientos peptídicos, en comparación a los de LA, hecho que puede explicarse por las diferencias metabólicas entre estas dos especies.

El acelerado metabolismo de los amastigotes de LA, en comparación a LB, está relacionado con la capacidad de esta especie para alterar determinadas rutas metabólicas del hospedero y aprovechar ciertos componentes y macromoléculas para lograr una mayor replicación y crecimiento [118–120].

Dentro de las características genéticas de LA se encuentra la capacidad de expresar la enzima arginasa, la cual utiliza la L-arginina como sustrato para producir algunos intermediarios del ciclo de la úrea, mismos que son necesarios para la biosíntesis de aminoácidos, y poliaminas; esta enzima también se produce en humanos [121].

Los macrófagos humanos poseen diferentes mecanismos para actuar en respuesta a infecciones por distintos organismos patogénicos. Uno de estos mecanismos es la producción de Óxido Nítrico (NO) a través de la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS), la cual, para producir este compuesto requiere de varios pasos, mismos que empiezan con la L-arginina [122].

En el caso de una infección producida por *Leishmania*, se genera una disminución significativa de la tasa de expresión de NOS, y en contraparte, se da un aumento en la expresión de un canal para la entrada específica de arginina, llamado CAT2B [123,124]. Esto genera un flujo de entrada abundante de arginina en el macrófago y ningún medio para aprovechar este compuesto y transformarlo en NO.

Por lo tanto, los amastigotes se aprovechan de este flujo abundante de arginina para, por medio de la enzima arginasa, producir ornitina, y aprovechar este compuesto para aumentar su tasa de replicación y crecimiento. Además, existe también evidencia de que canales para el paso simporte de arginina, como el llamado AAP3, se expresan en LA [125], lo cual confirma el aprovechamiento parasitario de este aminoácido, y también podría explicar la mayor susceptibilidad encontrada en los tratamientos sobre LB.

Los efectos producidos por los péptidos en la reducción de la progresión infectiva pueden ser similares a los generados por algunos AMPs propios de las células mamíferas,

como el llamado LL-37, desencadenando eventos como la modificación de respuestas por parte de los macrófagos, haciendo que estas células mejoren su capacidad de autofagia (eliminación de componentes intracelulares no deseados, en este caso, los amastigotes) [126]. Sin embargo, esto es una inferencia, ya que el mencionado péptido LL-37 difiere en cuanto a su estructura primaria con los péptidos presentados, principalmente es su longitud y densidad de aminoácidos. Pese a esto, la actividad leishmanicida de este péptido ha sido reportada [127].

Las fotomicrografías de esta fase experimental muestran los efectos generados, sobre las dos especies, por el péptido más activo, Cergo (200 μM), el cual indujo una reducción significativa del número de amastigotes por macrófago, y por lo tanto de la progresión infectiva, en comparación al grupo sin tratamiento.

Una vez analizada toda la información obtenida, se puede inferir el posible mecanismo de acción de los péptidos presentados sobre las dos morfologías. En primer lugar, la lisis de la membrana plasmática parasitaria se ha descrito como el mecanismo de acción principal de AMPs con acción sobre parásitos *Leishmania*, principalmente sobre la morfología promastigote [62,128]. Este mecanismo no es efectuado por los péptidos sintetizados, ya que su actividad membranolítica fue nula, lo cual sugiere que los resultados obtenidos se deben a su capacidad de interacción electrostática con la membrana (mediada por la carga positiva), el atravesamiento o cambio de la fluidez de esta barrera biológica (por medio de sus propiedades anfipáticas), y el desencadenamiento de procesos celulares que derivan en muerte parasitaria [62].

