



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE FORMAS PARASITARIAS DE *Leishmania***

**BERNARDA SORAYA CUADRADO CANO**

**Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín**

**Facultad de Ciencias**

**Área curricular de Biotecnología**

**Maestría en Biotecnología**

**Medellín, Colombia**

**2012**



# **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE FORMAS PARASITARIAS DE *Leishmania***

**BERNARDA SORAYA CUADRADO CANO**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Biotecnología**

Director:

**DrSc. JOSÉ MANUEL LOZANO MORENO**

Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín

Facultad de Ciencias

Área curricular de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Medellín, Colombia

2012



*En la vida a diferencia del ajedrez, el juego  
continúa después del jaque mate.*

*Isaac Asimov*



## Agradecimientos

Posiblemente mi memoria no sea suficiente para recordar a todos aquellos que estuvieron a mi lado o que participaron en la realización de este trabajo, solo espero sepan disculparme.

Gracias Dios por permitirme cumplir y llevar a feliz término todo mi proceso.

A mamá, Jorge, Rosmery y William por el amor y la paciencia que me tuvieron, acompañándome y brindándome incondicionalmente su apoyo.

Al Doctor José Manuel Lozano Moreno mi tutor, por brindarme su amistad, apoyo incondicional, colaboración y orientación a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la señora Leydi Londoño secretaria del programa, quien en todo momento me brindó su amistad y su completa colaboración, así como todo al personal docente y administrativo del programa Curricular de Maestría en Biotecnología en la Sede Medellín de la Universidad Nacional de Colombia.

A la Doctora Luisa Fernanda Parada y a todo el personal de la Oficina de Bienestar Universitario de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por estar al pendiente de mí y colaborarme durante mi proceso de traslado a la Sede Medellín.

A las Doctoras Sonia Ospina y Martha Fontanilla, Socorro, Raquel, Jacky, Claudia, Anyta y mis compañeros Jorge y Lady en el IBUN de la Sede Bogotá, por toda su colaboración y consejos.

A Albita, Adelita, Elisita, Guillermo, Luis Fernando, Germán y demás personal del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá, por abrirme sus corazones, brindarme su amistad y apoyo incondicional en esos días fríos en Bogotá.

A mis amigos María Teresa, Mercedes, Martha, Germán, Harold, Erika, Cherlys en Cartagena, por su amistad, apoyo y consejos permanentes.

Al personal administrativo de la Universidad de Cartagena y en especial al Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Doctor Gabriel Acevedo, al Vicerrector Académico Doctor Edgar Parra Chacón y al Señor Rector de la Universidad de Cartagena Doctor Germán Sierra, por creer en mí y brindarme su completa ayuda y apoyo en todo momento.

A la Doctora Lucy Gabriela Delgado Murcia y a los miembros de su grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia por sus orientaciones y permitirme trabajar en su laboratorio durante el tiempo que duró el desarrollo del proyecto.

A los Grupos Funcionales de Biocatálisis y Química-Síntesis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) quienes a través de mi tutor el Doctor José Manuel, suministraron algunas de la células y todos los péptidos empleados en este estudio.

A los Doctores Iván Darío Vélez, Sara Robledo e integrantes de su grupo Programa de Estudio Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia por la asesoría y colaboración en el desarrollo de los ensayos y en el suministro de insumos biológicos que permitieron hacer los correspondientes ensayos.

A la Doctora Marta Stella Ayala, por toda la colaboración brindada y paciencia cuando necesité de sus cepas de colección para incluirlas en este trabajo.

A mis evaluadores, Drs. Juan Fernando Alzate y Blanca Fabiola Espejo Benavides, por sus oportunas sugerencias que permitieron mejorar este documento.

A todos ellos y a quienes ahora posiblemente no recuerdo, pero no olvidaré,

MUCHAS GRACIAS....



## Resumen

En este estudio se sintetizaron 16 péptidos antimicrobianos de origen natural, evaluándose su efecto sobre las células J774, U937, monocitos de sangre periférica humana, HeLa y HepG2, hematíes y actividad antileishmanial en promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) major*. Melitina, Bombinina, Mastoparán 8 (MP-8), MP-X y Dermaseptina S1 disminuyeron la viabilidad de los monocitos/macrófagos a mayores concentraciones (CI<sub>50</sub> de 20.9 a 49.9 µg/mL) que el isotionato de Pentamidina (CI<sub>50</sub>, de < 3.4 a 20.5 µg/mL). Melitina, Bombinina, Dermaseptina S1, MP-8 y Péptido antimicrobiano traqueal (TAP) fueron los más efectivos sobre la forma de promastigotes de *L. (V.) panamensis* (CE<sub>50</sub> entre 7.6 y 46.3 µg/mL) y *L. (L.) major* (CE<sub>50</sub> entre < 6.3 y 42.1 µg/mL), con selectividad de Polistes Mastoparán (MA) y Taquiplesina I en *L. (L.) major*. Se seleccionaron como promisorios con índice de selectividad (IS) >1 y concentración hemolítica 50 superior a 50 µg/mL a MP-8, Bombinina, Dermaseptina S1 y TAP activos sobre ambas especies del parásito y a Taquiplesina I y Polistes MA selectivamente sobre *L. (L.) major*.

**Palabras clave:** *Leishmania*, Leishmaniasis cutánea, Péptidos antimicrobianos, *Leishmania panamensis*, *Leishmania major*.

## Abstract

In this study we synthesized 16 naturally occurring antimicrobial peptides, evaluating their effect on J774, U937, human peripheral blood monocytes, HeLa and HepG2 cells. Assays for hemolytic and antileishmanial activity on promastigotes of *L. (V.) panamensis* and *L. (L.) major* were conducted. Melittin, Bombinin, Mastoparan 8 (MP-8), MP-X and Dermaseptin S1 were able of decreasing the viability of monocytes/macrophages at higher concentrations (IC<sub>50</sub> of 20.9 to 49.9 mg / mL) regarding Pentamidine isothionate

(IC<sub>50</sub> of <3.4 to 20.5 mg / mL). Melittin, Bombinin, Dermaseptin S1, MP-8 and tracheal antimicrobial peptide (TAP) were the most effective peptides on promastigotes of *L. (V.) panamensis* (EC<sub>50</sub> between 7.6 and 46.3 ug/mL) and *L. (L.) major* (EC<sub>50</sub> between <6.3 and 42.1 ug / mL). Polistes Mastoparan (MA) showing selectivity as well as tachyplestin I on *L. (L.) major*. These later were selected as promising taking into account their Selectivity Index (SI) > 1 and hemolytic concentration HC 50 higher than 50 mg / mL for MP-8, Bombinin, Dermaseptin S1 and TAP respect to both parasite species and peptides Tachyplestin I and Polistes MA displaying selectivity for *L. (L.) major*.

**Keywords:** *Leishmania*, cutaneous leishmaniasis, Antimicrobial peptides, *Leishmania panamensis*, *Leishmania major*.

# Contenido

	Pág.
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Contenido .....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
1.1 Objetivo general .....	7
1.2 Objetivos específicos.....	7
<b>2. Marco teórico y estado del arte .....</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Leishmania</i> y Leishmaniasis.....	8
2.1.1 Taxonomía de la <i>Leishmania</i> .....	9
2.1.2 Ciclo biológico y morfología del parásito.....	9
2.1.3 Manifestaciones clínicas.....	17
2.1.4 Tratamiento de la leishmaniasis .....	18
2.2 Metodologías para el tamizaje de medicamentos antileishmaniales .....	20
2.3 Desarrollo de estrategias antileishmaniales: Péptidos antimicrobianos con actividad antileishmanial.....	22
<b>3. Metodología .....</b>	<b>33</b>
3.1 Selección y síntesis de los Péptidos antimicrobianos de origen natural.....	33
3.1.1 Síntesis de los Péptidos antimicrobianos.....	33
3.1.2 Selección de los controles.....	37
3.1.3 Estudio bioinformático y determinación del porcentaje de identidad, similitud y homología con proteínas humanas.....	38
3.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre células nucleadas y anucleadas.....	39
3.2.1 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células eucariotas nucleadas .....	40
3.2.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los eritrocitos de origen humano .....	43
3.3 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las formas de promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> y <i>L. (L.) major</i> .....	44

---

3.3.1 Cultivo de promastigotes de los parásitos .....	44
3.3.2 Ensayos de efectividad <i>in vitro</i> de los Péptidos antimicrobianos sobre los promastigotes de <i>Leishmania</i> .....	44
3.4 Análisis estadístico .....	46
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>47</b>
4.1 Estudio bioinformático y determinación del porcentaje de identidad y similitud y relación de homología con proteínas humanas .....	47
4.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células eucariotas nucleadas .....	56
4.2.1 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre monocitos/macrófagos .....	56
4.2.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células HeLa .....	63
4.2.3 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células HepG2 .....	65
4.3 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los eritrocitos .....	67
4.4 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre la forma de promastigotes de <i>Leishmania</i> .....	70
<b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>85</b>
5.1 Conclusiones .....	85
5.2 Recomendaciones .....	87
<b>Bibliografía .....</b>	<b>88</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-2:</b> Clasificación taxonómica de la <i>Leishmania</i> .....	10
<b>Figura 2-2:</b> Morfología de las formas promastigote y amastigote del parásito de <i>Leishmania spp.</i> .....	12
<b>Figura 3-2:</b> Ciclo de vida de la <i>Leishmania</i> .....	14
<b>Figura 4-2:</b> Mecanismos propuestos de la acción de los Péptidos antimicrobianos sobre las membranas celulares .....	24
<b>Figura 5-2:</b> Blancos y efectos del ataque de los Péptidos antimicrobianos en los promastigotes de <i>Leishmania</i> .....	25
<b>Figura 6-3:</b> Fotografías de las células utilizadas para la evaluación de la actividad de los Péptidos antimicrobianos .....	41
<b>Figura 7-4:</b> Análisis filogenético de los péptidos Andropina, Cecropina A y TAP .....	54
<b>Figura 8-4:</b> Alineamiento pareado entre el péptido TAP y la $\beta$ -Defensina 4A mediante el uso del programa ClustalW (1.0.3) .....	55
<b>Figura 9-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células J774 .....	57
<b>Figura 10-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células U937 fenotipo adherente .....	59
<b>Figura 11-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células U937 fenotipo no adherente. ....	60
<b>Figura 12-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre monocitos de sangre periférica humana (MSHP) .....	61
<b>Figura 13-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células HeLa .....	64
<b>Figura 14-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células HepG2 .....	66
<b>Figura 15-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los hematíes 0+ .....	68
<b>Figura 16-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los promastigotes de <i>Leishmania (V) panamensis</i> .....	71
<b>Figura 17-4:</b> Cambios morfológicos inducidos por los Péptidos antimicrobianos en los promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> y observados con microscopio invertido – 20 X. ....	72
<b>Figura 18-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los promastigotes de <i>Leishmania (L.) major</i> .....	75

## Lista de tablas

Pág

<b>Tabla 1-3:</b> Secuencia, peso molecular (Da), fuente, actividad antileishmanial descrita y tendencia de estructura secundaria obtenida por experimentos con Dicroísmo circular de los Péptidos antimicrobianos que fueron evaluados y el péptido no relacionado o CLIP. ....	35
<b>Tabla 2-4:</b> Péptidos antimicrobianos y resultados de la predicción de actividad antibacteriana, porcentaje de hélice $\alpha$ , cálculo de la carga neta y tendencia de estructura secundaria obtenida mediante experimentos de dicroísmo circular. ....	49
<b>Tabla 3-4:</b> Péptidos antimicrobianos y resultados del alineamiento con proteínas de origen humano. Número de acceso y longitud de la proteína humana con la que se presentó mayor alineamiento, valor-E, máximo score y porcentaje de identidad. ....	50
<b>Tabla 4-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre la viabilidad celular de monocitos/macrófagos de origen humano y murino luego de 72 horas de exposición.....	58
<b>Tabla 5-4:</b> Alteración de la motilidad, cambios morfológicos y porcentaje de los mismos, inducidos por los Péptidos antimicrobianos en los promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> a las 5, 24 y 72 horas de exposición a la máxima concentración utilizada en las prueba de efectividad (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). ....	73
<b>Tabla 6-4:</b> Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre la viabilidad de los promastigotes de <i>Leishmania (V.) panamensis</i> y <i>L. (L.) major</i> , después de 72 horas de exposición.....	76
<b>Tabla 7-4:</b> Efecto sobre la viabilidad de las células y los promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> y <i>L. (L.) major</i> e índice de selectividad (IS) de los Péptidos antimicrobianos luego de 72 horas de exposición. ....	79
<b>Tabla 8-4:</b> Péptidos antimicrobianos y efectividad sobre promastigotes de <i>Leishmania</i> reportados y comparados con los encontrados en el presente estudio, expresados en $\mu\text{M}/\text{mL}$ . ....	81

## Introducción

La Leishmaniasis, un complejo grupo de enfermedades son causadas por protozoos del género *Leishmania* (*L.*) transmitidos a través de la picadura de un insecto hematófago. Los parásitos tienen dos formas, una extracelular y móvil llamada promastigote, que se desarrolla y madura dentro del intestino del insecto vector y, una forma intracelular e inmóvil denominada amastigote, presente en los fagocitos del hospedero vertebrado, en donde es capaz de sobrevivir indefinidamente, reactivándose en algunos de los casos años más tarde y produciendo nuevamente un cuadro infeccioso con síntomas más intensos que los que se vieron en la fase inicial (Ashford, 2000; Spath et al., 2003).

Las estadísticas de la OMS revelan que el número de personas infectadas con leishmaniasis sobrepasa los 20 millones, reportándose anualmente alrededor de dos millones nuevos casos de los cuales, 1.5 millones corresponden a la manifestación cutánea. (World Health Organization, 2010). Estos datos subestiman la realidad de la afección, ya que solo se cuenta el 20% de los casos, es decir, los datos reales pueden ser cuatro a cinco veces más altos que los que están siendo reportados (World Health Organization, 2008; Instituto Nacional de Salud, 2009), estimándose una mortalidad alrededor de 60000 personas (principalmente asociado a la forma visceral) y en riesgo de contraer esta enfermedad a alrededor de 350 millones de personas (World Health Organization, 2009). Dentro de los factores que han contribuido al subregistro mundial de esta enfermedad, se encuentran: 1) la distribución discontinua de la enfermedad en las diferentes zonas de transmisión, la cual está relacionada con la presencia del vector, 2) que numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, 3) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva, 4) el número de personas infectadas pero asintomáticas es mucho mayor que el número de sintomáticas y para agravar la situación, 5) la leishmaniasis solo es de notificación obligatoria en 52 de los 98 países donde es endémica, dentro de los cuales, 85 están en vía de desarrollo (World Health Organization, 2009).

---

Los focos de leishmaniasis cutánea (LC) están ampliamente dispersos en el mundo, con transmisión a humanos en los cinco continentes pero con concentración de los brotes en unos pocos lugares, en especial en zonas con climas tropicales y subtropicales. Alrededor del 90% de los casos de LC ocurren solo en 12 países, dentro de los que están Afganistán, Argelia, Irán, Arabia Saudita y Siria y en América, Bolivia, Brasil, Colombia, Nicaragua y Perú. En América hay casos registrados desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, con excepción de Chile y Uruguay. La distribución de la enfermedad se a da a nivel mundial y se reportó recientemente un incremento de su incidencia en países como Colombia, Nicaragua y Pakistán (World Health Organization, 2010). En Colombia, la mayoría de los casos de LC son causados principalmente por *L. Viannia panamensis* (Ovalle et al., 2006), mientras que en viejo mundo (Europa, Asia y África) o Afro-Eurasia, es atribuida principalmente a dos especies *L. (L.) major* y *L. (L.) tropica* (Mencia-Gutierrez et al., 2005).

El incremento en la incidencia mundial de la leishmaniasis y en especial de la LC está relacionado con: las dificultades para el control de los vectores y reservorios, los factores de riesgo asociados a los cambios ambientales y con ellos, a las migraciones masivas de la población hacia áreas donde la enfermedad es endémica, al desarrollo urbano, los conflictos nacionales e internacionales, la tala de árboles, los nuevos esquemas de irrigación, la carencia de vacunas efectivas (Kedzierski, 2010), y al desarrollo de resistencia a la quimioterapia, entre otros. Factores de riesgo individual también contribuyen al incremento de la incidencia, como son la desnutrición, los aspectos genéticos y la coinfección por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH), entre otros (Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Desjeux, 2004).

En Colombia, la leishmaniasis es una patología endémica en casi todo el territorio, excepto en San Andrés Islas, Atlántico y Bogotá D.C. (Ministerio de Protección Social de Colombia, 2011), estimándose que existen alrededor de 10 millones de personas en riesgo, con transmisión principalmente en las zonas rurales. La incidencia ha aumentado progresivamente y es así que mientras en la década de los 90 se notificaban cada año al Sistema de Vigilancia del Sistema de Salud del Instituto Nacional de Salud (SIVIGILA) en promedio 6500 casos nuevos de leishmaniasis; en el año 2010, se registraron 14772



---

casos y en el año 2011, 8188 casos de leishmaniasis de los cuales, un 98.0% correspondió a LC, 1.8% a leishmaniasis mucocutánea (LMC) y 0.2% a leishmaniasis visceral (LV) (Instituto Nacional de Salud, 2011), y cuyo número puede ser superior debido a que en estos datos no se incluyeron los casos de las fuerzas militares.

En el aumento de la presencia del vector en el país y por lo tanto en la aparición de brotes de la enfermedad, influyeron los cambios climáticos ocurridos en la zona nororiental de Colombia (Cárdenas et al., 2006). Las actividades militares y el conflicto armado también contribuyeron al incremento de la incidencia de estas enfermedades, con 45000 casos de soldados con LC en los años 2005 a 2010, (World Health Organization, 2010). En el 2010, se identificó como enfermedad de mayor impacto, con 1120 casos por cada 100000 usuarios del servicio de salud de las fuerzas militares (Fuerzas Militares de Colombia, 2011).

La leishmaniasis produce una carga de enfermedad de 2.35 millones de AVAD (años de vida ajustados por discapacidad), de los cuales el 2.3% recae sobre las Américas, siendo una de las más altas (Pan American Health Organization, 2012). Las manifestaciones cutáneas y mucocutáneas, deforman y desfiguran a tal grado, que los pacientes pueden verse socialmente aislados (World Health Organization, 2009), y como la LC no es fatal, poca o ninguna atención recibe para mejorar su control a nivel individual o social, siendo tratada en la actualidad con indiferencia.