Por otro lado, los efectos encontrados sobre los amastigotes intracelulares y la progresión infectiva, pueden tener su explicación en la modulación peptídica de ciertos mecanismos de respuesta por parte de los macrófagos. Un ejemplo es el estudio desarrollado por Kückelhaus et al. (2020), en el que se evaluó el potencial inhibitorio del péptido filoseptina-1 (derivado de la secreción cutánea de *Phyllomedusa azurea*) sobre la morfología amastigote de *L. amazonensis*. Los resultados de este trabajo indican que filoseptina-1 aumenta la producción del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α , por sus siglas en inglés), el cual se ha demostrado que mejora la respuesta de los macrófagos hacia parásitos *Leishmania* [129]. Este componente del sistema inmune pudo también producirse en el tratamiento con nuestros péptidos, aunque esto debe ser comprobado

Si bien los péptidos no presentaron acción membranolítica (evaluada sobre promastigotes), esto no elimina la posibilidad de que exista interacción con la membrana del macrófago y que se induzca el desencadenamiento de señales intracelulares, las cuales probablemente regulan la supervivencia del parásito en el interior del macrófago. Dicha interacción podría generar la producción de intermediarios y mensajeros, como el óxido nítrico, que dificultan la viabilidad de los amastigotes en las células, generando los efectos hacia el tratamiento peptídico encontrados.

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se demostró el potencial inhibitorio de tres péptidos cortos, de naturaleza catiónica y anfipática, derivados de PLA₂s Asp49 de venenos de serpientes, sobre dos especies del género parasitario *Leishmania* (LA y LB), a nivel *in vitro*. Las secuencias provienen de los extremos C-terminal de las enzimas precursoras, cuya composición de aminoácidos genera una efectiva atracción hacia los fosfolípidos de las membranas parasitarias.

La inhibición de promastigotes metacíclicos fue efectiva, en comparación a los resultados del grupo control. Se presentó una inhibición dependiente de la dosis, en la que el péptido Cergo fue el más activo sobre las dos especies evaluadas.

La citotoxicidad hacia macrófagos primarios se consiguió a concentraciones superiores a los valores de EC₅₀, obtenidos en los ensayos con promastigotes; esto indica una selectividad de los péptidos hacia los parásitos, lo cual se cree está mediado por la carga, estructura secundaria, y anfipaticidad de estas moléculas.

La capacidad de los péptidos para reducir la progresión infectiva parasitaria fue efectiva. Nuevamente, el péptido Cergo fue el que presentó los mejores resultados, y LB fue la especie más afectada; esto quizá se produjo debido a las diferencias metabólicas entre ambas especies, ya que LA posee un metabolismo más acelerado que LB, y por lo tanto es más infectiva.

Los péptidos no presentaron actividad membranolítica, por lo que se infiere que su mecanismo de acción sobre promastigotes radica en la unión a dianas intracelulares y el posterior desencadenamiento de eventos metabólicos o celulares que acaban en la muerte parasitaria. Por otro lado, se infiere que los péptidos modulan las repuestas de los macrófagos para que estas células eliminen a los parásitos amastigotes intracelulares.

Las propiedades físico-químicas y biológicas encontradas en los procedimientos bioinformáticos y experimentales indican que los péptidos pueden ser candidatos prometedores en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis, ya que provienen de enzimas modificadoras que tienen una alta afinidad con los

fosfolípidos de membrana, mismas que no han sido muy estudiadas en cuanto a sus propiedades biológicas sobre distintos patógenos.

5.2. Recomendaciones

Complementar estos resultados con la realización de ensayos de Dicroísmo Circular, la cual es una técnica que permite establecer la estructura secundaria de un péptido, además de las interacciones y cambios que ésta puede sufrir al momento de interactuar con la membrana objetivo; esto permite una mejor interpretación de los posibles mecanismos de acción de los péptidos sintetizados.

Los mecanismos de acción molecular sobre las dos morfologías deben ser comprendidos, con la finalidad de obtener futuras pistas para el diseño de moléculas con mayor actividad, tomando en cuenta que la alta selectividad de los péptidos presentados, los hacen destacar como candidatos para el desarrollo de compuestos leishmanicidas, ya que los disponibles actualmente carecen de esta propiedad e inducen varios efectos secundarios indeseados.

De igual manera, si bien los resultados obtenidos fueron alentadores, hay que tener en cuenta que son a escala *in vitro*, y para que una nueva molécula sea considerada como un fuerte candidato sobre otras, debe poseer propiedades estructurales que aseguren su efectividad a nivel *in vivo*. La ciencia peptídica y el desarrollo de la bioinformática han revelado que ciertas propiedades pueden ser modificadas ya sea para aumentar la actividad sobre el organismo blanco o para aumentar la estabilidad dentro de un organismo. Es por eso que se recomienda realizar modificaciones a los péptidos presentados, tales como ciclación, utilización de aminoácidos en configuración D, modificación de las cadenas laterales o conjugación con otras macromoléculas, con el objetivo de aumentar el potencial leishmanicida y la estabilidad de estas moléculas, para que su potencial como posibles candidatos terapéuticos sea aún mayor.

6. REFERENCIAS

1. Alvar J, Jannin J. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE. 2012;7: 12.
2. Calvopiña M, Loor R, Lara F, Zambrano P, Hashiguchi Y. Prevalencia y formas clínicas de la Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha - Ecuador. J Fac Med Sci Cent Univ Ecuad. 2012; 9.
3. Bates PA. Revising *Leishmania*'s life cycle. Nat Microbiol. 2018;3: 529–530.
4. Pan AA, Duboise SM, Eperon S, Rivas L, Hodgkinson V, TRAUB-CSEKOb Y, et al. Developmental Life Cycle of *Leishmania*—Cultivation and Characterization of Cultured Extracellular Amastigotes1. J Eukaryot Microbiol. 1993;40: 11.
5. Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. Cell Microbiol. 2014; 16.
6. Cincura C, Mo C, Lessa MM, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: A Retrospective Study of 327 Cases from an Endemic Area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Am J Trop Med Hyg. 2017; 6.
7. Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. Rev Assoc Med Bras. : 9.
8. Marr AK, McGwire BS, McMaster WR. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. Future Microbiol. 2012;7: 1047–1059.
9. Lewies A, Wentzel JF, Jacobs G, Du Plessis LH. The Potential Use of Natural and Structural Analogues of Antimicrobial Peptides in the Fight against Neglected Tropical Diseases. Molecules. 2015;20: 15392–15433. doi:10.3390/molecules200815392
10. Molyneux DH. Neglected tropical diseases: now more than just 'other diseases'—the post-2015 agenda. Int Health. : 9.
11. Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DCW, Solomon AW. Neglected tropical diseases. Br Med Bull. 2010;93: 179–200. doi:10.1093/bmb/ldp046
12. Allende S, Kennedy A, Delta A. Estudio de Casos de Leishmaniasis Cutánea Registrados en un Hospital Público en Portoviejo, Ecuador. Rev Científica Digit INSPILIP Código ISSN. 2018;2588: 0551.