El único control que existe es la detección y el tratamiento de los casos clínicos mediante el uso de sales de antimonio pentavalente principalmente (medicamentos de primera línea), pero estas presentan desventajas que incluyen: una larga duración del tratamiento (varias semanas), dolorosa administración parenteral, efectos tóxicos algunas veces severos, alto costo del tratamiento, difícil disponibilidad y necesidad de administración de los medicamentos por el mismo paciente, entre otras, situaciones que hacen que el paciente reduzca su confianza en la seguridad del tratamiento, la adhesión al mismo, conduciendo al abandono y finalmente contribuyendo a una reducción en la eficacia, al aumento de la morbilidad y mortalidad (para casos con LV) y a incrementar el riesgo de resistencia (Croft and Yardley, 2002; World Health Organization, 2010), eventos que

ocurren particularmente en los países de bajos ingresos y que en la mayoría de las naciones, rara vez se denuncia de forma sistemática.

Debido al poco o ningún interés que tiene la industria farmacéutica en invertir en la investigación y desarrollo de medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis, la cual afecta principalmente a las personas pobres en los países en desarrollo; y sumado a ello, las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, la variedad de especies de parásitos, el difícil control del vector y de los reservorios, el incremento de resistencia a los tratamientos de primera elección usados actualmente; los efectos secundarios, los altos costos de los medicamentos alternativos como la anfotericina B y el isotionato de pentamidina y la ausencia de una vacuna (Croft and Yardley, 2002; Minodier and Parola, 2007; World Health Organization, 2010), hace imperiosa la búsqueda de estrategias terapéuticas para reemplazar o complementar los existentes. En el caso de la LC, la eficacia de los actuales medicamentos es limitada y el uso de medicamentos tópicos y la inmunoterapia son opciones que vale la pena considerar (World Health Organization, 2010).

Por todo lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ([www.who.int](http://www.who.int)) a través de su Programa Especial para la Investigación en Enfermedades Tropicales y conocido como Tropical Diseases Research (<http://apps.who.int/tdr/>) y Enfermedades Huérfanas o Desatendidas como el Neglected Tropical Diseases ([http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)), en colaboración con diferentes Organizaciones No Gubernamentales (ONGs) como el Drug for neglected Disease initiative (<http://www.dndi.org/>) y One World Health (<http://www.oneworldhealth.org/>), declararon como prioridad, la investigación en el descubrimiento y desarrollo de nuevos tratamientos que sean accesibles, seguros, eficientes, de corta duración, fáciles de administrar y a un costo razonable para mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad (World Health Organization, 2010).

Los Péptidos Antimicrobianos son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata de los organismos, aislados de mamíferos, pájaros, anfibios, crustáceos, peces, insectos, plantas y microorganismos (Hancock and Diamond, 2000). La anfipaticidad de los péptidos les permite interactuar con las membranas cargadas negativamente, causando

---

la directa desestabilización de la superficie de las membranas con formación de poros y posterior lisis de la célula (Bera et al., 2003; Brogden, 2005; Kulkarni et al., 2006; Kulkarni et al., 2009); aunque también se les han descrito propiedades quimiotácticas, que les permiten modular el sistema inmune y de esta forma constituir un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Debido a todas esas propiedades, es que se han iniciado estudios considerando la posibilidad de utilizar esta clase de moléculas como nuevos fármacos en diferentes tipos de enfermedades infecciosas (Epanand and Vogel, 1999; Rosengren et al., 2002; Bradford and Kulkarni, 2010) y en particular en el tratamiento de la leishmaniasis, amparados en el amplio espectro antimicrobiano que presentan (Brogden et al., 2003); a los bajos niveles para desarrollar resistencia debido a su mecanismo de acción principal sobre los fosfolípidos membranales y la dificultad que tienen los microorganismos modificar la estructura de la misma (Gordon et al., 2005; Yount and Yeaman, 2005) y finalmente, a la posibilidad de encontrar medicamentos dentro de este grupo de moléculas, con propiedades que superen las desventajas de los medicamentos actualmente disponibles.

Se han identificado los siguientes Péptidos antimicrobianos con actividad antileishmanial sobre *L. (L.) major*, la especie que causa el mayor número de casos de LC en Afro-Eurasia: Dermaseptinas (Brand et al., 2006; Savoia et al., 2008; Zampa et al., 2009; Perez-Cordero et al., 2011), Bombininas (Mangoni et al., 2006), Maganinas, Catelicidinas, Defensinas (Boulanger et al., 2004; Mangoni et al., 2005; Kulkarni et al., 2006), Temporinas (Mangoni et al., 2005), Decoralina (Konno et al., 2007) y una Catelicidina, el Péptido Antimicrobiano Mieloide Bovino 28 o BMAP-28 y sus dos esteroisómeros D-BMAP-28 y RI-BMAP-28 (Lynn et al., 2011).

En el continente americano, se han identificado especies tanto de los subgéneros *Leishmania* como del *Viannia (V.)* como causantes de LC. Los Péptidos antimicrobianos con actividad antileishmanial sobre promastigotes de *L. (L.) amazonensis*, una especie del subgénero *Leishmania* compleja mexicana, son: Gomesina, Phyloseptina-1 y algunos péptidos relacionados con la Dermaseptina (Mandard et al., 2002; Brand et al., 2006; Kuckelhaus et al., 2009). Dentro de los péptidos activos sobre las especies del subgénero *Viannia (V.)* compleja panamensis están: Taquiplesina, Maganina, Clavanina, Penadeina, Mytilina en *L. (V.) braziliensis* (Lofgren et al., 2008), y Dermaseptina, Pr-2 y

---

Pr-3 (derivados de protamina) en *L. (V.) panamensis* (Perez-Cordero et al., 2011). En un modelo de infección de células dendríticas con *L. (V.) panamensis* se reportó también actividad de los péptidos antimicrobianos Andropina y Cecropina A (Perez-Cordero et al., 2011), llevando a concluir que en la actualidad hay relativamente pocos estudios que hayan evaluado la actividad de los péptidos antimicrobianos sobre *L. (V.) panamensis*, el agente que causa la mayor prevalencia de LC en Colombia. El identificar la actividad de secuencias peptídicas sobre *L.(V.) panamensis*, algunas de ellas sin descripción previa de actividad biológica y de otras a las que anteriormente se les había reportado una actividad antimicrobiana, o sobre especies de *Leishmania* diferentes a *L.(V.) panamensis* y comparándolas con la actividad sobre *L.(L.) major* el principal agente etiológico de LC en Afro-Eurasia, permitió conocer péptidos promisorios con actividad selectiva sobre el parásito que causa el mayor número de casos de leishmaniasis en Colombia.

Este trabajo evaluó a modo de tamizaje, la actividad antileishmanial in vitro de 16 Péptidos Antimicrobianos sintéticos de origen natural sobre las formas extracelulares de *L.(V.) panamensis* y *L.(L.) major*, concluyendo acerca del potencial uso terapéutico en LC de Mastoparán 8 (MP-8), Bombinina, péptido antimicrobiano traqueal (TAP) y Dermaseptina S1 sobre *L. (V.) panamensis*, y MP-8, Bombinina, TAP, Dermaseptina S1 Polistes Mastoparán (MA) y Taquiplesina I sobre *L. (L.) major*, los cuales serán evaluados posteriormente en estudios de efectividad in vitro utilizando líneas celulares humanas y en un modelo de infección in vivo en hámster. Adicional al estudio de su actividad antileishmanial, se identificó mediante el uso de herramientas bioinformáticas, el porcentaje de identidad, similitud y la relación de homología de los péptidos con proteínas humanas y, mediante ensayos in vitro, el efecto que inducen sobre hematíes de origen humano y células de diferente origen (humano y murino) debido a que se espera que el efecto antileishmanial se presente a concentraciones en las cuales no sea deletéreo ni para las células hospedadoras (macrófagos) ni para el resto de células de origen humano, lo que favorecería su futuro uso en el pacientes con LC.

El presente proyecto dio respuesta a la siguiente hipótesis: al menos uno de los Péptidos antimicrobianos sintéticos de origen natural evaluado es efectivo sobre *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) major*, constituyéndose en una propuesta de alternativa terapéutica para la LC.

# 1. Objetivos

## 1.1 Objetivo general

Identificar *in vitro* Péptidos antimicrobianos sintéticos de origen natural con potencial antiparasitario sobre diferentes especies de *Leishmania*.

## 1.2 Objetivos específicos

- Seleccionar Péptidos antimicrobianos sintéticos de diferentes fuentes naturales, algunos de ellos con actividad previamente descrita sobre *Leishmania* y evaluar el porcentaje de identidad, similitud y su homología con proteínas humanas.
- Establecer el perfil de actividad *in vitro* de 16 Péptidos antimicrobianos a las diferentes concentraciones utilizadas, sobre células nucleadas (Líneas celulares U937 fenotipos adherente y no adherente, HeLa, HepG2, J774 y monocitos de sangre periférica humana) y no nucleadas (hematíes).
- Identificar los Péptidos antimicrobianos sintéticos que afectan menos la viabilidad las células hospedadoras, de epitelio, hepáticas y sanguíneas humanas.
- Identificar la actividad *in vitro* de los péptidos sobre *Leishmania* (CE50) a través de ensayos sobre las formas de promastigotes de *L. (V) panamensis* y *L. (L) major*.

## 2. Marco teórico y estado del arte

### 2.1 *Leishmania* y Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades que se caracterizan por su diversidad a nivel clínico y epidemiológico, siendo causadas por cerca de 22 especies de protozoos del género *Leishmania*, pertenecientes a la familia Trypanosomatidae (Croft et al., 2006) y agrupadas en dos subgéneros: *Leishmania* (*L.*) con especies principalmente en Afro-Eurasia y, *Viannia* (*V.*) restringidas al continente americano.

La *Leishmania* es transmitida por la picadura de dípteros de la familia Psychodidae, un pequeño insecto hematófago del género *Phlebotomus spp.* en Europa, Asia y África y *Lutzomia spp.* en América (Ashford, 2000); con reservorios mamíferos que incluyen marsupiales, caninos, roedores, equinos, primates y otros animales salvajes, aunque en América hay evidencia que el humano actúa como reservorio de la enfermedad. El cuadro clínico que se produce al parasitar principalmente las células del sistema fagocítico mononuclear, depende de la especie del parásito infectante, del tamaño del inóculo y de la respuesta inmune del hospedero, produciendo patrones clínicos diferenciables: LC, LMC (ulceración de la piel e hiperdesarrollo de las membranas mucosas) e infecciones viscerales generalizadas o LV (Desjeux, 2004; Murray et al., 2005).

La leishmaniasis en Suramérica ha afectado ancestralmente a poblaciones andinas y selváticas desde antes de la llegada de los españoles. Las primeras descripciones clínicas de dicha patología datan del siglo XVI, donde se describe como una enfermedad que destruye la nariz y las cavidades nasales (Sánchez-Saldaña et al., 2004), siendo hasta principios del siglo XIX cuando Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan,

Wright Lindenberg y Vianna, cada uno y de forma independiente, identificaron al parásito causante de la enfermedad y al que Ronald Ross dio el nombre genérico de *Leishmania* (World Health Organization, 2010). En 1904, Cathoire y Laveran encontraron el protozoo en niños con anemia esplénica infantil y al que Nicolle dio el nombre de *Leishmania infantum*, estableciendo a su vez a los perros como su reservorio. Hacia el año de 1912, Carini encontró el parásito en lesiones de la mucosa de pacientes con leishmaniasis en Brasil y dos años más tarde, los rusos Yakimoff y Shakor lograron distinguir a los parásitos causantes de LC en Asia Central. Posteriormente, con el transcurrir de los años y gracias a estudios realizados sobre diferentes vectores, animales de experimentación, entornos ecológicos, entre otras variables, se lograron identificar en la especie humana, las características clínicas y geográficas de la enfermedad (World Health Organization, 2010).

### **2.1.1 Taxonomía de la *Leishmania***

La validez del esquema taxonómico de estos protozoos flagelados causantes de las leishmaniasis, ha sido cuestionado en innumerables oportunidades a través del tiempo (Fraga et al., 2010) y aunque todavía existe bajo estudio un número de especies aún no bien clasificadas y causantes de enfermedades en humanos, algunos autores tienen puntos de encuentro (Figura 1-2)

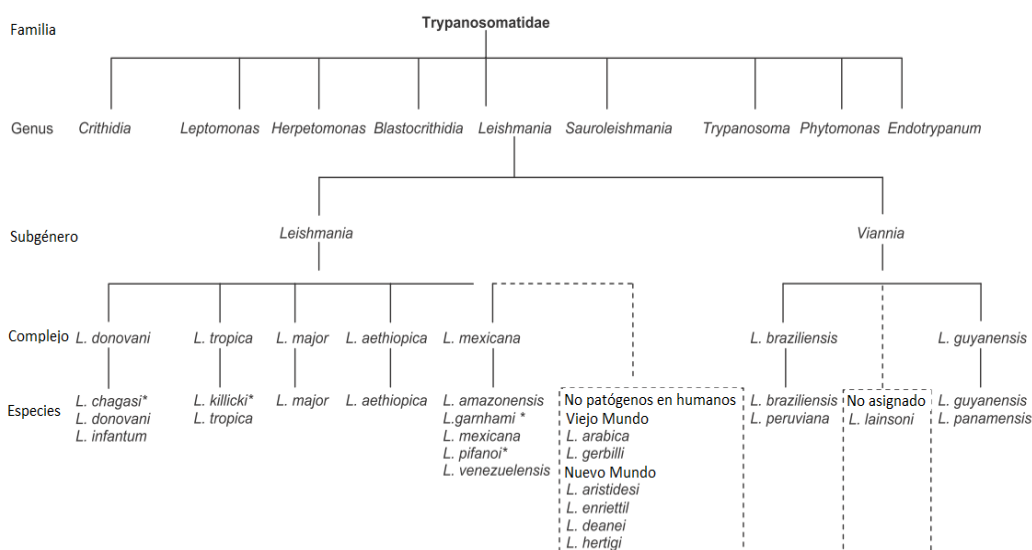
Dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de reproducción del parásito en el tracto digestivo del vector: subgénero *Leishmania* con desarrollo suprapilórico y subgénero *Viannia* de multiplicación peripilórica (Fraga et al., 2010).

### **2.1.2 Ciclo biológico y morfología del parásito**

De acuerdo con el Ministerio de Protección Social de Colombia (Ministerio de Protección Social de Colombia, 2011), en la actualidad se acepta existen diferentes ciclos de transmisión con condiciones eco-epidemiológicas en cada uno de ellos: la leishmaniasis cutánea zoonótica de transmisión selvática, la leishmaniasis cutánea zoonótica y antroponótica de transmisión peridoméstica y la leishmaniasis cutánea urbana. La forma visceral se caracteriza por estar restringida a ciertas áreas

geográficas y al igual que la LC, se ha iniciado su proceso de urbanización. A continuación se describen estos ciclos:

**Figura 1-2:** Clasificación taxonómica de la *Leishmania*



\* Especies en estado bajo discusión. *L. chagasi* en el Nuevo Mundo es la misma *L. infantum*

(Adaptado de WHO, 2010)

- Leishmaniasis cutánea zoonótica de transmisión selvática: el humano se infecta cuando penetra el bosque y es picado por los insectos vectores, siendo un huésped accidental que no interviene en el ciclo de transmisión. Estos casos se presentan de manera predominante entre personas de edad adulta, preferiblemente varones, que por sus actividades laborales deben entrar en áreas selváticas húmedas que son deforestadas y alteradas al paso del humano.
- Leishmaniasis cutánea zoonótica y antroponótica de transmisión peridoméstica: se presenta a nivel rural por la adaptación de los vectores a los ambientes domiciliarios y peridomiciliarios. El vector habita y se reproduce en cultivos y criaderos de animales en cercanía de las casas, facilitando su interacción con cualquier miembro del núcleo familiar, produciéndose con mayor frecuencia, casos de leishmaniasis cutánea en mujeres y niños.



- Leishmaniasis cutánea urbana: que se presenta en diversos países del mundo, incluyendo América Latina, entre ellos Colombia, siendo señalada como la urbanización de la leishmaniasis. Inicialmente se da la colonización con el arribo de los reservorios infectados, estableciéndose la transmisión y la aparición de los casos autóctonos (Ministerio de Protección Social de Colombia, 2011).

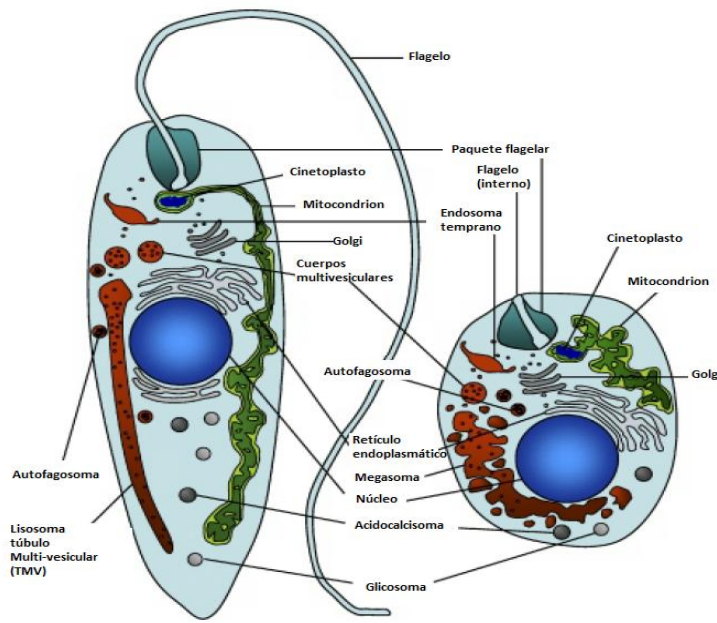
La *Leishmania* tiene un ciclo de vida digenético o sea donde alternan las formas de promastigote flagelado y amastigote aflagelado. El promastigote tiene una longitud de aproximadamente 10 a 15  $\mu\text{m}$  y un ancho de dos a tres micras, con un núcleo central, un flagelo externo anterior rodeado de membrana plasmática de longitud similar al cuerpo del parásito (15 a 25  $\mu\text{m}$ ) y un cinetoplasto ubicado en el extremo anterior, en la proximidad del origen del flagelo (Figura 2-2). La forma de promastigote se multiplica dentro del intestino medio de los flebotomos o insecto vector, donde pasa a través de diferentes estados fisiológicos desde promastigotes procíclicos, nectomónadas, haptomónadas, paramastigotes y culminando en la forma de promastigote metacíclico, el cual no se divide, está preadaptado para la vida en el huésped mamífero y migra finalmente a la parte anterior del sistema digestivo (Muskus et al., 1997) permaneciendo allí hasta ser inoculado (Ashford, 2000; Spath et al., 2003). Durante su crecimiento y desarrollo en el mosquito vector, se ha identificado que el promastigote de *Leishmania* puede experimentar un intercambio genético y transmitir un estado infeccioso híbrido al huésped mamífero (Akopyants et al., 2009).

El amastigote aflagelado es inmóvil, intracelular obligado y se multiplica preferiblemente dentro de los macrófagos y otras células del sistema fagocítico mononuclear del huésped, desarrollando la enfermedad (Ashford, 2000; Spath et al., 2003). Tiene forma redondeada u ovoide de dos a seis micras de diámetro, con un núcleo, un cinetoplasto puntiforme y un flagelo interno, este último solo visible al microscopio electrónico (Figura 2-2)

Los promastigotes procíclicos están cubiertos por un glicocálix grueso de 7 nm de espesor pero el de los promastigotes metacíclicos es aún más grueso con aproximadamente 17 nm de espesor, mientras que los amastigotes prácticamente no tienen este material. El glicocálix está compuesto por glicoproteínas y otras sustancias glicosiladas que se encuentran ancladas a la membrana celular por una unión de

glicosilfosfatidil inositol o GPI. Una de las moléculas más importantes de la superficie de los promastigotes es el lipofosfoglicano (LPG); básicamente está compuesto por unidades repetitivas de un disacárido y un grupo fosfato, unidos a la membrana por el ancla de GPI, identificándose que las variaciones en las cadenas laterales que se unen a la estructura central de LPG son importantes entre las distintas especies de *Leishmania*. El LPG de *L. (L.) major* tiene una estructura altamente ramificada, mientras que el de *L. (L.) donovani* prácticamente no tiene ramificaciones. El LPG juega un papel importante en la supervivencia del parásito y en la modulación de la respuesta inmune del huésped (Olivier et al., 2005).

**Figura 2-2:** Morfología de las formas promastigote y amastigote del parásito de *Leishmania spp.*



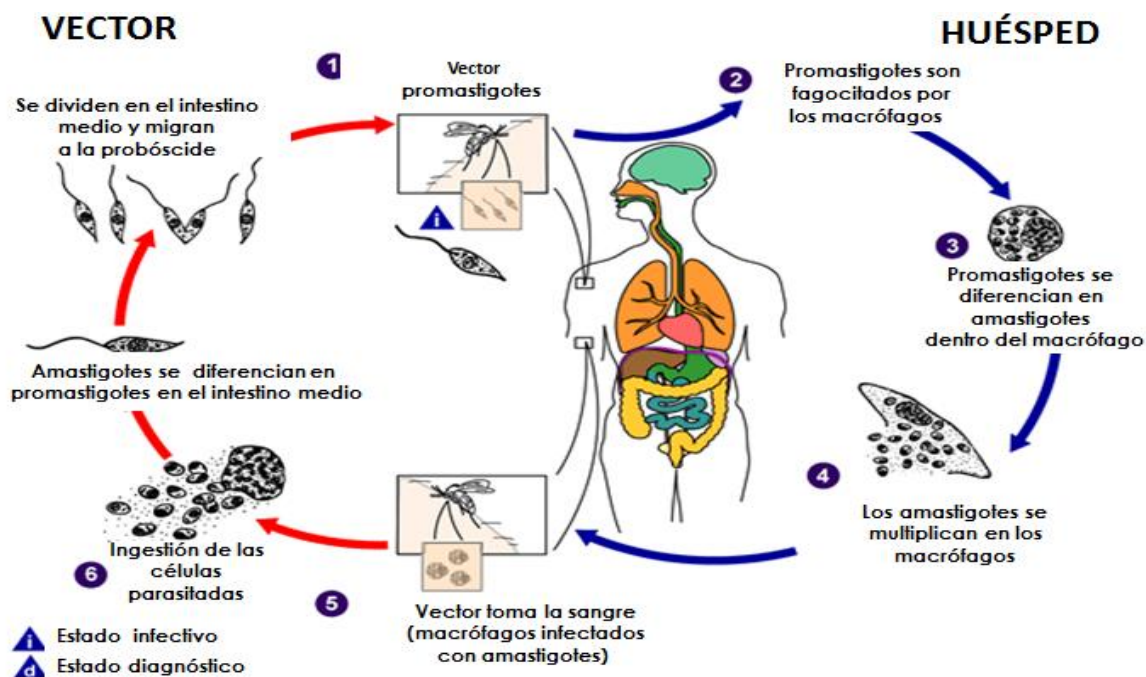
(Adaptado de Besteiro, 2007).

La glicoproteína 63 (Gp63) o leishmanolisina es una proteinasa de superficie de 63 kDa, se expresa en grandes cantidades (más de 500 mil copias) y está distribuida en todo el cuerpo del promastigote incluyendo el flagelo (Lieke et al., 2008), y a pesar de esto, es 10 veces menos frecuente que el LPG. La Gp63 es una metaloproteinasa de zinc con un amplio rango de sustratos tales como caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina y

fibrinógeno (Olivier et al., 2005). La Gp63 se relaciona con la entrada del parásito al macrófago, favorece la fagocitosis, la sobrevivencia del amastigote dentro del macrófago y afecta la función del complemento aumentando la resistencia del parásito a la lisis mediada por complemento (Lieke et al., 2008). La molécula más abundante en la superficie de los promastigotes es el glicoinositolfosfolípido (GIPL), un tipo de glicolípido con un ancla de glicosilfosfatidil inositol o GPI. El GIPL es 10 veces más abundante que el LPG, sin embargo, su pequeño tamaño lo mantiene cerca de la membrana celular y cubierto por las moléculas de LPG; se cree que tiene un rol protector en la superficie del promastigote (Olivier et al., 2005).

Los promastigotes metacíclicos son inyectados dentro de la piel de los vertebrados cuando los mosquitos hembras toman sangre para alimentarse, inoculando junto con su saliva entre 600 a 100000 promastigotes metacíclicos presentes en su probóscide (Kimblin et al., 2008) (Figura 3-2). La picadura del mosquito causa una especie de hemorragia que inicia como respuesta, un fuerte proceso inflamatorio local y reclutamiento eventual de neutrófilos y monocitos. Los promastigotes inducen a los macrófagos a secretar MCP-1 y CXCL1 que actúan como quimiotácticos para monocitos y neutrófilos respectivamente. Los neutrófilos son reclutados dentro de los primeros minutos después de la entrada de los promastigotes y los capturan, pero algunos parásitos no alcanzan a ser destruidos e inician de forma eficiente la infección (Mougneau et al., 2011).

Los promastigotes interactúan con las células residentes: macrófagos dérmicos, queratinocitos y células de Langerhans, adhiriéndose a una variedad de receptores de membrana de las células hospedadoras: receptores CR3, CR1 específicos para las moléculas del complemento (C3b, C3bi y C4b), y Fc-γR específico para la región Fc de los isotipos de IgG unidos a los parásitos opsonizados, dando lugar a la internalización de los promastigotes por la vía fagocítica convencional (McConville and Naderer, 2011; Mougneau et al., 2011).

**Figura 3-2:** Ciclo de vida de la *Leishmania*

(Adaptado de Centers for Disease Control & Prevention. Parasites and Health <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>)

Generalmente se asume que los macrófagos son las principales células infectadas por *Leishmania*, también pueden internalizar al parásito los monocitos, células dendríticas derivadas de los monocitos, eosinófilos, neutrófilos y fibroblastos presentes en las lesiones inflamatorias y en los nódulos linfáticos (McConville and Naderer, 2011).

Una vez internalizados los promastigotes por las células del sistema fagocítico y como resultado de una fusión altamente regulada, se hace la fisión de los endosomas tempranos y tardíos y de estos con los lisosomas, dando lugar a la formación de una vacuola parasitófora con pH ácido (pH 4.7 – 5.2) que contiene los marcadores de un fagolisosoma maduro: LAMP-1, LAMP-2 y rab7p (McConville and Naderer, 2011; Mougneau et al., 2011).

La maduración del fagolisosoma puede ser retrasado de forma transitoria por los promastigotes de algunas especies (por ej: *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani*, pero no por *L. (L.) mexicana*), dependiendo este mecanismo del LPG presente en la superficie de la

membrana del promastigote. El LPG retrasa la formación o la alteración de los microdominios lipídicos en la membrana del fagosoma, permitiendo que los promastigotes internalizados se diferencien a amastigotes y se multipliquen por fisión binaria en la vacuola parasitófora de estas células. El número de amastigotes puede variar dependiendo de la célula, de modo que mientras los macrófagos parecen ser los más permisivos y a menudo contienen más de 10 amastigotes por célula; otros fagocitos profesionales y no profesionales (células dendríticas, eosinófilos y fibroblastos) generalmente pueden soportar pocos parásitos, en promedio de 1 a 3 amastigotes por célula (McConville and Naderer, 2011; Mougneau et al., 2011).

Durante las primeras semanas de la infección y antes del desarrollo de la inmunidad adquirida, la *Leishmania* evade la respuesta inmune de las células del sistema fagocítico, (demostrado en varios modelos murinos de infección y en humanos) de modo que el número de parásitos se incrementa marcadamente (Belkaid et al., 2000). Se ha propuesto que uno de los mecanismos por medio de los cuales el parásito evade la respuesta inmune es por la expresión de fosfatidilserina (PS) en la membrana celular, tanto de promastigotes en el inóculo (van Zandbergen et al., 2006) como en los amastigotes en las lesiones, simulando un fenómeno de apoptosis (de Freitas Balanco et al., 2001). La presencia de PS les permite a los promastigotes y amastigotes ser reconocidos por las células fagocíticas dando lugar a la inducción de la producción de citocinas antiinflamatorias y a una regulación negativa de las citocinas proinflamatorias (Voll et al., 1997; Fadok et al., 1998), conduciendo a una reducción de la inflamación y con ella a la diseminación del parásito.

La inmunidad protectora contra *Leishmania* ha sido asociada predominantemente al IFN- $\gamma$  y a la producción de interleucina 12 (IL-12) por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la subpoblación de células T ayudadoras Tipo 1 (Th1). El IFN- $\gamma$  es conocido como el factor de activación de los macrófagos y la adición de estas citocinas a los macrófagos infectados con *Leishmania* lleva a la muerte de los parásitos. También hay evidencias de la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas en el control de la infección por *Leishmania* (Paul, 1993; Paredes et al., 1997). La liberación de citocinas proinflamatorias como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-12 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) conducen a la activación de una potente actividad antileishmanial basada en la síntesis de la enzima

óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y al estallido oxidativo en las células hospedadoras, llevando por consiguiente a una disminución de la parasitemia.

En contraste a lo anterior, el predominio de la activación de la subpoblación de células T ayudadoras Tipo 2 (Th2) y la producción de IL-4 están asociadas con la progresión de la infección por *Leishmania* en animales de experimentación. La promoción de la respuesta (Th2) da lugar a la producción de citocinas IL-4 e IL-13 y/o de la IL-10 antiinflamatoria, que lleva a que el parásito no sea destruido, se diferencie al estado de amastigote y se multiplique activamente dentro del compartimiento ácido intracelular, lisando eventualmente las células que los contienen y quedando libres para infectar diferentes células y tejidos adyacentes, dando lugar a las manifestaciones clínicas y no curación de las lesiones. Esta respuesta inmune Th2, permite a los parásitos de *Leishmania* persistir en múltiples tejidos aún después de la cura espontánea o la resolución posterior al tratamiento de la enfermedad, de modo que los parásitos que sobreviven pueden conferir inmunidad a una futura reinfección en humanos y animales, pero también pueden ser fuente de recrudescencia si los mecanismos protectores de las células T fallan, como ocurre en casos severos de HIV/AIDS. (McConville and Naderer, 2011).

Dependiendo de la especie de *Leishmania* inoculada se producen entonces las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad, con un período de incubación en las formas cutánea y mucocutánea entre tres semanas y seis meses y en la forma visceral hasta dos años (Russell and Talamas-Rohana, 1989; Desjeux, 2004; Mitropoulos et al., 2010). Y finalmente, cuando el vector se alimenta de este huésped vertebrado infectado, ingiere junto con la sangre, amastigotes presentes en las células de la piel, que en el intestino de los flebótomos comienzan rápidamente un proceso de diferenciación morfológica hacia el estado de promastigotes, emigrando hasta la probóscide del mismo, pudiendo ser inoculados a otro huésped vertebrado y cerrando así el ciclo (Figura 3-2). (Mahoney et al., 1999; Zapata Lesmes et al., 2005)

En resumen, la *Leishmania* ha desarrollado evolutivamente mecanismos de resistencia que comprenden en los flebótomos, la evasión de enzimas digestivas, y en el huésped vertebrado la evasión a la respuesta inmune (sistema del complemento y mecanismos de defensa mediados por óxido nítrico e intermediarios reactivos de oxígeno dentro de los

macrófagos), todo esto para poder existir en dos entornos muy diferentes y hostiles, los cuales normalmente están listos para destruir agentes patógenos (Kulkarni et al., 2006; Brodie et al., 2007).

### 2.1.3 Manifestaciones clínicas

La leishmaniasis humana se presenta clínicamente de varias formas que van desde la más común, la cutánea autolimitada y asintomática pasando por una desfigurante mucocutánea y debilitante, hasta la forma más severa, la sistémica que si no es tratada a tiempo es fatal en un 95% de los casos. Estas manifestaciones clínicas dependen de factores del parásito como son: el tropismo de la especie, su capacidad infectiva, patogenicidad y virulencia; también de factores dependientes del vector como el número de picaduras, de la situación inmunitaria y susceptibilidad genética del huésped (Awasthi et al., 2004). De esta manera la infección puede ser clasificada de forma general en tres síndromes clínicos, la cutánea o LC, mucocutánea o LMC y visceral o LV, viéndose incrementado el riesgo de tener la enfermedad, por la presencia de coinfección con VIH (Desjeux and Alvar, 2003).

En América, diferentes especies de *Leishmania* de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* producen un amplio rango de manifestaciones clínicas de LC, con variación de la prevalencia entre las distintas regiones y aunque algunas formas clínicas son más frecuentemente asociadas con una particular especie o subgénero, ninguna manifestación clínica es exclusivamente producida por una sola especie de parásito. Una sustancial pero variable proporción de infecciones son asintomáticas y una vez se ha instaurado la enfermedad, las formas clínicas pueden incluir la aparición de lesiones localizadas, diseminadas, difusas y mucocutáneas atípicas (World Health Organization, 2010).

En cualquier parte del cuerpo pueden producirse lesiones únicas o múltiples, pero generalmente se originan como una mácula en el sitio de inoculación, seguida por una pápula que se ulcera y expande hasta producir un nódulo o una típica lesión crateriforme de forma redondeada a oval; desarrollándose semanas, meses y aún años después de la picadura del mosquito. El compromiso linfático se manifiesta como una linfadenitis o una linfadenopatía y es común en lesiones causadas por especies del subgénero *Viannia*.

Las lesiones causadas por *L. (L.) mexicana* con frecuencia curan espontáneamente dentro de tres a cuatro meses, mientras que las producidas por las especies del subgénero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* pueden curar sin tratamiento después de seis meses. Las lesiones cutáneas secundarias o mucosas frecuentemente están asociadas a infección con *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*, aunque pueden ser también el resultado de la infección por otras especies. La LC puede ser causada por *L. (L.) infantum* (ó *L. (L.) chagasi*) pero las lesiones asociadas con esta especie causante de LV son a menudo atípicas, presentándose como nódulos o placas localizadas que caen dentro del espectro clínico de las lesiones causadas por especies dermatrópicas de las Américas. La LC causada por *L.(L.) infantum* se reporta principalmente en Centroamérica y se da entre adolescentes y adultos jóvenes en áreas endémicas para LV, mientras que la manifestación visceral (LV) se da predominantemente en niños por debajo de los cinco años de edad (Vélez and Agudelo, 1996; World Health Organization, 2010).

#### **2.1.4 Tratamiento de la leishmaniasis**

El problema del control de la leishmaniasis se relaciona con el difícil control del vector y los reservorios, la no disposición de vacunas y fármacos para prevenirla, el desarrollo de resistencia al medicamento por parte del parásito, las dificultades para su administración, el incremento en la frecuencia y severidad de los efectos secundarios de las sales de antimonio pentavalente (primera elección) y el hecho que la efectividad del tratamiento se obstaculiza por la localización de los amastigotes dentro del macrófago. Los estudios adelantados con medicamentos inyectables, orales y tópicos han arrojado resultados inconsistentes y de poca utilidad en las Américas (Soto and Soto, 2006).

La OMS, a través de su comité de expertos estableció en su reporte técnico número 949 del 2010, el empleo de diversos fármacos, vacunas y otras estrategias no medicamentosas para el tratamiento de la leishmaniasis. Dentro de las recomendaciones propuestas se encuentra la utilización de antimoniales pentavalentes (estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina), anfotericina B, paromomicina, pentamidina, miltefosina, azoles (ketoconazol, fluconazol, itraconazol), vacunas profilácticas (de primera y segunda generación y vacunas caninas), vacunas terapéuticas y la



inmunoquimioterapia (World Health Organization, 2010). Diversos estudios ponen de manifiesto la efectividad en mayor o menor grado de otras herramientas para el control de la leishmaniasis, entre las que se destacan alopurinol (Morales et al., 2002), medicamentos de tipo quinoleínas (Loiseau et al., 2011), rifampicina, dapsona, aminosidina (Sánchez-Saldaña et al., 2004), sitamaquina, alcaloides (isoquinolínicos, indólicos, naftilisoquinolínicos, bencilisoquinolínicos, benzoquinolicidínicos, esteroidales, pirrolidínicos, diterpénicos,  $\beta$ -carbolínicos, derivados de esponjas marinas, entre otros) (Mishra et al., 2009), terpenos, fenoles, isoniacida, ciclosporina, anticuerpos monoclonales, péptidos antimicrobianos, electrodesecación, métodos quirúrgicos (Mitropoulos et al., 2010), zinc, radiofrecuencia, crioterapia y termoterapia (Reithinger et al., 2005).

Los tratamientos recomendados son diferentes para cada una de las tres formas clínicas de leishmaniasis y existen dos modalidades en la LC denominados, tratamiento local y sistémico y la elección del mismo dependerá de la posibilidad de diseminación a las mucosas, de la localización, del número, del tamaño, la evolución y cronicidad de las lesiones (Ricciardi, 2009).

El tratamiento local incluye métodos físicos como el uso de rayos infrarrojos, el láser de dióxido de carbono (Babaev and Babaeva, 1985), la diatermocoagulación, la criodisrupción, la electroterapia y el curetaje o remoción quirúrgica (Morsy et al., 1989; Rzany et al., 1990), así como la administración intra o perilesional de drogas como los antimoniales pentavalentes (Oliveira-Neto et al., 1997), ciprofloxacina (Al Hamdi et al., 2010), solución hipertónica de cloruro de sodio (Sharquie, 1995) y los anestésicos locales del tipo lidocaína. Del mismo modo, se ha empleado con controversial éxito la aplicación tópica de fármacos como el ungüento de paramomicina sola y asociada a gentamicina (Hepburn et al., 1994; Grogl et al., 1999), el ungüento de artesunato (Plasmotrim®) (Adam and Hagelnur, 2009) y otros preparados de aplicación local no convencionales como el zinc (Najim et al., 1998); modalidades utilizadas sólo cuando existen escasas lesiones cutáneas. El empleo de la terapia intralesional reduce la cantidad de droga requerida, el costo y la aparición de efectos adversos, pero tiene el inconveniente de requerir de anestesia local al momento de utilizarla (Oliveira-Neto et al., 1997; Ricciardi, 2009).