13. Ministerio de Salud Pública. Ecuador. SUBSISTEMA DE VIGILANCIA SIVE- ALERTA ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES ECUADOR, SE 1-32 / 2019. 13 Aug 2019 [cited 4 Jun 2020]. Available: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/GACETA-VECTORES-SE-32-2019.pdf>
14. SNEM S. Proyecto de vigilancia y control de vectores para la prevención de la transmisión de enfermedades metaxénicas en el Ecuador 2013–2017. Serv Nac Control Enfermedades Transm Por Vectores Artrópodos See Httpinstituciones Msp Gob Ecdpssnemimagesproyectocontroldevectoresmetaxenicass Pdf. 2013.
15. Kato H, Gomez EA, Martini-Robles L, Muzzio J, Velez L, Calvopiña M, et al. Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10. doi:10.1371/journal.pntd.0004844
16. Weigel M, Armijos R, Racines R, Zurita C, Izurieta R, Herrera E, et al. La leishmaniasis cutánea en la región subtropical del Ecuador: percepciones, conocimientos y tratamientos populares. *Bol Oficina Sanit Panam OSP* 117 5 Nov 1994. 1994.
17. Armijos R, Weigel M, Izurieta R, Racines J, Zurita C, Herrera W, et al. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. *Trop Med Int Health*. 1997;2: 140–152. doi:10.1046/j.1365-3156.1997.d01-236.x
18. Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 10.
19. Fernández TE, Almeida RT. Reporte de lesiones mucosas en Leishmaniasis Tegumentaria Americana, en el Litoral (Costa) Ecuatoriano. *Rev Patol Trop*. 2012;41: 356–366.
20. Hashiguchi Y. INVESTIGACIONES SOBRE LA LEISHMANIASIS EN EL ECUADOR, 1920-1989. *Bol Oficina Sanit Panam OSP*. 1990; 12.
21. Leon DLA. LEISHMANIAS Y LEISHMANIASIS. *Rev Fac Cienc Médicas Quito*. 1957; 105.
22. Mimori T, Jr GG, Kreutzer RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, et al. Identification, Using Isoenzyme Electrophoresis and Monoclonal Antibodies, of *Leishmania* Isolated from Humans and Wild Animals of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40: 154–158. doi:10.4269/ajtmh.1989.40.154
23. Banuls A-L, Guerrini F, Pont FL, Barrera C, Espinel I, Guderian R, et al. Evidence for Hybridization by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA Between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44: 408–411. doi:10.1111/j.1550-7408.1997.tb05716.x

24. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR Detection and Identification of *Leishmania* Parasites in Clinical Specimens in Ecuador: A Comparison with Classical Diagnostic Methods. *J Parasitol.* 1999;85: 181–187. doi:10.2307/3285616
25. Matsumoto' T, Hashiguchi' Y, Gomez EA, Calvopifia H, Nonaka' S, Saya H, et al. Comparison of PCR results using scrape/exudate, syringe-sucked fluid and biopsy samples for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 2.
26. Kato H, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Uezato H, Marco JD, et al. Molecular Mass Screening to Incriminate Sand Fly Vectors of Andean-type Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79: 719–721. doi:10.4269/ajtmh.2008.79.719
27. Kato H, Uezato H, Katakura K, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, et al. DETECTION AND IDENTIFICATION OF LEISHMANIA SPECIES WITHIN NATURALLY INFECTED SAND FLIES IN THE ANDEAN AREAS OF ECUADOR BY A POLYMERASE CHAIN REACTION. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 7.
28. Gachet MS, Lecaro JS, Kaiser M, Brun R, Navarrete H. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *J Ethnopharmacol.* 2010; 14.
29. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 2017;12: 25–40. doi:10.2147/DDDT.S146521
30. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Jesus AR de, Dutra WO, et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect Immun.* 2002;70: 6734–6740. doi:10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
31. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science.* 2008;321: 970–974. doi:10.1126/science.1159194
32. Moll H, Berberich C. Dendritic Cell-Based Vaccination Strategies: Induction of Protective Immunity against Leishmaniasis. *Immunobiology.* 2001;204: 659–666. doi:10.1078/0171-2985-00105
33. Kedzierski L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis.* 2010;2: 177–185. doi:10.4103/0974-777X.62881
34. Marsden PD. PENTAVALENT ANTIMONIALS: OLD DRUGS FOR NEW DISEASES. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1985; 12.

35. Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, Hofland HWC, El-Toum I, Satti M, et al. The treatment of kala-azar in the Sudan with sodium stibogluconate: a randomized trial of three dosage regimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87: 307–309. doi:10.1016/0035-9203(93)90140-L
36. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9: 588–596. doi:10.3855/jidc.6833
37. Frezard F, Demicheli C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010; 17.
38. Epand RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1999;1462: 11–28. doi:10.1016/S0005-2736(99)00198-4
39. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
40. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24: 536–547. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005
41. Lien S, Lowman HB. Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 2003;21: 556–562. doi:10.1016/j.tibtech.2003.10.005
42. Löfgren SE, Miletti LC, Steindel M, Bachère E, Barracco MA. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp Parasitol.* 2008;118: 197–202. doi:10.1016/j.exppara.2007.07.011
43. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today.* 2010;15: 40–56. doi:10.1016/j.drudis.2009.10.009
44. Schreiber C, Müller H, Birrenbach O, Klein M, Heerd D, Weidner T, et al. A high-throughput expression screening platform to optimize the production of antimicrobial peptides. *Microb Cell Factories.* 2017;16: 29. doi:10.1186/s12934-017-0637-5
45. Wibowo D, Zhao C-X. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103: 659–671. doi:10.1007/s00253-018-9524-1

46. Deng T, Ge H, He H, Liu Y, Zhai C, Feng L, et al. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. *Protein Expr Purif.* 2017;140: 52–59. doi:10.1016/j.pep.2017.08.003
47. Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17: 638–642. doi:10.1016/j.copbio.2006.10.002
48. Bray BL. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2: 587–593. doi:10.1038/nrd1133
49. Kunz H, Dombo B. Solid Phase Synthesis of Peptides and Glycopeptides on Polymeric Supports with Allylic Anchor Groups. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1988;27: 711–713. doi:10.1002/anie.198807111
50. Stawikowski M, Fields GB. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* Editor Board John E Coligan Al. 2002;CHAPTER: Unit-18.1. doi:10.1002/0471140864.ps1801s26
51. Larsen BD, Holm A. Incomplete Fmoc deprotection in solid-phase synthesis of peptides. *Int J Pept Protein Res.* 1994;43: 1–9. doi:10.1111/j.1399-3011.1994.tb00368.x
52. Atherton E, Fox H, Harkiss D, Logan CJ, Sheppard RC, Williams BJ. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J Chem Soc Chem Commun.* 1978; 537–539. doi:10.1039/C39780000537
53. Latham PW. After a roller coaster ride of successes and failures, new discovery technologies and advances in manufacturing promise a brighter future for peptides in human therapy. *Nat Biotechnol.* 1999;17: 3.
54. Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D1094–D1097. doi:10.1093/nar/gkv1051
55. Singh S, Chaudhary K, Dhanda SK, Bhalla S, Usmani SS, Gautam A, et al. SATPdb: a database of structurally annotated therapeutic peptides. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: D1119–D1126. doi:10.1093/nar/gkv1114
56. Fan L, Sun J, Zhou M, Zhou J, Lao X, Zheng H, et al. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Sci Rep.* 2016;6: 24482. doi:10.1038/srep24482
57. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today.* 2015;20: 122–128. doi:10.1016/j.drudis.2014.10.003

58. Alberola J, Rodríguez A, Francino O, Roura X, Rivas L, Andreu D. Safety and Efficacy of Antimicrobial Peptides against Naturally Acquired Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 3.
59. Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Curr Protein Pept Sci.* 2009;10: 585–606. doi:10.2174/138920309789630589
60. McGwire BS, Kulkarni MM. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp Parasitol.* 2010;126: 397–405. doi:10.1016/j.exppara.2010.02.006
61. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med.* 2007;85: 317–329. doi:10.1007/s00109-006-0143-4
62. Marr AK, McGwire BS, McMaster WR. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiol.* 2012; 13.
63. Mangoni ML. Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2006;63: 1060–1069. doi:10.1007/s00018-005-5536-y
64. Díaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, Andreu D, Rivas L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1–8)M(1–18), a synthetic cecropin A–melittin hybrid peptide. *Biochem J.* 1998;330: 453–460. doi:10.1042/bj3300453
65. Khalili S, Ebrahimzade E, Mohebali M, Shayan P, Mohammadi-Yeganeh S, Moosazadeh Moghaddam M, et al. Investigation of the antimicrobial activity of a short cationic peptide against promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MHRO/IR/75/ER): An *in vitro* study. *Exp Parasitol.* 2019;196: 48–54. doi:10.1016/j.exppara.2018.11.006
66. Cobb SL, Denny PW. Antimicrobial peptides for leishmaniasis. *Curr Opin Invs Drugs.* 2010 : 9.
67. Pichereau C, Allary C. Therapeutic Peptides under the Spotlight. *Eur Biopharm Rev.* 2005; 4.
68. McCleary RJR, Kini RM. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon.* 2013;62: 56–74. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.008
69. Almeida JR, Resende LM, Watanabe RK, Carregari VC, Huancahuire-Vega S, da S. Caldeira CA, et al. Snake Venom Peptides and Low Mass Proteins: Molecular Tools