En la terapia sistémica de la LC se utilizan los derivados antimoniales ya citados, solos o combinados con la aminosidina o paromomicina aprovechando su sinergismo farmacológico (Soto et al., 1998); también el isotionato de pentamidina, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, alopurinol y anfotericina B (AmB®) simple o liposómica (AmBisome®), interferón gamma (Weinrauch et al., 1987; Arana et al., 1994; Correia et al., 1996) y miltefosina como agente oral (Soto and Soto, 2006). Estas terapias están indicadas cuando hay múltiples lesiones o lesiones no susceptibles de ser tratadas perilesionalmente (Ricciardi, 2009).

## **2.2 Metodologías para el tamizaje de medicamentos antileishmaniales**

Los esfuerzos para lograr el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, esenciales en el control de la leishmaniasis, dependen principalmente de la disponibilidad de pruebas in vitro, en las cuales se realiza inicialmente un tamizaje de los compuestos potencialmente efectivos frente los diversos estadios de desarrollo del parásito.

Para evaluar la actividad antileishmanial de una determinada sustancia de interés, se han empleado diferentes metodologías de tamizaje que incluyen el uso de promastigotes, amastigotes axénicos e intracelulares y los modelos ex vivo e in vivo (Croft et al., 2006; Travi, 2009). En el cultivo in vitro de promastigotes, se utilizan medios de cultivo y se incuban a condiciones de temperatura similar al del insecto vector (aproximadamente 26 °C). Este procedimiento es relativamente simple y barato comparado con otros modelos, una herramienta útil como procedimiento primario de selección, da información esencial de la actividad de un medicamento en el ambiente natural del parásito y es comúnmente utilizada y a modo de tamizaje, en la evaluación de los productos naturales y sintéticos con posible actividad antiparasitaria (Serenio et al., 2007).

El modelo de promastigotes permite cuantificar la actividad del medicamento, pudiéndose utilizar un cuenta células o inclusive, evaluar la viabilidad de la población celular mediante el uso de diferentes métodos basados en: el 3 – (4.5 – dimetiltiazol – 2.5 –

difenil tetrazolio) o MTT, la reducción de la rezasurina (Mikus and Steverding, 2000), la actividad de ornitina descarboxilasa, usando un colorante fluorescente como el ioduro de propidio o el p-nitrofenilfosfato (Montalvo et al., 2000) o, mediante clasificación o “sorting” de células fluorescentes activadas (FACS) en un citómetro de flujo (Singh et al., 2009).

En los últimos años, se han utilizado parásitos de *Leishmania* que expresan genes reporteros como luciferasa de luciérnaga (Henaó et al., 2004),  $\beta$ -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa, fosfatasa alcalina y la proteína verde fluorescente (GFP) (Singh et al., 2009; Bolhassani et al., 2011) para facilitar el tamizaje de agentes antileishmaniales, siendo esta tecnología generalmente más sensible que los métodos clásicos (Serenó et al., 2007).

Por otro lado, en los modelos de infección *in vitro*, se aprovecha la habilidad de la *Leishmania* para infectar el huésped vertebrado y de su capacidad de sobrevivir intracelularmente en un macrófago mamífero. Este proceso puede realizarse *in vitro*, empleando diversos tipos de células que fagocitan promastigotes y permiten la morfogénesis intracelular del parásito al estadio de amastigote. En los modelos *in vitro* de infección se han utilizado macrófagos de origen humano de las líneas U937 (Rey et al., 1990) ) y THP-1 (Dasgupta et al., 2003), derivados de monocitos y de médula ósea humana, murinos de las líneas RAW 264.7 (Trun et al., 2006) y J774 (Azzouz et al., 2005) o células dendríticas (Perez-Cordero et al., 2011) mostrando ser una estrategia adecuada para evaluar de forma rápida, fácil y segura un gran número de compuestos con potencial actividad antileishmanial. Para la evaluación de la capacidad infectante *in vitro*, se hace necesario el empleo de promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, ya que en este momento son más virulentos (Serenó et al., 2007).

En resumen, para que un procedimiento de tamizaje sea eficiente y exhaustivo, requiere de condiciones que imiten lo más cercanamente posible el ambiente encontrado en la célula blanco. Las formas intracelulares de *Leishmania* (amastigotes) pueden representar las condiciones ideales y su uso, dar información esencial de la capacidad de los medicamentos para hacer blanco en los organismos intracelulares, ayudando de esta forma a eliminar algunos errores causados por las condiciones de cultivo. Y aunque existen diferencias significativas entre promastigotes y amastigotes en bioquímica y susceptibilidad a los medicamentos estándar (Croft et al., 2006), el uso de la forma

extracelular o de promastigote es útil como un indicador de la potencial toxicidad de sustancias con actividad antileishmanial y continúa brindando información sobre el potencial efecto en el parásito, siendo empleado como una estrategia inicial de selección (Muniaraj et al., 2010), y utilizado rutinariamente en la mayoría de los trabajos donde se ha evaluado la actividad antileishmanial de los Péptidos antimicrobianos (McGwire and Kulkarni, 2010).

### **2.3 Desarrollo de estrategias antileishmaniales: Péptidos antimicrobianos con actividad antileishmanial**

El término “Péptido antimicrobiano” describe a un péptido con propiedades antimicrobianas. La mayoría de los reportados (alrededor de 2000) (Wang and Wang, 2009) y aislados de todos los reinos de la naturaleza, son catiónicos (polares), con propiedades electronegativas y/o aniónicas propias y regiones hidrofóbicas espacialmente separadas y cargadas, estructura que caracteriza el mecanismo de acción principal propuesto que es el de actividad sobre la membrana plasmática (Yount and Yeaman, 2005). En el amplio sentido de la palabra, el término “Péptido antimicrobiano” se refiere a todos los oligo o polipéptidos que matan microorganismos o inhiben su crecimiento, incluyendo aquellos que resultan del clivaje de grandes proteínas o que son sintetizados no ribosomalmente (Koczulla and Bals, 2003).

Los Péptidos antimicrobianos pueden ser agrupados de acuerdo a su longitud, estructura y presencia de puentes disulfuro, sin embargo, la diversidad de estas moléculas es tan grande que es difícil categorizarlas dentro de una clasificación aceptada por todos. Basados en su global composición y estructura en 3D, pueden dividirse en cinco grupos: 1) formadores de hélices  $\alpha$ , 2) formadores de hebras o láminas  $\beta$ , 3) ricos en residuos de cisteína, 4) ricos en aminoácidos naturales cargados (histidina, arginina y prolina) y 5) ricos en compuestos de aminoácidos modificados o no naturales (Boman, 1995; Reddy et al., 2004; Beisswenger and Bals, 2005).

A pesar de ser estructuralmente diversos, los Péptidos antimicrobianos contienen relativamente altos porcentajes de aminoácidos básicos. Péptidos como Defensinas y

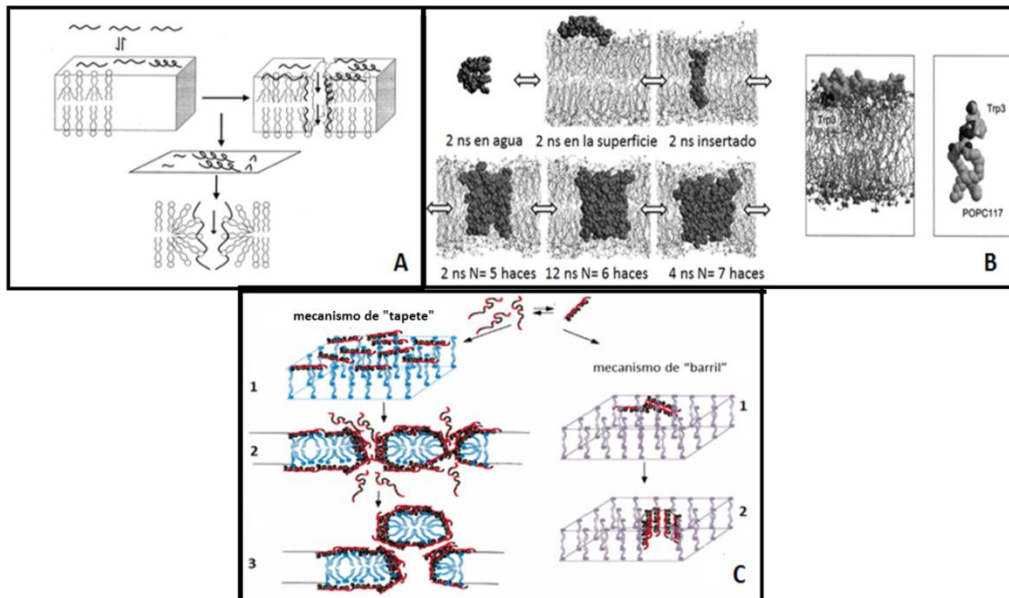
algunas Catelicidinas son ricos en cisteína que permiten la formación de enlaces disulfuro con una importante actividad antimicrobiana (Martin et al., 1995).

Estos Péptidos tienen un amplio espectro antimicrobiano y su anfipaticidad les permite interactuar con las membranas microbianas con una carga negativa neta dando lugar a la desestabilización directa de la superficie de las membranas a través de una variedad de mecanismos (La Rocca et al., 1999; Shai, 1999; Sitaram and Nagaraj, 1999; Brogden, 2005) (Figura 4-2). La mayoría de los péptidos interactúan con la superficie de la membrana y causan perturbación directa provocando lisis y muerte celular por autofagia, necrosis o apoptosis (Bera et al., 2003; Yount and Yeaman, 2005; Kulkarni et al., 2006; Kulkarni et al., 2009). Los péptidos también pueden entrar a las células y asociarse con organelos intracelulares dando lugar a efectos pleiotrópicos en las rutas metabólicas y bioenergéticas (Luque-Ortega et al., 2001; Luque-Ortega et al., 2008), activar las reacciones inflamatorias, estimular a las células de la respuesta inmunitaria innata (neutrófilos, células epiteliales y queratinocitos), así como a las que sirven de puente entre la respuesta innata y la adaptativa (monocitos, macrófagos y células dendríticas), reforzando, inhibiendo o complementando funciones tales como la quimiotaxis, la apoptosis, la transcripción de genes y la producción de citocinas, que generan la eliminación de los microorganismos, aunque no por la vía de la citotoxicidad directa (Brown and Hancock, 2006). En el caso de la *Leishmania* (Figura 5-2), se ha identificado que Péptidos antimicrobianos estructuralmente diferentes, tienen efecto sobre el parásito por inducción de muerte apoptótica y no-apoptótica. La muerte por apoptosis es debida a una masiva delocalización del calcio intracelular que conduce a una toxicidad mitocondrial (Kulkarni et al., 2009; McGwire and Kulkarni, 2010).

Sobre diferentes especies de *Leishmania*, se han evaluado un sinnúmero de Péptidos antimicrobianos, mostrando actividad sobre los parásitos: los aislados de anfibios de los géneros *Phyllomedusa* (Dermaseptinas y Phylloseptina (DSHypo-01)) (Hernández et al., 1992; Brand et al., 2006; Savoia et al., 2008; Kuckelhaus et al., 2009), *Bombina* (Bombininas) (Mangoni et al., 2006), *Rana* (Temporinas) (Mangoni et al., 2005; Kulkarni et al., 2006; Abbassi et al., 2008; Kulkarni et al., 2009) y *Xenopus* (Maganinas) (Merrifield, 1964; Guerrero et al., 2004). El péptido prototipo del grupo de las Dermaseptinas es la Dermaseptina-1 que tiene actividad sobre especies de *Leishmania* a concentraciones entre 2.3 a 12.5  $\mu\text{M}$  (Hernandez et al., 1992; Brand et al., 2006; Savoia

et al., 2008). También son efectivos sobre promastigotes de *L. (L.) amazonensis*, seis Péptidos antimicrobianos aislados de la secreción de la piel del anfibio *Phyllomedusa hypochondrialis*, con una longitud entre 24 y 34 aminoácidos y estructuralmente relacionados con la familia de la Dermaseptina (Brand et al., 2006).

**Figura 4-2:** Mecanismos propuestos de la acción de los Péptidos antimicrobianos sobre las membranas celulares.



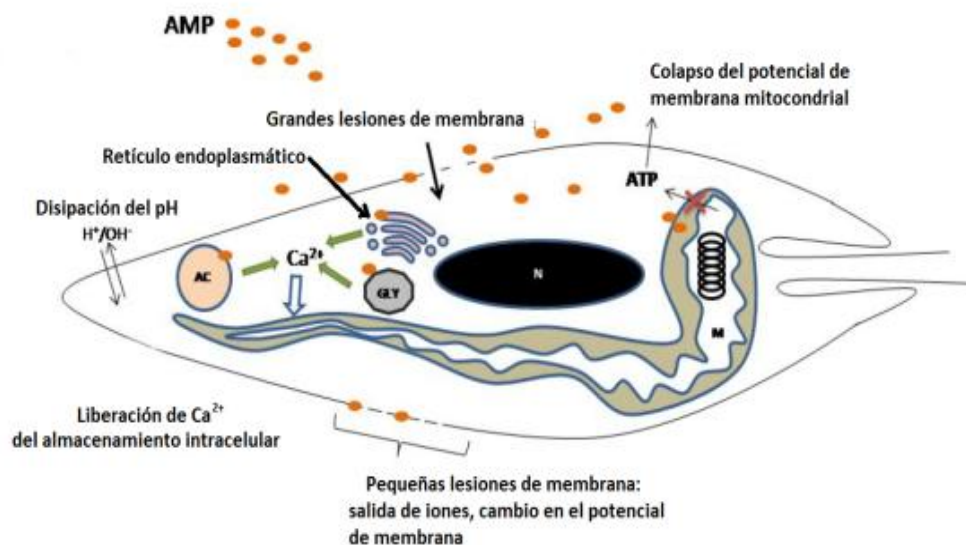
A: interacción, B: permeabilización y C: formación de tapetes moleculares por los mecanismos de tapete y formación de poros en barril. Adaptado de: Sitaram and Nagaraj, 1999, La Rocca et al., 1999 y Shai, 1999.

Las Bombininas H2 y H4 ocasionan una alta desestabilización y permeabilización, pero de manera diferente, en la superficie de la membrana celular de promastigotes y amastigotes; de modo que H4 tiene alta afinidad por las membranas causando daño directo, mientras que H2, forma agregados de láminas o hebras  $\beta$  dentro de la membrana, dando lugar a una menor actividad antiparasitaria (Mangoni et al., 2006).

Péptidos análogos sintéticos de las Maganinas, se utilizaron para demostrar la importancia de la hidrofobicidad posicional sobre la afinidad y agregación de los péptidos dentro de las membranas e identificar el modo cómo esta conduce a una actividad parasitocida (Guerrero et al., 2004). Pexiganan, un péptido análogo sintético de la

Maganina, fue activo sobre *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) major*, causando un incremento en la permeabilidad de la membrana, induciendo una variedad de cambios celulares asociados con apoptosis con activación de las enzimas tipo caspasas y perturbación del potencial de la membrana mitocondrial, llevando a la salida del ATP, a la degradación del ADN (Kulkarni et al., 2006); permitiendo la entrada del péptido al interior del parásito y su asociación con las estructuras citoplasmáticas (Kulkarni et al., 2009). Se demostró que el Pexiganan induce apoptosis causando la muerte del parásito por vías diferentes a las de los péptidos tipo Catelidicinas de los mamíferos, los cuales causan muerte tipo no apoptótica en el parásito (Kulkarni et al., 2009).

**Figura 5-2:** Blancos y efectos del ataque de los Péptidos antimicrobianos en los promastigotes de *Leishmania*



Adaptado de McGwire and Kulkarni, 2010.

Phyloseptina o PS-1, aislado de la secreción de la piel de *Phyllomedusa azurea* demostró ser activo sobre promastigotes de *L. (L.) amazonensis* a concentraciones inferiores a 0.5 µg/mL, un efecto comparable al del antimonio de meglumina, no induciendo citotoxicidad en las células de mamíferos y presentando mayor actividad antileishmanial que otros péptidos evaluados previamente: Taquiplesina I, Clavanina (Lofgren et al., 2008) y Temporinas (Mangoni et al., 2005) y menor, que las Dermaseptinas (Brand et al., 2002; Brand et al., 2006; Savoia et al., 2006; Savoia et al., 2008). Se considera que esta actividad sobre los protozoos se debe a que la Phyloseptina es un péptido amidado, es

policatiónico, lo cual favorece su interacción con las membranas altamente aniónicas del parásito. Experimentos de dicroísmo circular, espectroscopía y resonancia magnética nuclear multidimensional, mostraron que este péptido exhibe conformación no estructurada en solución acuosa, pero en las membranas adopta una conformación en hélice  $\alpha$  (Resende et al., 2008).

Péptidos aislados de insectos también han mostrado actividad antileishmanial in vitro. Los primeros reportes fueron de Cecropina A de *Hyalophora* (Akuffo et al., 1998), el péptido híbrido Cecropina A (1-8) – Melitina (1-18) o CAMEL (Diaz-Achirica et al., 1998) así como análogos del híbrido (Luque-Ortega et al., 2003) y péptidos con modificaciones en el extremo N-terminal (Chicharro et al., 2001). El péptido tipo CAMEL, el N-terminal Octyl-CA (1–7) M (2–9) fue utilizado intravenosamente en perros infectados con *Leishmania*, reduciendo los síntomas y la parasitemia (Alberola et al., 2004), constituyéndose en una de las primeras aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos. El CAMEL causa en los promastigotes un rápido colapso del potencial eléctrico y daño morfológico en la superficie de la membrana por la rápida pérdida del ATP con menores efectos en el potencial de la membrana mitocondrial (Diaz-Achirica et al., 1998).

Otros péptidos activos sobre *Leishmania* son las Defensinas de insectos: Gomesina de hemocitos de tarántula (Silva et al., 2000), Defensina-1, SD-1 de hemolinfa de *Phlebotomus* spp el vector de la *Leishmania* (Boulanger et al., 2004) y Decoralina del veneno de la avispa *Oreumenes decoratus* (Konno et al., 2007).

Se identificó actividad antiparasitaria de diferentes péptidos antimicrobianos derivados de animales acuáticos: Taquiplesina I de *Tachipleus tridentatus*, Maganina de *Xenopus laevis*, Clavanina de *Styela clava*, Penadeina de *Litopenaus vannamei*, Mylitina A de *Mytilus edulis* y factor anti-lipopolisacárido de *Penaeus monodon* sobre promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, utilizando el método de MTT; encontrándose que las Defensinas cíclicas y Mytilina A (de mejillones) y Taquiplesina I (de cangrejo de herradura) actuaban a través de mecanismos desconocidos (Roch et al., 2004; Lofgren et al., 2008). La Taquiplesina I fue el péptido más potente, eliminando completamente los promastigotes a una concentración de 12  $\mu$ M, mientras que Mytilina fue ligeramente activa pero a altas



concentraciones (100  $\mu\text{M}$ ). Los péptidos Taquipesina I y Maganina resultaron ser marcadamente hemolíticos a altas concentraciones, mientras que el resto de los péptidos provocaron una ligera hemólisis (<10% a 50  $\mu\text{M}$ ) (Lofgren et al., 2008).

Un amplio rango de Péptidos antimicrobianos aislados de mamíferos, tienen actividad sobre *Leishmania* y son capaces de inducir muerte celular por diferentes mecanismos. Indolicidina, un péptido rico en triptófano; péptidos de neutrófilos de bovino y dos derivados de seminalplasmina, disminuyeron la motilidad de los promastigotes de *L. (L.) donovani* a concentraciones sub-nanomolares, causando disrupción en el potencial de membrana y del equilibrio entre el pH externo y el interno, alterando ligeramente el potencial en las membranas celulares y no permitiendo que la GFP salga de los promastigotes que expresan esta proteína. Se demostró que estos péptidos son menos activos en los parásitos deficientes en LPG, como también en los parásitos del tipo salvaje en fase de crecimiento estacionario tardío los cuales expresan más LPG; sugiriendo que la carga de la superficie y/o modificaciones causadas por el LPG, influyen en la interacción de los Péptidos antimicrobianos con la superficie de la membrana del parásito (Bera et al., 2003).

Las formas L y D del Péptido antimicrobiano de la glándula salivar humana, Histatina 5 tienen efecto parasitocida en promastigotes y amastigotes de *L. (L.) donovani*. Estos péptidos penetran la membrana del parásito dando lugar a la formación de poros transitorios y reversibles, accediendo al contenido intracelular, localizándose primariamente en la mitocondria, conduciendo a una perturbación dosis-dependiente del potencial de membrana mitocondrial, disminuyendo el consumo de oxígeno y causando depleción del ATP (Luque-Ortega et al., 2008).

Otros péptidos de origen animal son las Catelicidinas: Protegrina 1 de origen porcino, SMAP-18 y -27 de origen ovino, y la  $\theta$  Defensina de origen simiano (con estructura cíclica y enlaces disulfuro), han demostrado actividad sobre cepas salvajes de *L. (L.) major* y *L. (L.) amazonensis* a concentraciones  $\geq 6.5 \mu\text{M}$  (McGwire and Kulkarni, 2010).

A péptidos aislados de plantas y denominados Tioninas, también se les ha demostrado una potente actividad sobre promastigotes de *L. (L.) donovani* causando ruptura de la

membrana celular, afectando la depleción de ATP, sin provocar cambios en la respiración mitocondrial (Berrocal-Lobo et al., 2009).

En un ensayo sobre promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (L.) major* en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, se identificó actividad antileishmanial del Péptido Antimicrobiano Bovino Mieloides 28 (BMAP-28), una Catelicidina de origen bovino, y de dos de sus isómeros, la forma aminoacídica D D-BMAP-28 y la retro-inverso RI-BMAP-28). El péptido BMAP-28 (forma L) es susceptible a degradación por Gp63, a diferencia de los dos isómeros evaluados, D-BMAP-28 y RI-BMAP, que son resistentes a esta metaloproteinasa. Los dos péptidos análogos, alteraron la integridad de la membrana celular de los promastigotes, ocasionando un estado de apoptosis tardía con muerte celular y, en el modelo de infección en macrófagos fueron capaces de reducir la viabilidad de los amastigotes intracelulares, lo que los convierte en potenciales estrategias terapéuticas antileishmaniales (Lynn et al., 2011).

En promastigotes y en un modelo de infección de amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) major* en células dendríticas, dos péptidos derivados del clivaje de protamina, Pr-2 y Pr-3, inhibieron el crecimiento de promastigotes de *L. (V.) panamensis* pero no fueron activos sobre *L. (L.) major*. En el mismo estudio, dos péptidos aislados de insectos, Andropina y Cecropina A presentaron una actividad específica contra la forma intracelular de *L. (V.) panamensis* con un índice de selectividad de 4 y 40 respectivamente. Melitina y Dermaseptina S1 inhibieron el crecimiento de los promastigotes de *L. (L.) major*, pero con un bajo índice de selectividad sobre las formas intracelulares, lo que sugiere que hay diferencias en la sensibilidad a los péptidos entre las especies y entre las formas extracelulares e intracelulares de los parásitos (Perez-Cordero et al., 2011).

En resumen, hasta el momento, se ha demostrado efectividad sobre *L. (L.) major* de los péptidos: Dermaseptinas (Brand et al., 2006; Savoia et al., 2008; Perez-Cordero et al., 2011), Bombininas (Mangoni et al., 2006), Maganinas, Catelicidinas, Defensinas (Boulanger et al., 2004; Mangoni et al., 2005; Kulkarni et al., 2006; Travi, 2009; Lynn et al., 2011), Temporinas (Mangoni et al., 2005), Decoralina (Konno et al., 2007) y derivados de la protamina Pr-2 y Pr-3 (Perez-Cordero et al., 2011).

Sobre las especies causantes de LC en el continente americano y en particular de la forma de promastigotes de *L. (L.) amazonensis*, una especie del subgénero *Leishmania* complejo mexicana, son efectivos los péptidos, Gomesina y Phyloseptina-1 y relacionados con la Dermaseptina (Mandard et al., 2002; Brand et al., 2006; Kuckelhaus et al., 2009). En las especies del subgénero *Viannia (V.)*, complejo panamensis, que involucra a *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis*, se reporta actividad en *L. (V.) braziliensis* de Taquiplesina I, Maganina, Clavanina, Penadeina y Mytilina (Lofgren et al., 2008) y en promastigotes de *L. (V.) panamensis* a Pr-2, Pr-3 y Dermaseptina S1. En un modelo de infección de amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* en células dendríticas se identificó actividad antileishmanial de los péptidos Andropina y Cecropina A (Perez-Cordero et al., 2011).

Al momento de considerar a los Péptidos antimicrobianos como potenciales estrategias terapéuticas, se hace necesario evaluar el porcentaje de identidad, similitud y la relación de homología con proteínas humanas a fin de prevenir una potencial inmunogenicidad péptido-específica y reducir de este modo el riesgo de una reacción autoinmune en el paciente.

El concepto de homología es central en el análisis molecular filogenético y se dice que las secuencias son homólogas si ellas comparten un antecesor común y están relacionadas desde el punto de vista evolutivo. La homología es una descripción cualitativa de la relación y el término “porcentaje de homología” no tiene significado. Hay dos tipos de homología: ortología y parología. Las ortólogas son secuencias homólogas que están en diferentes especies pero ascienden de un gen ancestral común durante eventos de especiación; se ha predicho que las secuencias ortólogas tienen similares funciones biológicas. Las parálogas son secuencias homólogas envueltas en mecanismos de duplicación de genes y se ha predicho que tienen distintas funciones pero relacionadas entre sí (Mahdavi, 2011).

Y mientras que la relación de homología se refiere a identificar si dos secuencias descienden de un origen evolutivo común; la similitud de secuencias, mide el porcentaje de residuos apareados o similares en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (tamaño, carga, hidrofobicidad) o de aquellos sitios en donde es posible realizar cambios entre los residuos mediante el uso de matrices de sustitución. La homología de secuencias

es una conclusión (inferencia) acerca de una relación ancestral común hecha a base de comprobar que existe un grado de similitud lo suficientemente alto entre las secuencias comparadas, de modo que la homología es una afirmación cualitativa (homólogas o no homólogas) y la similitud es un resultado directo de la observación de un alineamiento de secuencias y se cuantifica usando porcentajes (Xiong, 2006; Lopes and Cruz, 2011).

En el alineamiento de secuencias se comparan dos (alineamiento pareado) o más de dos (alineamiento múltiple) secuencias. Este procedimiento busca una serie de residuos o patrones particulares que estén en el mismo orden y es útil para el descubrimiento de información funcional, estructural y evolutiva en las secuencias biológicas. El porcentaje de similitud o la positividad de dos secuencias de proteínas es la suma de los aciertos idénticos más los similares, dividido por la longitud de los alineamientos. El porcentaje de identidad se concluye del número de residuos idénticos dividido por la longitud del alineamiento y en general hay dos enfoques en el alineamiento de secuencias: el alineamiento múltiple y el alineamiento pareado (Mahdavi, 2011).

En la práctica, el decidir a qué nivel de similitud se pueden inferir relaciones de homología no siempre es fácil; la respuesta depende del tipo de secuencias examinadas y de sus longitudes. Desde este punto de vista, las matrices de sustitución son herramientas clave en el proceso de alineamiento, ya que asigna una puntuación a cada acierto o desacierto entre dos letras del alfabeto y, como el alfabeto de las proteínas contiene 20 aminoácidos con diferencias en las secuencias biológicas y en las propiedades bioquímicas que pueden impactar en la estructura de las proteínas, los aciertos o desaciertos entre los aminoácidos, por lo tanto, no se dan por casualidad (Lemaitre et al., 2011).

En los alineamientos de proteínas, las matrices más utilizadas son de las series PAM y BLOSUM; ambas tienen en común que están calibradas para una distancia evolutiva preestablecida. Las matrices PAM (Point Accepted Mutation) se generaron primero y surgieron tras alinear globalmente varias proteínas que se sabía eran homólogas. Las matrices BLOSUM (BLOcks SUBstitution Matrix) parten de una base de datos llamada BLOCKS en donde hay alineamientos locales de estructuras conocidas y cada matriz está optimizada para un porcentaje de identidad diferente. Es

importante notar que números grandes de PAM corresponden a altos valores de divergencia, mientras que en BLOSUM, valores grandes significan un mayor porcentaje de identidad y por lo tanto menor divergencia, de modo que al aumentar la divergencia se dificulta distinguir homólogos de no homólogos; por ejemplo, BLOSUM 80 y PAM 1 son menos divergentes y BLOSUM 45 y PAM 250 son más divergentes. BLOSUM 62, es la matriz más usada en alineamiento de proteínas y se utiliza para encontrar secuencias homólogas que tienen identidad del 62% o menos (Lopes and Cruz, 2011).

Para obtener los mejores alineamientos, se hace necesario introducir y penalizar los agujeros o “gaps”, debido a que su presencia tiene relevancia biológica y refleja que se han dado cambios evolutivos. En alineamientos con proteínas de diferentes longitudes, no debe haber columnas con “gaps”, de modo que para que se de un alineamiento óptimo, los residuos que no coincidan y los “gaps” se deben ubicar en determinadas posiciones de tal forma que se permita el mayor número de aciertos de residuos idénticos y similares (Mahdavi, 2011).

En el alineamiento, se pueden utilizar diferentes bases de datos. UniProtKB (UNiversal PROtein Knowledgebase) es una base de datos de proteínas que tiene dos secciones: Swiss-Prot, en donde las proteínas son anotadas y revisadas manualmente y TrEMBL, de anotación automática y sin revisión. Esta base de datos resultó del consorcio entre Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute (EBI) y Protein Information Resource (PIR). La base de datos UniProt (UniProtKB) es el eje central para la recolección de información funcional de las proteínas y contiene datos de secuencias de aminoácidos, el nombre de la proteína, la descripción y datos taxonómicos y alrededor del 85% de las secuencias de proteínas proporcionadas por UniProtKB se derivan de la traducción de las secuencias codificantes (CDS), que se han presentado a las bases de datos de ácidos nucleicos y publicadas en las bases de datos (EMBL-Bank/GenBank/DDBJ INSDC). Todas estas secuencias, así como los datos relacionados presentados por los diferentes autores, se integran automáticamente en UniProtKB / TrEMBL (UniProt Consortium, 2011).

Lo ideal de un buen alineamiento es una mezcla entre dos valores: identidad y longitud. Dos estadísticos que tienen en cuenta ambos valores son el puntaje o “Score” y el valor

esperado o “valor-E” y entre mayor sea el score mejor será el alineamiento, de modo que un valor mayor de 200 indica una muy buena relación desde el punto de vista evolutivo. El valor-E representa el número de resultados (hits) que se obtendrían al azar con una base de datos de cierto tamaño, con un puntaje igual o mayor similitud entre las secuencias; por tanto, entre menor sea el valor-E, es menos probable que el alineamiento se deba únicamente al azar y por lo tanto, más posibilidades tiene de representar una posible homología (Xiong, 2006).

Una vez se realiza el alineamiento y la evaluación de las puntuaciones, la secuencia de pares más estrechamente relacionadas resultan evidentes, pudiéndose colocar en las ramas exteriores de un árbol evolutivo. Un árbol se obtiene sobre la base de las mejores puntuaciones para los cambios (distancias) entre las secuencias que obtuvieron similares calificaciones (Mahdavi, 2011). Existen numerosos métodos para la construcción de árboles filogenéticos a partir de datos moleculares (Nei and Kumar, 2000). Ellos pueden ser clasificados en: métodos de distancia, métodos Parsimonia y métodos de probabilidad. Dentro de los métodos de distancia, se encuentra el del “vecino más cercano” o Neighbor Joining (NJ), que utiliza medidas de distancia para corregir accesos múltiples a los mismos sitios, de modo que el árbol se construye teniendo en cuenta la menor distancia entre dos hojas de acuerdo a la nueva matriz de distancias. El árbol generado por este método es un árbol sin raíz, sin embargo, para facilitar la inspección, se puede utilizar el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) que muestra árboles NJ de una manera similar a los árboles con raíz. El programa MEGA ha sido ampliamente utilizado desde su creación en 1993 y utiliza datos de secuencia de ADN, de proteínas y distancia evolutiva o de árboles filogénicos (Kumar et al., 2008).

## 3. Metodología

El proyecto se desarrolló en cuatro etapas:

- Selección y síntesis de los Péptidos antimicrobianos de origen natural (péptidos problema y control).
- Estudio bioinformático y determinación del porcentaje de identidad, similitud y homología con proteínas humanas.
- Estudio del efecto in vitro de los péptidos sobre las células nucleadas y hematíes.
- Estudio in vitro de la actividad antileishmanial sobre promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) major*.

### 3.1 Selección y síntesis de los Péptidos antimicrobianos de origen natural

#### 3.1.1 Síntesis de los Péptidos antimicrobianos

Dieciséis péptidos antimicrobianos de origen natural y previamente reportados, fueron sintetizados por la estrategia t-Boc de síntesis en Fase Sólida, por los grupos Funcionales de Biocatálisis y Química-Síntesis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y numerados de acuerdo al sistema de codificación del Instituto. Durante la síntesis, se establecieron los criterios de pureza, peso molecular y tendencia de estructura secundaria mediante las técnicas de HPLC- FR (Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa), Espectrometría de masas y ensayos de Dicroísmo circular, respectivamente (Lesmes et al., 2009). El tamaño de los péptidos fue de 10 a 40 aminoácidos, peso molecular menor de 3 kDa, siete con actividad antileishmanial

previamente descrita y nueve sin reportes de actividad sobre este parásito, siendo los péptidos incluidos en el estudio y con una pureza superior al 95%: Apamina, Andropina, péptido antimicrobiano traqueal (TAP), Polistes Mastoparán (MA), Mastoparán 8 (MP-8), Mastoparán 17 (MP-17), Mastoparán X (MP-X), un derivado de la protamina o Pr-2, Maganina-1, Dermaseptina S1, Melitina, Bombinina, Taquipesina I y las Cecropinas A, B y P1 (Tabla 1-3).

Los Péptidos antimicrobianos una vez sintetizados, caracterizados y liofilizados, fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido o DMSO (Panreac, Barcelona, ES) al 3% (v/v) y medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Scotland, UK) incompleto a una concentración de 1 mg/mL (solución stock) almacenándose a -20°C hasta su uso.

- **Síntesis de los péptidos en fase sólida.** Todos los Péptidos antimicrobianos fueron producidos manualmente usando el protocolo de Merrifield para síntesis de péptidos en fase sólida basado en t-Boc (SPPS) (Merrifield, 1964), modificado posteriormente por Houghten para la síntesis de múltiples péptidos (Houghten et al., 1991). Los péptidos fueron sintetizados y caracterizados fisicoquímicamente de forma simultánea. Se empleó resina MBHA (0.7 meq/g), aminoácidos t-Boc y técnicas de clivaje bajo-alto. La identidad y pureza de los péptidos fue analizada, por espectrofotometría de masas con desorción iónica provocada por láser y asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time-of-Flight) y, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), respectivamente. Posteriormente fueron liofilizados, identificando la tendencia de estructura secundaria mediante experimentos de dicroísmo circular (Lesmes et al., 2009).



**Tabla 1-3:** Secuencia, peso molecular (Da), fuente, actividad antileishmanial descrita y tendencia de estructura secundaria obtenida por experimentos con Dicroísmo circular de los Péptidos antimicrobianos que fueron evaluados y el péptido no relacionado o CLIP.