- and Therapeutic Agents. *Curr Med Chem.* 2017;24: 3254–3282. doi:10.2174/0929867323666161028155611
70. Mohamed Abd El-Aziz T, Soares AG, Stockand JD. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins.* 2019;11: 564. doi:10.3390/toxins111100564
 71. Kini RM. Molecular moulds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29: 815–822. doi:10.1046/j.1440-1681.2002.03725.x
 72. Waheed H, F. Moin S, I. Choudhary M. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. *Curr Med Chem.* 2017;24: 1874–1891. doi:10.2174/0929867324666170605091546
 73. Lomonte B, Angulo Y, Moreno E. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A₂ Homologues from Viperidae Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications. *Curr Pharm Des.* 2010;16: 8.
 74. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2006;1761: 1246–1259. doi:10.1016/j.bbalip.2006.07.011
 75. Cedro RCA, Menaldo DL, Costa TR, Zoccal KF, Sartim MA, Santos-Filho NA, et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* snake venom. *J Venom Anim Toxins Trop Dis.* 2018;24: 33. doi:10.1186/s40409-018-0170-y
 76. Arni R, Ward R. -Phospholipase A₂—A structural review. *Toxicon.* 1996;34: 827–842.
 77. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon.* 2013;62: 27–39. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.006
 78. Ward RJ, Chioato L. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂ : biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochem J.* 2002;362: 8.
 79. Almeida JR, Palacios ALV, Patiño RSP, Mendes B, Teixeira CAS, Gomes P, et al. Harnessing snake venom phospholipases A₂ to novel approaches for overcoming antibiotic resistance. *Drug Dev Res.* 2019;80: 68–85. doi:10.1002/ddr.21456
 80. Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;170: 10.

81. Stábeli RG, Amui SF, Sant'Ana CD, Pires MG, Nomizo A, Monteiro MC, et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2006;142: 371–381. doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.020
82. Páramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerdá J, Bengoechea J-A, Gorvel J-P, Moreno E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Eur J Biochem*. 1998;253: 452–461. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2530452.x
83. Costa TR, Menaldo DL, Oliveira CZ, Santos-Filho NA, Teixeira SS, Nomizo A, et al. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. 2008; 13.
84. de Moura AA, Kayano AM, Oliveira GA, Setúbal SS, Ribeiro JG, Barros NB, et al. Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* Snake Venom with Toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells. *BioMed Res Int*. : 14.
85. Torres AFC, Dantas RT, Toyama MH, Filho ED, Zara FJ. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. 2010; 10.
86. Barros GAC, Pereira AV, Barros LC, Jr AL, Calvi SA, Santos LD, et al. *In vitro* activity of phospholipase A₂ and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *J Venom Anim Toxins Trop Dis*. 2015;21: 48. doi:10.1186/s40409-015-0049-0
87. Passero LFD, Tomokane TY, Corbett CEP, Laurenti MD, Toyama MH. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol Res*. 2007; 8.
88. Podešvová L, Leštinová T, Horáková E, Lukeš J, Volf P, Yurchenko V. Suicidal *Leishmania*. *Pathogens*. 2020;9: 79.
89. Nunes DCO, Figueira MMNR, Lopes DS, Souza DLND, Izidoro LFM, Ferro E a. V, et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*. 2013;140: 844–854. doi:10.1017/S0031182013000012