PÉPTIDO ANTIMICROBIANO	SECUENCIA	PESO MOLECULAR (Da)	FUENTE NATURAL	TENDENCIA DE ESTRUCTURA SECUNDARIA*	ACTIVIDAD ANTILEISHMANIAL
Maganina-1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	2410.4	<i>Xenopus laevis</i>	Hebras- $\beta$	Maganina-2: <i>L. (L.) donovani</i> (Guerrero et al., 2004) y análogos: <i>L. (V.) braziliensis</i> (Lofgren et al., 2008)
Dermaseptina S1	ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAAD TISQGTQ	3437.6	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Hélice- $\alpha$	<i>L.(L.) amazonensis</i> (Brand et al., 2006) <i>L. (V.) panamensis</i> y <i>L.(L.) major</i> (Perez-Cordero et al., 2011)
Bombinina	GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHFAN	2904.4	<i>Bombina maxima</i>	Hélice- $\alpha$	<i>L. (L.) donovani</i> (Mangoni et al., 2006)
Andropina	VFIDILDKVENAIHNAAQVGIGFAKPFKEL INPK	3732.8	<i>Drosophila melanogaster</i>	Helice- $\alpha$	<i>L. (V.) panamensis</i> (Perez-Cordero et al., 2011)
TAP	NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCV GRAVKCCRRK	4073.6	<i>Bos taurus</i>	Hélice- $\alpha$	No descrita
Cecropina B	KWKVFKKIEKNGRNIRNGIVKAGPAIAVL GEAKAL	3818.3	<i>Hyalophora cecropia</i>	Hélice- $\alpha$	No descrita
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGG PR	3321.4	<i>Ascaris suum</i>	Hélice- $\alpha$	No actividad en <i>L. (V.) panamensis</i> y <i>L.(L.) major</i> (Perez-Cordero et al., 2011)
Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVV GQATQIAK	4003.8	<i>Hyalophora cecropia</i>	Hélice- $\alpha$	<i>L. (V.) panamensis</i> (Perez-Cordero et al., 2011)
Polistes MA	VDWKKIGQHILSVL	1618.1	<i>Polistes jadwigae</i>	No estructurada	No descrita
Melitina	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	2829.7	<i>Polistes sp. HQL-2001</i>	Hélice- $\alpha$	<i>L. (L.) major</i> (Perez-Cordero et al., 2011)
Taquiplesina I	KWCFRVCYRGICYRRCR	2251.2	<i>Tachypleus tridentatus</i>	Hebras- $\beta$	<i>L.(V.) braziliensis, guyanensis y panamensis</i> (Lofgren et al., 2008)
Apamina	CNCKPEPALCARRCQQH	2014.5	<i>Apis cerana cerana</i>	Hélice- $\alpha$	No descrita
Pr-2	VRRRRRPR	1133.4	<i>Oncorhynchus mykiss gairdneri</i>	Hélice- $\alpha$	<i>L. (V.) panamensis</i> (Perez-Cordero et al., 2011)
MP-8	INLKALAALAKRLL	1490.3	<i>Vespa magnifica</i>	Hélice- $\alpha$	No descrita
MP- 17	INLKAKAALAKLL	1477.3	<i>Vespa magnifica</i>	Hélice- $\alpha$	No descrita
MP-X	INWKGIAAMAKLL	1539.3	<i>Vespa simillina xanyhophera</i>	Hélice- $\alpha$	No descrita
CLIP	LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM	2674.5	Molécula CD74 CMH clase II Cadena invariante - [ <i>Homo sapiens</i> ]	Hélice poliprolin-II	Péptido endógeno No actividad antimicrobiana ni citotóxica

\* Datos obtenidos de experimentos de Dicroísmo circular realizado en FIDIC (Lesmes et al., 2009)



- **Cromatografía Líquida.** Una RP-HPLC analítica fue corrida en un equipo Hitachi-Merck modelo L17400 (Merck, Darmstadt, DE) provisto por una columna analítica de sílica Vydac C-18 (5  $\mu$ m) (4.5 mm  $\times$  30 cm). Una columna preparativa Vydac C-18 fue utilizada en una RP-HPLC preparativa por elución gradiente-lineal de 0 a 100% B, empleando el siguiente sistema de solventes: A: H<sub>2</sub>O 0.05% trifluoroacético (TFA), B: CH<sub>3</sub>CN, 0.05% TFA por 45 min (100 min para el proceso preparativo) a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min (4.5 mL/min para el proceso preparativo). El eluido fue monitoreado en un detector UV-DAD a 220 nm.
- **Análisis de espectrometría de masas.** El espectro de la masa fue registrado utilizando un espectrómetro de masa Bruker Protein TOF en modo reflectrón (Billerica, MA). Experimentos de desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization o MALDI) fueron realizados usando la técnica de tiempo de vuelo (Time-Of-Flight o TOF). Este instrumento usa un láser radiante de N<sub>2</sub> a una longitud de 337 nm con pulsos de 3-ns y la aceleración del voltaje fue de +17.5 kV y voltaje del reflectrón +20 kV; todos los espectros fueron obtenidos por una serie de 10 pulsos de láser para asegurar condiciones comparables y el poder del láser para cada medición, fue tan mínimo como fue posible. La matriz usada en este trabajo fue ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinámico (CCA) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO); preparada como una solución saturada en 1 mL de TA (40% acetonitrilo en 0.1% ácido trifluoroacético); las muestras fueron disueltas en TA para obtener una concentración de 100 pmol/pL y preparadas para el análisis MALDI-TOF por dilución de la muestra en la solución matriz – saturada a una concentración de 10 pmol/ $\mu$ L. Alícuotas de 0.5  $\mu$ L de la mezcla matriz- muestra fueron ubicadas en una placa permitiendo su secado al aire seco para ser analizadas posteriormente.

### 3.1.2 Selección de los controles

Como péptido control se incluyó un péptido no relacionado (PNR) correspondiente a la secuencia de la cadena invariante de clase II o CLIP (control negativo). Como medicamentos controles para actividad antileishmanial se utilizó una solución de isotionato de pentamidina (Pentacarinat® Rhone Poulenc Rorer, Dagenham, UK) de uso sistémico y de sulfato de paromomicina (Paromomycin®, PhytoTechnology

Laboratories, Shawnee Mission, Kansas, USA) de uso tópico, ambos disueltos en medio RPMI- 1640 incompleto.

El péptido CLIP (CLass II Invariant chain-associated Peptide) es un péptido lineal de 24 residuos, con secuencia: LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM, sin estructura de hélice  $\alpha$ , teóricamente no microbicida ni inmunógeno, producido por las células de forma natural, resultado del clivaje de la cadena invariante asociada al complejo mayor de Histocompatibilidad Clase II y que tiene como función el facilitar la entrada del péptido (antígeno) a la célula.

Otros controles del estudio fueron los solventes o vehículos en los cuales se disolvieron los péptidos (DMSO), células solas y parásitos solos o sea sin péptidos.

### **3.1.3 Estudio bioinformático y determinación del porcentaje de identidad, similitud y homología con proteínas humanas**

A cada uno de los péptidos se les hizo la búsqueda del carácter antimicrobiano, evaluando la secuencia desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal en el servidor "AntiBP Server" (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/index.html>), con una exactitud de aproximadamente 92.11%. Adicionalmente se calculó la carga neta a pH 7.0 utilizando el programa "Peptide property calculator" (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>) y se hizo la predicción del porcentaje de hélice  $\alpha$  en la secuencia de aminoácidos, utilizando el portal ExPASy \_ SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/>) y el servidor "CFSSP: Chou & Fasman Secondary structure prediction server" (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>), comparando estos dos resultados con los experimentos de Dicroísmo circular y analizando la relación entre la estructura secundaria y la carga del péptido.

Con el fin de identificar el porcentaje de identidad, similitud y relación de homología con proteínas humanas, la secuencia de cada péptido antimicrobiano se sometió a un análisis bioinformático utilizando el portal ExPASy \_ SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/>) y servidor UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>), realizando en primer lugar un alineamiento local con proteínas humanas, tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), matriz Blosum62, sin filtros ni gaps y un umbral de 10, en donde un valor

esperado (valor  $-e$ ) de 0.1 a 10, indicaba una dudosa relación de homología y un valor superior a 10, una improbable relación.

El análisis filogenético se ejecutó mediante alineamiento pareado y múltiple utilizando el algoritmo ClustalW. Los datos de estos alineamientos, fueron posteriormente cargados en el programa MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net/>) para obtener la distancia matriz que muestra la divergencia estimada entre las secuencias y construir el árbol filogenético por el método del Vecino más cercano o “Neighbor – Joining” (NJ) con “bootstrap” de 1000 réplicas, para determinar la relación evolutiva entre los péptidos y las proteínas humanas.

### **3.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre células nucleadas y anucleadas**

El efecto de los Péptidos antimicrobianos se evaluó sobre diferentes líneas celulares con el fin de conocer el perfil de actividad y a su vez permitir descartar a aquellos que pudieran causar un posible efecto deletéreo sobre células eucariotas y en particular las potenciales células hospedadoras, todas ellas diferentes al parásito de *Leishmania* (criterios de seguridad y eficacia, respectivamente), lo que favorecería su futuro empleo en humanos. Las células HepG2 se utilizaron para evaluar el potencial efecto de los péptidos sobre el hígado; las células HeLa, en los epitelios; macrófagos y monocitos de origen humano y murino en las células hospedadoras y, MSPH y hematíes, en las células sanguíneas. Las células empleadas fueron:

- U937: monocito histiocítico de tumor de efusión pleural (linfoma) de hombre de 37 años, empleando tanto el fenotipo adherente (macrófago) como no adherente o en suspensión (monocito).
- J774: monocitos – macrófago de sarcoma de retículo celular de ratones BALB/c de sexo femenino.
- Monocitos obtenidos de sangre periférica humana.

- 
- HepG2: células con morfología tipo epitelial de carcinoma hepatocelular de hombre de 15 años de edad – Argentina.
  - HeLa: morfología tipo epitelial – origen: carcinoma de cuello uterino – mujer de 31 años.
  - Hematíes de sangre humana O Rh+.

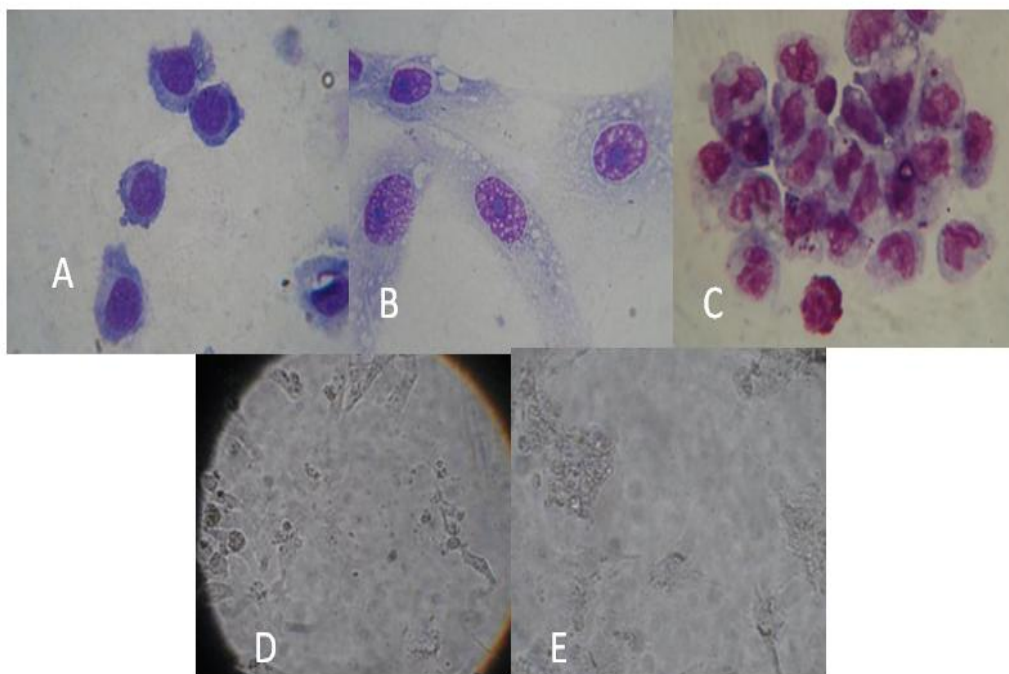
### 3.2.1 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células eucariotas nucleadas

- **Cultivo de monocitos y líneas celulares.** Macrófagos humanos U937 de fenotipos adherente y no adherente y murinos J774; células de origen humano de las líneas HepG2 y HeLa (ATCC, Rockville, USA) y monocitos de sangre periférica provenientes de donantes sanos se cultivaron en medio RPMI-1640 completo a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO<sup>2</sup>. Las células fueron gentilmente donadas por la Dra Gabriela Delgado del Laboratorio de Investigación en Inmunotoxicología, el Dr Fabio Aristizabal del Laboratorio de Inmunogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia (Colombia) y el Dr José Manuel Lozano a través de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC (Colombia) (Figura 6-3).

Los monocitos fueron obtenidos de bolsas con el “buffy coat” o “capa de glóbulos blancos” de sangre periférica humana de donantes sanos (Banco de Sangre, Clínica Marly, Bogotá, CO), cumpliendo lo establecido en la Resolución 8430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia, y en especial del capítulo VI sobre la investigación en órganos. Las muestras se procesaron utilizando una técnica descrita previamente y con algunas modificaciones (Johnson et al., 1977), centrifugándolas a 1800 rpm durante 20 minutos, retirando el sobrenadante, separando los monocitos por gradiente de densidad con Ficoll-Paque densidad 1077 (Lympho separation médium®, MP Biomedicals LLC, Ohio, USA) con centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos y lavando tres veces con solución salina estéril. Después del último lavado, las células fueron resuspendidas en medio RPMI incompleto y solución salina 1:1, suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 5%

(v/v), sembradas en cajas de petri plásticas de 150 cm<sup>2</sup> (Nalge Nunc Internacional Rochester, New York, USA) e incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por espacio de dos horas para permitir su adherencia a las placas de cultivo. Después de la incubación, se retiró la fracción no adherente, separando las células adheridas a la placa con ayuda de raspadores (“scrapers”), determinando el número y porcentaje de viabilidad por exclusión del Azul de Tripano al 0.4% (Gibco, NY) mediante conteo en cámara de Neubauer, siendo sembradas en placas de 96 pozos (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH) fondo plano a una concentración de 2x10<sup>5</sup> células/mL de RPMI-1640 completo para utilizarlas en los respectivos ensayos (Figura 6-3). La viabilidad de las células usadas en los ensayos fue siempre superior al 90%.

**Figura 6-3:** Fotografías de las células utilizadas para la evaluación de la actividad de los Péptidos antimicrobianos.



A: J774: Monocito – macrófago murino, B: U937: Monocito /macrófago – humano, C: Monocitos/macrófagos de sangre periférica humana (MSPH) - teñidos con coloración de Giemsa – 100 X; D: HeLa: Carcinoma de Cuello de útero – epitelio y E: HepG2: Carcinoma Hepatocelular y observados con microscopio invertido – 20 X. Fuente: Los autores

- **Ensayos de efectividad *in vitro* de los Péptidos antimicrobianos sobre las células nucleadas.** Las células se cultivaron en placas de 96 pozos y en medio suplementado con SFB al 5% (v/v) a una concentración de 2x10<sup>5</sup> células/mL. Cuatro

diluciones seriadas y por duplicado de los Péptidos antimicrobianos y de los medicamentos control positivo (sulfato de paromomicina e isotionato de pentamidina), se adicionaron sobre los cultivos celulares partiendo de una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  (50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g/mL}$ ), incluyendo controles del diluyente utilizado (DMSO) con el fin de evaluar el efecto inespecífico no asociado a los péptidos y a los medicamentos antileishmaniales. Células en cultivo libres de péptidos y diluyentes también se utilizaron en los ensayos, como control del crecimiento basal.

Luego de la adición de los péptidos y los controles, las células se incubaron a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  y durante 72 horas, en un volumen final por pozo de 200  $\mu\text{L}$  de medio RPMI suplementado con SFB al 5% (v/v).

El efecto inducido por los péptidos se determinó utilizando la prueba fluométrica de reducción de Resazurina, un indicador de la viabilidad celular, siguiendo la metodología previamente descrita (Rasmussen, 1999; Escobar et al., 2010). La actividad mitocondrial relacionada con la viabilidad celular fue determinada una vez transcurrió el tiempo de exposición a los diferentes tratamientos y para ello, se retiró el medio de cultivo, lavaron los pozos con PBS a pH 7.2 y adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de medio RPMI sin SFB con rezasurina al 10% (v/v) (Sigma Chemical Corp., St. Louis, Missouri, USA) partiendo de una solución inicial de 44  $\mu\text{M}$ , e incubando las células durante 4 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Cumplido el tiempo de incubación, se detectó la reducción de resazurina a resorufina (compuesto fluorescente) en un equipo Tecan Genios Spectra Fluor Plus (Tecan Austria GmbH, Untersbergstrasse Grödig, Salzburg, AT), bajo una longitud de onda de excitación de 535 nm y emisión de 590 nm, por medio del software MagellanURF4 (Tecan, EN). Las unidades relativas de fluorescencia (URF) obtenidas de los pozos con solo medio RPMI y sin células, se consideraron como 0% de viabilidad (ausencia de células y fluorescencia propia del medio de cultivo), mientras que las URF de las células no expuestas a los péptidos y demás sustancias, se consideraron un indicativo de vitalidad del 100% (control de viabilidad). Los datos se normalizaron restando el valor promedio de las UAF obtenidas para el medio solo, a cada uno de los datos de fluorescencia de las células tratadas y no tratadas; para finalmente calcular el porcentaje de células vivas en las



muestras expuestas a los péptidos y demás compuestos, utilizando la siguiente fórmula (Escobar et al., 2010):

$$\% \text{ de sobrevivencia o viabilidad} = \frac{\text{URF promedio en células expuestas} \times 100}{\text{URF promedio en células no expuestas}}$$

A su vez, el % de inhibición de la viabilidad celular se calculó así:  $100 - \% \text{ viabilidad}$ . Todas las pruebas se realizaron por duplicado en tres experimentos independientes.

### **3.2.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los eritrocitos de origen humano**

Considerada como un criterio de seguridad, esta prueba permitió identificar el nivel de toxicidad de los péptidos sobre los hematíes y evidenciar su actividad sobre la bicapa lipídica de las membranas de estas células.

Se incubaron 50  $\mu\text{L}$  de cuatro diluciones dobles seriadas de cada uno de los péptidos (partiendo de 50  $\mu\text{g/mL}$ ) con 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión de glóbulos rojos humanos O+ al 2% en PBS por 1 hora a 37° C y en cajas fondo en V (Lofgren et al., 2008). Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron las suspensiones de eritrocitos expuestos a los péptidos y controles a 3500 rpm por 10 minutos, recolectando cuidadosamente los sobrenadantes y midiendo la absorbancia a 570 nm para calcular posteriormente, el porcentaje de hemólisis. La ausencia de hemólisis (blanco) y el 100% de lisis (control) se determinó reemplazando respectivamente la solución del Péptido antimicrobiano con un volumen igual de tampón fosfato salino (PBS) o agua destilada (AD) Milli-Q estéril.

Se calculó el porcentaje de hemólisis para cada dilución mediante la fórmula (Lofgren et al., 2008):

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{(\text{ABS promedio hematíes expuestos a cada Péptido} - \text{ABS PBS}) \times 100}{(\text{ABS AD} - \text{ABS PBS})}$$

donde ABS corresponde a la absorbancia del PBS y del AD. Se utilizaron como controles del efecto sobre los glóbulos rojos, isotionato de pentamidina y sulfato de paromomicina. Todas las pruebas se realizaron por duplicado en tres experimentos independientes.

### **3.3 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las formas de promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) major***

#### **3.3.1 Cultivo de promastigotes de los parásitos**

Promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) y de *L. (L.) major* clon Friedlin V1 (MHOM/IL/80/Friedlin) fueron cultivados a 27°C en medio RPMI 1640 completo: medio RPMI (Gibco, Scotland, UK) tamponado con 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.2 y suplementado con 5% (v/v) de SFB (Microgen, Bogotá, CO), 2 mM de L- glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina (medio completo). La cepa de parásitos de *L. (V.) panamensis* fue gentilmente proporcionada por la doctora Martha Ayala del Instituto Nacional de Salud en Bogotá (Colombia) y la de *L. (L.) major* Friedlin V1 por el Dr Manuel Soto de la Universidad Autónoma de Madrid (España).