90. Almeida JR. A novel synthetic peptide inspired on Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates. *Eur J Med Chem.* 2018; 9.
91. Gebrim LC, Marcussi S, Menaldo DL, Nomizo A, Hamaguchi A, Silveira-Lacerda EP, et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A₂-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. 2009; 9.
92. Peña MS, de Almeida R, Borbor C. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTITUMORAL Y ANTIMICROBIANO DE PEQUEÑOS PÉPTIDOS CATIONICOS BIOINSPIRADOS EN FOSFOLIPASAS DE VENENOS DE SERPIENTES. Tesis, Universidad Regional Amazónica Ikiam. 2019.
93. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS). Leishmaniasis - Informe Epidemiológico de las Américas. 2018 p. 8. Report No.: 7.
94. Maia-Elkhoury A, Branco S, Nicholls S, Puppim L, Sanchez M. Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas [Internet] Organización Panamericana de la Salud. Washington; 2019.
95. Osorio D, Rondón-Villarrea P, Torres R. Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides. *R J.* 2015;7.
96. RStudioTeam. 2020. Available: <http://www.rstudio.com/>.
97. GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows. 2020.
98. Parra LLL, Bertonha AF, Severo IRM, Aguiar ACC, de Souza GE, Oliva G, et al. Isolation, Derivative Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Anti-Parasitic Bromopyrrole Alkaloids from the Marine Sponge *Tedania brasiliensis*. *J Nat Prod.* 2018;81: 188–202. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00876
99. Mendes B. Potential use of 13-mer peptides based on phospholipase and oligoarginine as leishmanicidal agents. *Comp Biochem Physiol.* 2019; 9.
100. WHO | Leishmaniasis. In: WHO [Internet]. World Health Organization; [cited 14 Aug 2020]. Available: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
101. Barreto-Santamaría A, Patarroyo ME, Curtidor H. Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019;56: 351–373. doi:10.1080/10408363.2019.1631249

102. Deptuła M, Wardowska A, Dzierżyńska M, Rodziewicz-Motowidło S, Pikuła M. Antibacterial Peptides in Dermatology—Strategies for Evaluation of Allergic Potential. *Molecules*. 2018;23: 414. doi:10.3390/molecules23020414
103. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018;154: 394–406. doi:10.1111/imm.12889
104. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet*. 2008;35: 179–192. doi:10.1111/j.1744-313X.2008.00765.x
105. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol*. 2016;37: 724–737. doi:10.1016/j.it.2016.08.010
106. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach. *PLOS Comput Biol*. 2008;4: e1000048. doi:10.1371/journal.pcbi.1000048
107. Alencar LRV. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Mol Phylogenet Evol*. 2016; 13.
108. Lockard RD, Wilson ME, Rodríguez NE. Sex-Related Differences in Immune Response and Symptomatic Manifestations to Infection with *Leishmania* Species. *J Immunol Res*. : 15.
109. Guerrero E, Saugar JM, Matsuzaki K, Rivas L. Role of Positional Hydrophobicity in the Leishmanicidal Activity of Magainin 2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48: 2980–2986. doi:10.1128/AAC.48.8.2980-2986.2004
110. Jin L, Bai X, Luan N, Yao H, Zhang Z, Liu W, et al. A Designed Tryptophan- and Lysine/Arginine-Rich Antimicrobial Peptide with Therapeutic Potential for Clinical Antibiotic-Resistant *Candida albicans* Vaginitis. *J Med Chem*. 2016;59: 1791–1799. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01264
111. da Silva AVR, De Souza BM, dos Santos Cabrera MP, Dias NB, Gomes PC, Neto JR, et al. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2014;1838: 2357–2368. doi:10.1016/j.bbamem.2014.06.012
112. Konno K, Rangel M, Oliveira JS, dos Santos Cabrera MP, Fontana R, Hirata IY, et al. Decoralin, a novel linear cationic α -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides*. 2007;28: 2320–2327. doi:10.1016/j.peptides.2007.09.017