#### **3.3.2 Ensayos de efectividad *in vitro* de los Péptidos antimicrobianos sobre los promastigotes de *Leishmania***

Los Péptidos antimicrobianos se resuspendieron en DMSO al 3% y medio de cultivo RPMI 1640 incompleto, preparando cuatro diluciones seriadas en base dos a partir de una concentración de 1mg/mL (50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL).

Como medicamentos control, inductores directos de la mortalidad de las formas extracelulares de *Leishmania* se utilizaron isotionato de pentamidina (Pentacarinat® Rhone Poulenc Rorer, Dagenham, UK) y sulfato de paromomicina (Paromomycin®, PhytoTehonology Laboratories, Shawnee Mission, Kansas, USA) disueltos en medio RPMI 1640 y a cinco concentraciones diferentes, partiendo de 50 µg/mL (50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 µg/mL).

Los parásitos se cultivaron en medio completo RPMI 1640 a 27°C hasta alcanzar su fase logarítmica de crecimiento (3 a 4 días), siendo posteriormente recolectados, lavados, suspendidos en medio fresco, contados en cámara de Neubauer previamente fijados con formaldehído, ajustados a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  células/mL y sembrados en volúmenes de 80  $\mu$ L en platos de 96 pozos (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) para cultivo celular e incubación por 2 horas a 27°C.

Los Péptidos antimicrobianos, medicamentos antileishmaniales (isotionato de pentamidina y sulfato de paromomicina) disueltos en medio RPMI 1640 y el DMSO al 3%, se adicionaron a los parásitos (volumen final de 180  $\mu$ L). Como controles se emplearon parásitos cultivados en ausencia de compuestos (control de viabilidad) y el medio de cultivo solo y sin parásitos (blanco de reacción). Los parásitos se incubaron a 27°C por 72 horas, observando al microscopio de luz invertido cambios en la morfología y motilidad de los promastigotes de *L. (V.) panamensis* a las 5, 24 y 72 horas de exposición.

Luego de las 72 horas de incubación, se evaluó indirectamente la viabilidad parasitaria, siguiendo la metodología previamente descrita por Mikus, basada en la reducción de la rezasurina (Mikus and Steverding, 2000). A cada uno de los pozos con 180  $\mu$ L de suspensión de parásitos, se adicionaron 20  $\mu$ L/pozo de una solución de resazurina 440  $\mu$ M (Sigma Chemical Corp., St. Louis, Missouri, USA) y se incubaron a 27°C durante 48 horas. Al finalizar la incubación se cuantificó la producción de resofurina, un indicador indirecto de la actividad mitocondrial (de Oliveira-Silva et al., 2008). La producción de resofurina se detectó por la emisión de fluorescencia a 590 nm en un lector de placas Genios Spectra Fluor Plus (Tecan Austria GmbH, Untersbergstrasse Grödig, Salzburg, AT). Las URF obtenidas de los pozos con medio RPMI 1640 solo y sin parásitos (blanco de reacción) y las URF de los parásitos no expuestos a los compuestos, se consideraron como indicativo del 100% de viabilidad y son directamente proporcionales a la cantidad de parásitos viables presentes en cada pozo. Los datos se normalizaron restando el valor promedio de las URF obtenidas para el blanco de reacción. El porcentaje de parásitos vivos en las muestras expuestas a los péptidos y demás compuestos se calculó con la siguiente fórmula (Salamanca-Capusiri et al., 2008):

---

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{URF promedio en parásitos expuestos a los Péptidos} \times 100}{\text{URF en parásitos no expuestos}}$$

A su vez, el % de inhibición de la viabilidad o % de efectividad se calculó con la siguiente fórmula: 100 - % viabilidad. Todas las pruebas se realizaron por duplicado en tres experimentos independientes.

### 3.4 Análisis estadístico

Los valores normalizados se analizaron, graficaron y los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media con un límite de confianza del 95%, siendo tratados estadísticamente para confirmar distribución normal, calcular la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) en  $\mu\text{g/mL}$  y la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) en  $\mu\text{g/mL}$  por un método de regresión no lineal en la relación dosis-respuesta utilizando el programa GraphPad Prism Versión 5.0 Demo software con un modelo de pendiente variable (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA) (Botsford, 2002). Se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido de un post test de Bonferroni para comparaciones múltiples, el cual permitió comparar los valores medios obtenidos para los grupos problema y a varias concentraciones, teniendo en cuenta el error asociado (Cáceres, 2007). En el ANOVA se consideró que la diferencia entre los grupos tratados fue significativa cuando  $p < 0.05$  (95% de confianza), muy significativa cuando  $p < 0.01$  (99% de confianza) y enormemente significativa cuando  $p < 0.001$  (99.9% de confianza). Este análisis permitió conocer el efecto producido por los péptidos sobre las células y los promastigotes de *Leishmania* así como la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) en  $\mu\text{g/mL}$ , que corresponde a la concentración capaz de inducir reducción de la viabilidad del 50% de las células y, la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) en  $\mu\text{g/mL}$ , que es la concentración capaz de reducir la viabilidad del 50% de los parásitos, las cuales se utilizaron para calcular el índice de selectividad (IS). En el caso de los promastigotes, un IS mayor de uno, calculado a partir de la CI<sub>50</sub> de una sustancia en la célula hospedadora (MSPH y células de las líneas U937 y J774) dividido sobre la CE<sub>50</sub> en los promastigotes, indica que dicha sustancia evaluada es más selectiva para el parásito que en la célula hospedadora y un valor igual o menor de 1 es más selectivo para las células hospedadoras (Tiuman et al., 2005; Martin-Quintal et al., 2009).

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Estudio bioinformático y determinación del porcentaje de identidad y similitud y relación de homología con proteínas humanas

Para identificar el carácter antibacteriano de las secuencias, se utilizó el servidor “AntiBP Server” (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/index.html>) con una exactitud de aproximadamente 92.11% y la limitante que solo analiza secuencias de más de 15 residuos. Las secuencias peptídicas fueron registradas desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal encontrándose valores positivos de actividad antimicrobiana en: Maganina I, Dermaseptina S1, Bombinina, Andropina, TAP, Cecropinas A, B y P1, Melitina y Taquiplesina I y, un valor negativo para el péptido CLIP, utilizado como control negativo (-1.188). El valor más alto de la predicción lo presentaron Maganina I (2.710) y Taquiplesina I (2.393) (Tabla 2-4).

Se ha descrito que algunos péptidos antimicrobianos en presencia de una solución acuosa o Tween 80, no tienen una estructura definida, pero una vez se unen a los grupos fosfatos de los lipolisacáridos, adquieren una conformación en hélice  $\alpha$  (Resende et al., 2008), organizándose de tal forma que se da una distribución catiónica por una cara de la hélice y una distribución hidrofóbica en la otra cara, la cual es la base de la anfipaticidad y del principal modo de acción de los péptidos con tendencia de estructura secundaria en hélice  $\alpha$  (Gopal et al., 2012).

Los experimentos de dicroísmo circular permitieron identificar que de los 16 péptidos antimicrobianos en estudio, tres no presentan tendencia a formar hélice  $\alpha$ : Maganina I y Taquiplesina I adoptarían una estructura en hebra  $\beta$ , y Polistes MA, no estructurada o “random coil”. Maganina I y Taquiplesina I fueron los péptidos con mayores puntuaciones en el estudio de predicción de actividad antibacteriana (Tabla 2-4).



**Tabla 2-4:** Péptidos antimicrobianos y resultados de la predicción de actividad antibacteriana, porcentaje de hélice  $\alpha$ , cálculo de la carga neta y tendencia de estructura secundaria obtenida mediante experimentos de dicróismo circular.

<b>PÉPTIDO ANTIMICROBIANO</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>SCORE*</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *</b>	<b>CARGA NETA A pH 7.0**</b>	<b>TENDENCIA DE ESTRUCTURA SECUNDARIA***</b>	<b>PORCENTAJE (%) DE HÉLICE <math>\alpha</math>****</b>
<b>Maganina-1</b>	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	2410.4	2.710	Si	3.1	Hebras $\beta$	87.0
<b>Dermaseptina S1</b>	ALWKTMLKKGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ	3437.6	1.367	Si	3.1	Hélice- $\alpha$	82.4
<b>Bombinina</b>	GIGGALLSAGKSALKGLAKGLAEHFAN	2904.4	1.718	Si	2.1	Hélice- $\alpha$	88.9
<b>Andropina</b>	VFIDILDKVENAIHNAAQVGIGFAKPFKELINPK	3732.8	0.124	Si	0.1	Hélice- $\alpha$	97.1
<b>TAP</b>	NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCCRKK	4073.6	1.322	Si	8.7	Hélice- $\alpha$	39.5 (hebra $\beta$ 63.2)
<b>Cecropina B</b>	KWKVFKKIEKNGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	3818.3	0.939	Si	7.0	Hélice- $\alpha$	71.4
<b>Cecropina P1</b>	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR	3321.4	1.000	Si	5.0	Hélice- $\alpha$	80.6
<b>Cecropina A</b>	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	4003.8	1.000	Si	6.0	Hélice- $\alpha$	91.9
<b>Polistes MA</b>	VDWKKIGQHILSVL	1618.1	ND	ND	1.1	Random coil	92.9
<b>Melitina</b>	GIGAVLKVLTTLGPLALISWIKRKRQQ	2829.7	1.593	Si	7.0	Hélice- $\alpha$	92.3
<b>Taquiplesina I</b>	KWCFRVCYRGICYRRCR	2251.2	2.393	Si	5.8	Hebras- $\beta$	11.8 (hebra $\beta$ 76.5)
<b>Apamina</b>	CNCKPEPALCARRCQQH	2014.5	0.540	ND	1.9	Hélice- $\alpha$	64.7
<b>Pr-2</b>	VRRRRRPR	1133.4	ND	ND	6.0	Hélice- $\alpha$	0.0 (Giro 12.5)
<b>MP-8</b>	INLKALAALAKRLL	1490.3	ND	ND	3.0	Hélice- $\alpha$	92.9
<b>MP-17</b>	INLKAKAALAKKLL	1477.3	ND	ND	4.0	Hélice- $\alpha$	92.9
<b>MP-X</b>	INWKGIAAMAKKLL	1539.3	ND	ND	3.0	Hélice- $\alpha$	92.9
<b>CLIP</b>	LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM	2674.5	-1.188	No	4.0	Hélice poliprolin-II	75.0

**Tabla 3-4:** Péptidos antimicrobianos y resultados del alineamiento con proteínas de origen humano. Número de acceso y longitud de la proteína humana con la que se presentó mayor alineamiento, valor-E, máximo score y porcentaje de identidad.

PÉPTIDO ANTIMICROBIANO			PROTEÍNA DE ORIGEN HUMANO			RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO		
NOMBRE	SECUENCIA	LONGITUD (aa)	NOMBRE	No ACCESO	LONGITUD (aa)	VALOR-E	PUNTAJE MÁXIMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
Maganina-1	GIGKFLHSAGKFGKAFV GEIMKS	23	No alineamiento					
Dermaseptina S1	ALWKTMLKKLGTMALHA GKAALGAAADTISQGTQ	34						
Bombinina	GIGGALLSAGKSALKGLA KGLAEHFAN	27						
Andropina	VFIDILDKVENAIHNAQV GIGFAKPFKELINPK	34	Isoforma 4 de proteína FAM208A	Q9UK61-4	1609	2.3	55	37.7
			Isoforma 4 de proteína FAM208A	Q9UK61-3	1512			
			Isoforma 4 de proteína FAM208A	Q9UK61-2	1233			
			Proteína FAM208A	Q9UK61	1670			
TAP	NPVSCVRNKGICVPIRCP GSMKQIGTCVGRAVKCC RKK	38	β-Defensina 4A	015263	64	4.0 x10-8	108	48.0
			β-Defensina 3	Q5U7J2	45	8.0x 10-3	71	41.0
			β-Defensina 3	P81534	67			
			Proteína parecida a β-Defensina	C7S8D6	77			
			β-Defensina 1	P60022	68	4.4x 10-2	66	39.0
			β-Defensina 1	Q86SQ8	47	6.1x 10-1	65	36.0
			Proteína no caracterizada	H0YKC6	135	6.1x 10-1	58	33.0
			Proteína 5-10 asociada a la Queratina	A6NC61	170	3.1	53	36.0
			Proteína para determinación de mioblastoma cDNA, FL195884	P15172 B2RC72	320	8.4	50	37.0
			Cecropina B	KWKVFKKIEKNGRNIRN GIVKAGPAIAVLGEAKAL	35	Cadena pesada de Miosina 7B, músculo cardíaco	A7E2Y1	1941
CecropinaP1	SWLSKTAKKLENSAKKRI SEGIAIAIQGGPR	32	No alineamiento					
Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRD GIKAGPAVAVVGQATQI AK	37	Proteína 2 activadora de GTPasa SLIT-ROBO Rho - isoforma a	Q5VZB5	984	5.2	53	47.0
			Proteína 2 activadora de GTPasa SLIT-ROBO Rho - isoforma b	Q75044	1071			
			Proteína 2 activadora de GTPasa SLIT-ROBO Rho - isoforma c	H0Y2P8	985			
			Proteína SRGAP2	B7ZM87	1070			
			cDNA FLJ60271, altamente similar a la proteína ROBO Rho	B7Z3G4	789			
			Nueva proteína similar a la proteína GTP asa SLIT-ROBO Rho	B1AKK3	1071			
			Proteína 2 activadora de GTPasa SLIT-ROBO Rho	A2RUF3				
Polistes MA	VDWKKIGQHILSVL	14	No alineamiento					
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALIS WIKRKRQQ	26						
Taquiplesina I	KWCFRVCYRGICYRRCR	17	Proteína no caracterizada C1orf172	Q8NAX2	398	3.0	50	43.0



PÉPTIDO ANTIMICROBIANO			PROTEÍNA DE ORIGEN HUMANO			RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO		
NOMBRE	SECUENCIA	LONGITUD (aa)	NOMBRE	No ACCESO	LONGITUD (aa)	VALOR-E	PUNTAJE MÁXIMO	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
			Proteína 21-2 asociada a la queratina	Q3L159	83	8.6	47	77.0
Apamina	CNCKPEPALCARRCQQ H	17	No alineamiento					
Pr-2	VRRRRRPR	8						
MP-8	INLKALAALAKRLL	14						
MP-17	INLKAKAALAKLL	14						
MP-X	INWKGIAAMAKLL	14						
CLIP	LPKPPKPVSKMRMATPL LMQALPM	24	Isoforma 3 del HLA clase II	P04233-3	160	6.0 X 10-10	124	100.0
			Isoforma 2 del HLA clase II	P04233-2	232			
			Antígeno gamma de HLA clase II	P04233	296			
			Molécula CD74 HLA clase II	H0YBZ8	145			
			Molécula CD74 HLA clase II	H0YBZ2	316			
			Molécula CD74 HLA clase II	E7ESL3	152			
			Receptor de la proteína tirosina quinasa	A9YLN4	703	4.7	53	50.0
			Isoforma 3 de N-metiltransferasa Histona-lisina	014686-3	5540			
			N-metiltransferasa Histona-lisina MLL2	014686	5537			

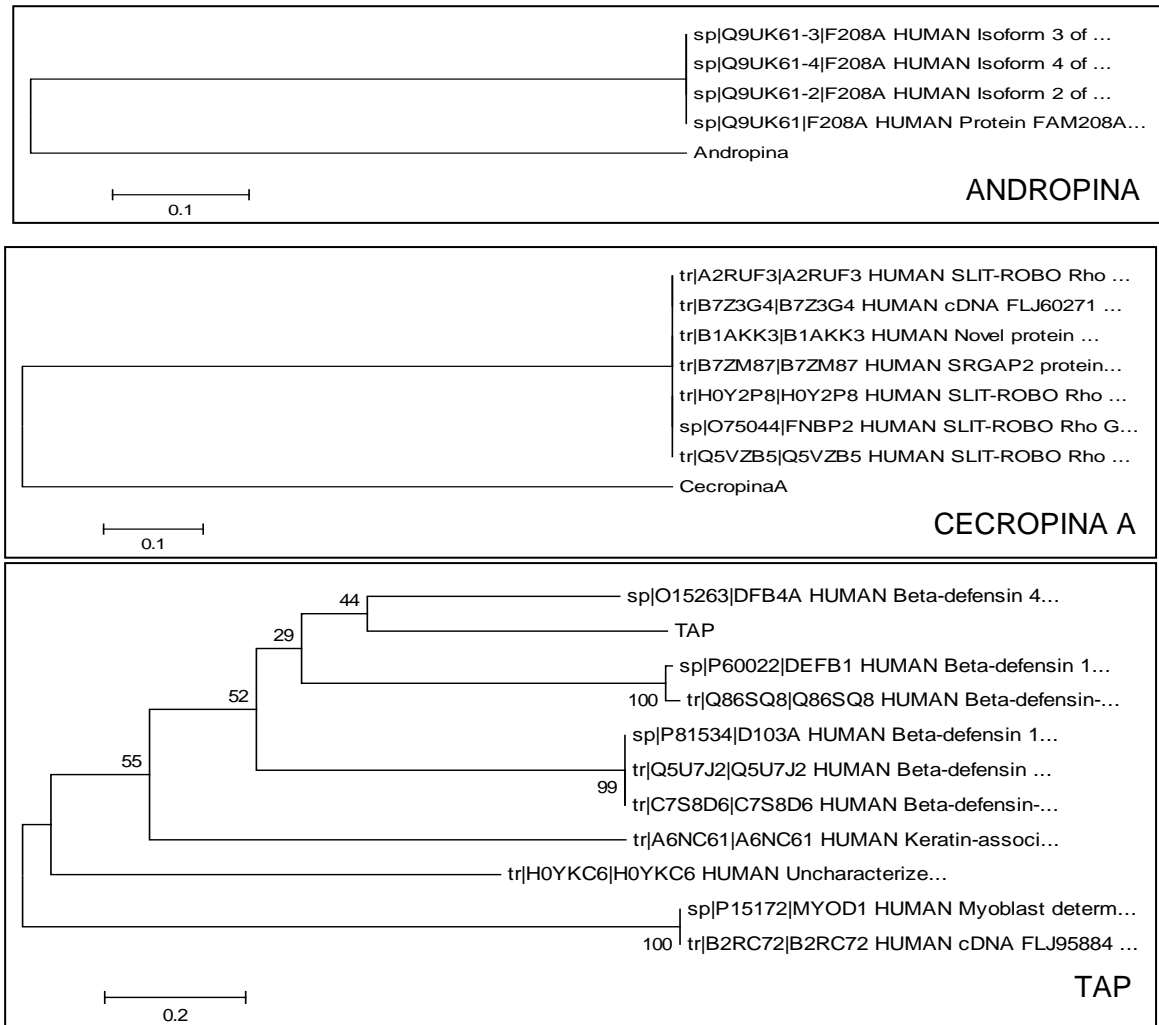


En resumen, excepto el TAP, los demás 15 péptidos antimicrobianos, no tienen relación de identidad con proteínas humanas, situación que favorecería la utilización de los péptidos con cierto grado de seguridad (Tabla 3-4).