113. Rinaldi AC, Giulio AD, Liberi M, Gualtieri G, Oratore A, Bozzi A, et al. Effects of temporins on molecular dynamics and membrane permeabilization in lipid vesicles. *J Pept Res.* 2001;58: 213–220. doi:10.1034/j.1399-3011.2001.00896.x
114. Oliveira M, Gomes-Alves AG, Sousa C, Marani MM, Plácido A, Vale N, et al. Ocellatin-PT antimicrobial peptides: High-resolution microscopy studies in antileishmania models and interactions with mimetic membrane systems. *Biopolymers.* 2016;105: 873–886. doi:10.1002/bip.22925
115. Pinto EG, Pimenta DC, Antoniazzi MM, Jared C, Tempone AG. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2013;135: 655–660. doi:10.1016/j.exppara.2013.09.016
116. Lozano JM, Cuadrado BS, Delgado G, Patarroyo ME. Cationic peptides harboring antibiotic capacity are selective for *Leishmania panamensis* and *Leishmania major*. *J Microb Biochem Technol* ISSN 1948-5948 Vol 6 No 2 2014 Pp 54-62. 2014.
117. Routier FH, Higson AP, Ivanova IA, Ross AJ, Tsvetkov YE, Yashunsky DV, et al. Characterization of the Elongating α -d-Mannosyl Phosphate Transferase from Three Species of *Leishmania* Using Synthetic Acceptor Substrate Analogues. *Biochemistry.* 2000;39: 8017–8025. doi:10.1021/bi000371s
118. Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages. *J Immunol.* 2007;178: 1077–1085. doi:10.4049/jimmunol.178.2.1077
119. Muxel SM, Mamani-Huanca M, Aoki JI, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, López-González Á, et al. Metabolomic Profile of BALB/c Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*: Deciphering L-Arginine Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 6248. doi:10.3390/ijms20246248
120. Aoki JI, Muxel SM, Zampieri RA, Müller KE, Nerland AH, Floeter-Winter LM. Differential immune response modulation in early *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c and C57BL/6 macrophages based on transcriptome profiles. *Sci Rep.* 2019;9: 19841. doi:10.1038/s41598-019-56305-1
121. da Silva ER, da Silva MFL, Fischer H, Mortara RA, Mayer MG, Framesqui K, et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;159: 104–111. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.02.011
122. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin Lesions of Patients with American Cutaneous

- Leishmaniasis. *Infect Immun.* 2002;70: 4638–4642. doi:10.1128/IAI.70.8.4638-4642.2002
123. Closs EI, Boissel J-P, Habermeier A, Rotmann A. Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *J Membr Biol.* 2006;213: 67–77. doi:10.1007/s00232-006-0875-7
 124. da Silva MFL, Floeter-Winter LM. Arginase in Leishmania. In: Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM, Kneipp LF, Sodré CL, editors. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. pp. 103–117. doi:10.1007/978-94-007-7305-9_4
 125. Castilho-Martins EA, Silva MFL da, Santos MG dos, Muxel SM, Floeter-Winter LM. Axenic *Leishmania amazonensis* Promastigotes Sense both the External and Internal Arginine Pool Distinctly Regulating the Two Transporter-Coding Genes. *PLOS ONE.* 2011;6: e27818. doi:10.1371/journal.pone.0027818
 126. Abdossamadi Z, Seyed N, Rafati S. Mammalian host defense peptides and their implication on combating *Leishmania* infection. *Cell Immunol.* 2016;309: 23–31. doi:10.1016/j.cellimm.2016.10.001
 127. Marr AK, Cen S, Hancock REW, McMaster WR. Identification of Synthetic and Natural Host Defense Peptides with Leishmanicidal Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60: 2484–2491. doi:10.1128/AAC.02328-15
 128. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11: 3919–3931.
 129. Kückelhaus SAS, de Aquino DS, Borges TK, Moreira DC, Leite L de M, Muniz-Junqueira MI, et al. Phylloseptin-1 is Leishmanicidal for Amastigotes of *Leishmania amazonensis* Inside Infected Macrophages. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17: 4856. doi:10.3390/ijerph17134856