Al comparar los resultados de tendencia de estructura secundaria en los experimentos de dicroísmo circular y la predicción del porcentaje de hélice  $\alpha$  con el programa “CFSSP: Chou & Fasman Secondary structure prediction server”, no se encontró correlación entre los resultados obtenidos en los péptidos: Maganina 1, TAP, Polistes MA, Pr-2 y el péptido CLIP, lo que indica que las herramientas bioinformáticas solo pueden servir de ayuda, y no son determinantes para predecir con certeza la tendencia de estructura secundaria de una secuencia, como si lo hacen los experimentos de dicroísmo circular (Gopal et al., 2012). De igual forma, no se identificó relación entre la carga neta calculada a pH 7 utilizando el programa “Peptide property calculator” y la tendencia de estructura secundaria de los péptidos y obtenida en los experimentos por dicroísmo circular (Tabla 2-4).

Once de los 16 péptidos no se alinearon con proteínas humanas cuando se utilizaron el portal ExpASY \_ SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://expasy.org/>) y el servidor UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) para hacer el alineamiento local tipo BLAST con matriz BLOSUM62. Los péptidos Andropina, TAP, Cecropinas A y B y Taquiplesina I presentaron porcentajes de identidad con proteínas humanas en un rango entre 33 y 77% (TAP y Taquiplesina I, respectivamente). Los valores esperados en Andropina, Cecropinas A y B y Taquiplesina I, fueron superiores a 1, sugiriendo una dudosa relación de homología.

Al realizar el análisis filogenético mediante alineamiento pareado y múltiple utilizando el algoritmo ClustalW y cargando posteriormente en el programa MEGA 4, los datos de los alineamientos de los péptidos Andropina, Cecropinas A y B, Taquiplesina I y TAP con proteínas humanas, para construir así el árbol filogenético por el método del Vecino más cercano o “Neighbor – Joining” (NJ) tipo “bootstrap” con 1000 réplicas, se identificó que el único péptido que realmente tiene una relación de homología con proteínas humanas es el TAP (Figura 7-4).

**Figura 7-4: Análisis filogenético de los péptidos Andropina, Cecropina A y TAP**

El péptido TAP, una  $\beta$ -Defensina de origen bovino (*Bos taurus*), presentó un 48% de identidad con un Péptido antimicrobiano humano, la  $\beta$ -Defensina 4A, con la que comparte 18 residuos (Figura 8-A). Ambos péptidos tienen la misma función a pesar de tener origen diferente y se ha establecido que la  $\beta$ -Defensina humana es homóloga con el péptido TAP y el LAP (Péptido antimicrobiano de pulmón), ambos de origen bovino (Luenser and Ludwig, 2005).

**Figura 8-4:** Alineamiento pareado entre el péptido TAP y la  $\beta$ -Defensina 4A mediante el uso del programa ClustalW (1.0.3)

```

CLUSTAL O(1.0.3) multiple sequence alignment
P4FN72          -----NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKC 34
SP|O15263|DFB4A_HUMAN MRVLYLLFSFLFIFLMPLPGVFGGIGDPVTKLSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKC 60
                                     :*:*:*:.. .** *: **  *      *      *      *      *      *      *      *
P4FN72          CRKK 38
SP|O15263|DFB4A_HUMAN CKKP 64
                                     *:*

```

Los péptidos sintéticos pueden actuar como antígenos, estimulando al sistema inmune para producir anticuerpos cuyo blanco es el péptido. La exitosa generación de anticuerpos depende de la unión al linfocito B, de un antígeno procesado y presentado por los linfocitos T ayudadores, los cuales envían señales a las células B para producir y secretar anticuerpos. Un antígeno es cualquier molécula que es definida como extraña por el sistema inmune mientras que un inmunógeno es un antígeno que es capaz de evocar una respuesta inmune, incluyendo la producción de anticuerpos vía de la respuesta humoral. Todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos; por ejemplo, moléculas de bajo peso molecular no pueden estimular al sistema inmune a menos que estén unidas a macromoléculas (Abbas et al., 2010).

Por otro lado, la inmunogenicidad de una molécula depende de varias características físicas y bioquímicas, específicamente: tamaño, composición química, heterogeneidad y que tan extrañas sean para el organismo. Una molécula suele ser tanto más inmunógena cuanto mayor es su tamaño, de modo que moléculas con pesos moleculares <5000 dalton (Da) son poco inmunógenas, aunque se conocen algunas de ~1000 Da que tienen esta capacidad, y por lo tanto, el tamaño de una molécula no es suficiente; la composición, su rigidez y la localización de sus epítomos serían otros aspectos relevantes en la inducción de una respuesta de inmunogenicidad. Esto indica que una sustancia es tanto más inmunógena cuanto mayor complejidad química presente (Villa, 2007). Los péptidos por su pequeño tamaño, generalmente y por sí solos, no son buenos inmunógenos, pudiéndose incrementar dicha respuesta si los péptidos se conjugan químicamente con portadores o “carriers” como seroalbúmina bovina (BSA), agarosa o hemocianina extraída del molusco llamado “lapa” (Keyhole limpet hemocyanin o KLH),

macromoléculas que si son inmunógenas (Lateef et al., 2007). Se concluye entonces, que ninguno de los 16 péptidos antimicrobianos evaluados y a pesar de ser compuestos extraños al ser humano, serían capaces de inducir una respuesta de tipo inmunogénica, teniendo en cuenta el peso molecular entre 1134.4 (Pr-2) y 4003.8 (Cecropina A). Además, como el péptido TAP (de origen bovino) y la  $\beta$ -defensina 4A (de origen humano) son homólogos, comparten iguales funciones y un porcentaje de identidad del 48%, posiblemente no sería reconocido como extraño y por lo tanto no sería un impedimento para utilizarlo en el estudio, en especial por el uso tópico que se le pretende dar una vez se demuestre su efectividad sobre las formas parasitarias de *Leishmania*.

## **4.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células eucariotas nucleadas**

La prueba de reducción de resazurina es simple, rápida, sensible y permite medir la viabilidad celular; siendo valiosa para medir el punto final de citotoxicidad que para monitorear la cinética del crecimiento celular, siendo por ello utilizada en la evaluación de la proliferación celular *in vitro* de bacterias y células de mamíferos. Debido a que hay una directa correlación entre la reducción de la resazurina en el medio de cultivo y la proliferación/cantidad de organismos vivos (O'Brien et al., 2000) se consideró apropiada para evaluar el efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los grupos celulares nucleados.

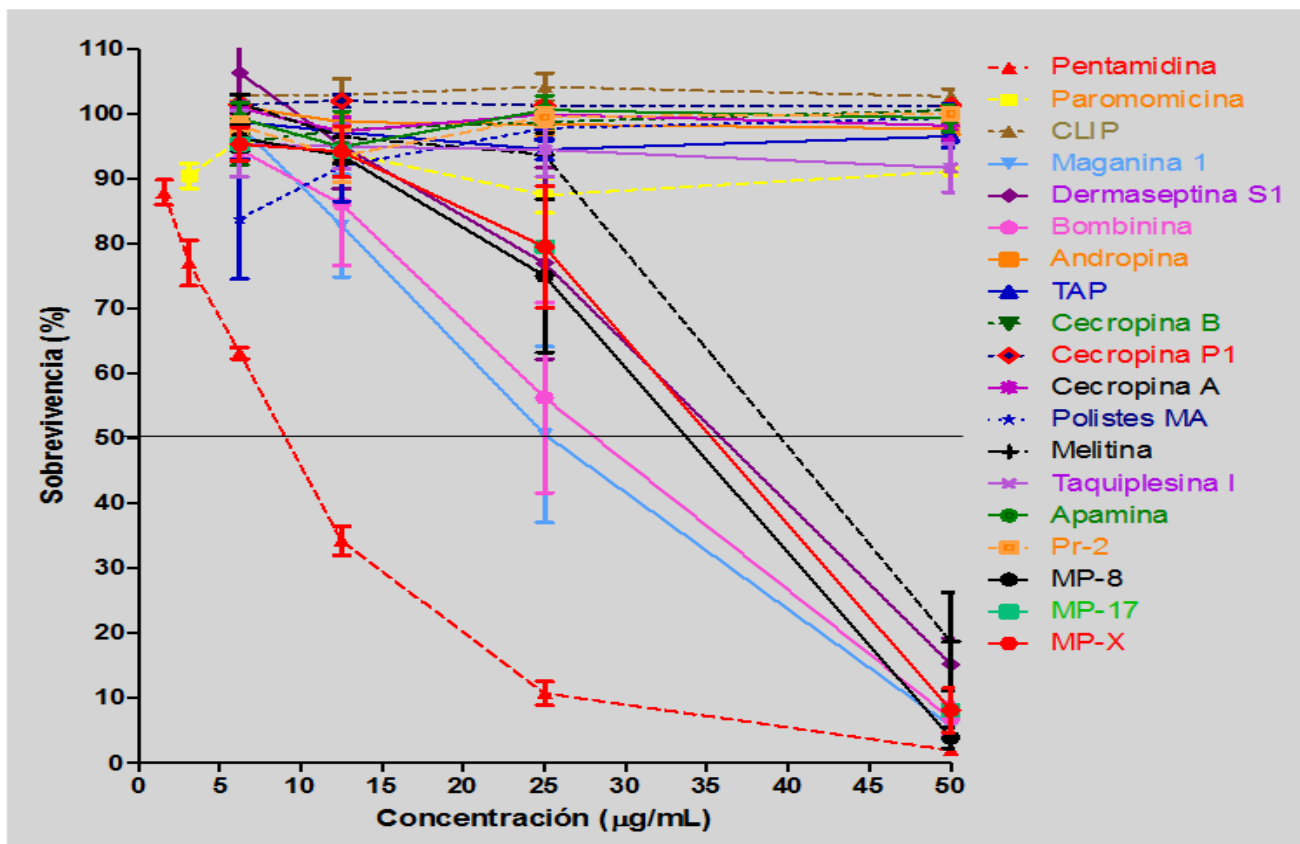
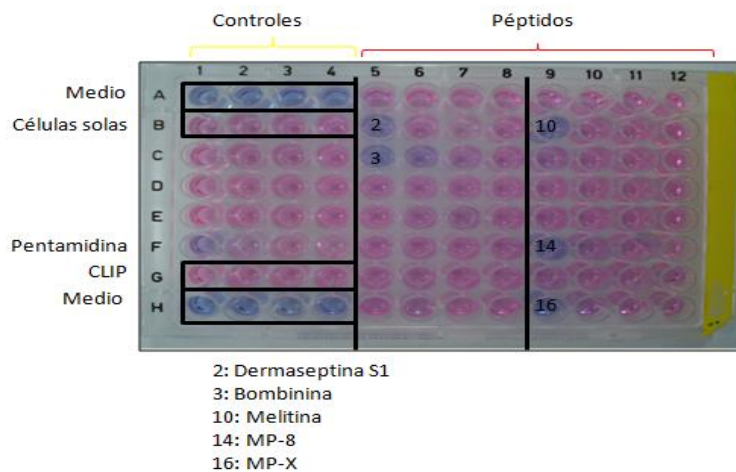
### **4.2.1 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre monocitos/macrófagos**

Si bien en el estudio no se evaluó la actividad antileishmanial sobre la forma de parásitos intracelulares en un modelo de infección, si fue necesario identificar el efecto que los Péptidos antimicrobianos tienen sobre las potenciales células hospedadoras de los parásitos ( $CI_{50}$ ) y tenerlo de referencia para calcular los IS una vez se realicen los ensayos de infección y conocer que tan selectivos son los péptidos sobre la forma parasitaria intracelular.

En las células de origen murino J774, los Péptidos antimicrobianos tuvieron dos comportamientos diferentes (Figura 9-4), identificándose una relación negativa

concentración-dependiente sobre la viabilidad de este grupo de macrófagos al igual que en todas las células evaluadas.

**Figura 9-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células J774



Diez de 16 péptidos no afectaron la viabilidad celular a las cuatro concentraciones utilizadas (6.25 a 50 µg/mL), sin diferencias estadísticamente significativamente significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ). Seis péptidos: Maganina 1, Dermaseptina S1, Bombinina, Melitina, MP-8 y MP-X, redujeron la viabilidad a más del 70% de las células J774 a la máxima concentración 50 µg/mL ( $p > 0.05$ ), con  $CI_{50}$  alrededor de los 25µg/mL (Tabla 4-4), comparado con el isotionato de pentamidina ( $CI_{50}$  8.5 µg/mL).

**Tabla 4-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre la viabilidad celular de monocitos/macrófagos de origen humano y murino luego de 72 horas de exposición.

Analito	J774		U937 ADHERENTE	U937 NO ADHERENTE		MONOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA	
	$CI_{50}$ (µg/mL)	Intervalo de confianza 95%	$CI_{50}$ (µg/mL)	$CI_{50}$ (µg/mL)	Intervalo de confianza 95%	$CI_{50}$ (µg/mL)	Intervalo de confianza 95%
Maganina-1	25.3	19.0 - 36.6	> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Dermaseptina S1	36.7		> 50.0	46.3		49.9	
Bombinina	27.5	19.3 - 41.6	> 50.0	25.2	19.6 - 34.4	30.1	24.6 - 41.4
Andropina	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
TAP	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Cecropina B	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Cecropina P1	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Cecropina A	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Polistes MA	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Melitina	43.70		> 50.0	NA		22.3	15.0 - 32.3
Taquiplesina I	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Apamina	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
Pr-2	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
MP-8	34.4	26.7 - 47.6	> 50.0	22.7	16.5 - 25.8	49.6	
MP-17	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
MP-X	35.4	26.8 - 48.3	> 50.0	25.9		> 50.0	
Isotionato de pentamidina	8.5	7.7 - 9.3	> 3.0	20.4		4.0	
Sulfato de paromomicina	> 50.0		> 3.0	> 1600.0		> 50.0	
CLIP	> 50.0		> 50.0	> 50.0		> 50.0	
DMSO	> 0.003 %		> 0.003 %	> 0.003 %		> 0.003 %	

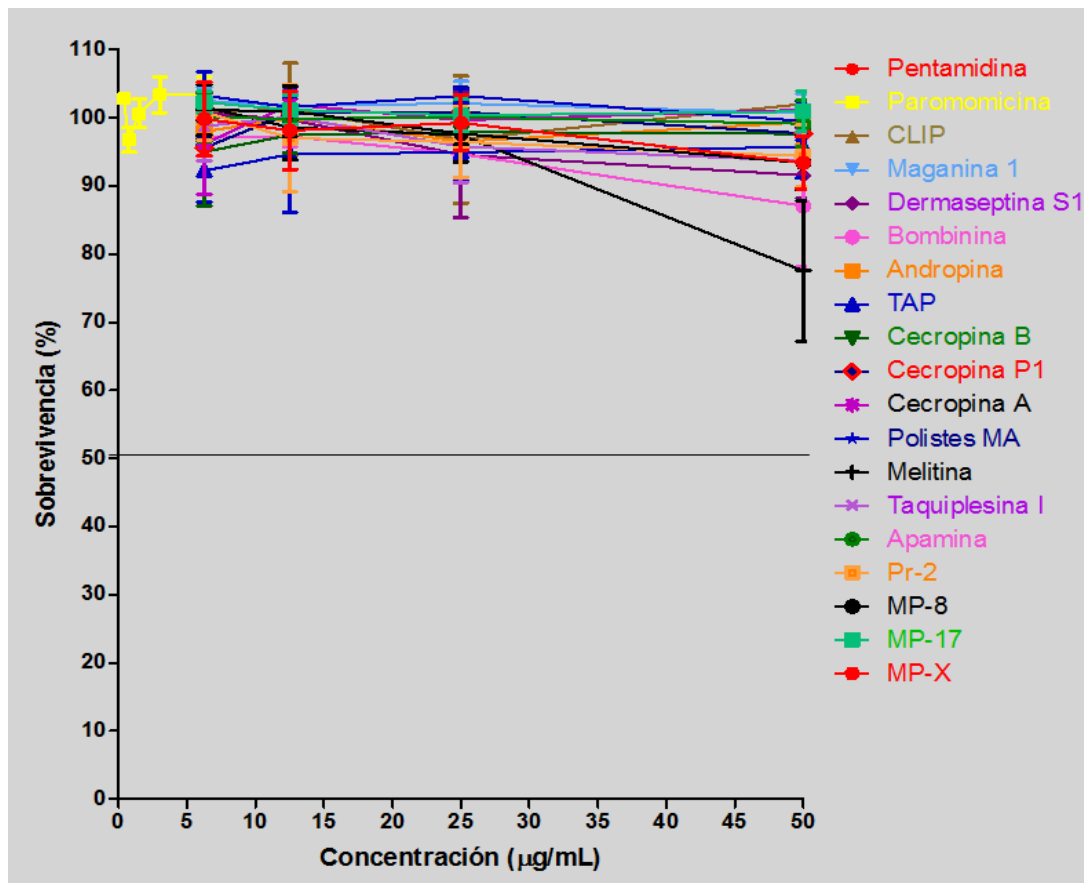
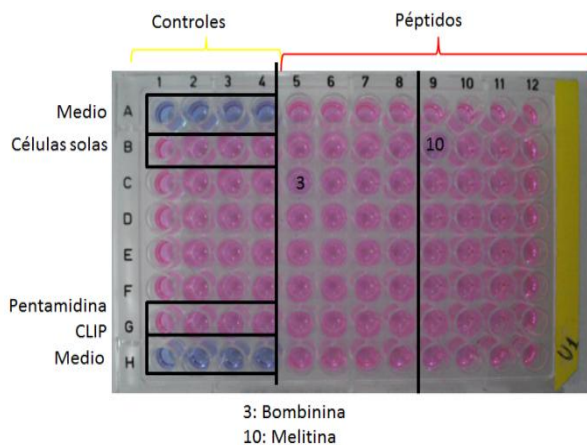
NA: no analizado

Los monocito/macrófagos humanos de la línea celular U937 fenotipo adherente (macrófagos) y no adherente (monocitos), presentaron un comportamiento diferente frente a los péptidos. Mientras que en las células adherentes, solo Bombinina y Melitina indujeron una leve pérdida de la viabilidad ( $p < 0.01$ ) a la máxima concentración utilizada de 50 µg/mL (Figura 10-4); en el fenotipo no adherente (Figura 11-A), se observó que Bombinina, MP-8, MP-X y Dermaseptina S1, si redujeron la viabilidad celular. Los tres primeros, inhibieron al 50% de la población celular a una concentración de 25 µg/mL y, alrededor del 80% a 50 µg/mL de igual forma que lo hizo el isotionato de pentamidina ( $p > 0.05$ ); Dermaseptina S1, tuvo efecto sobre la viabilidad del 50% de la población

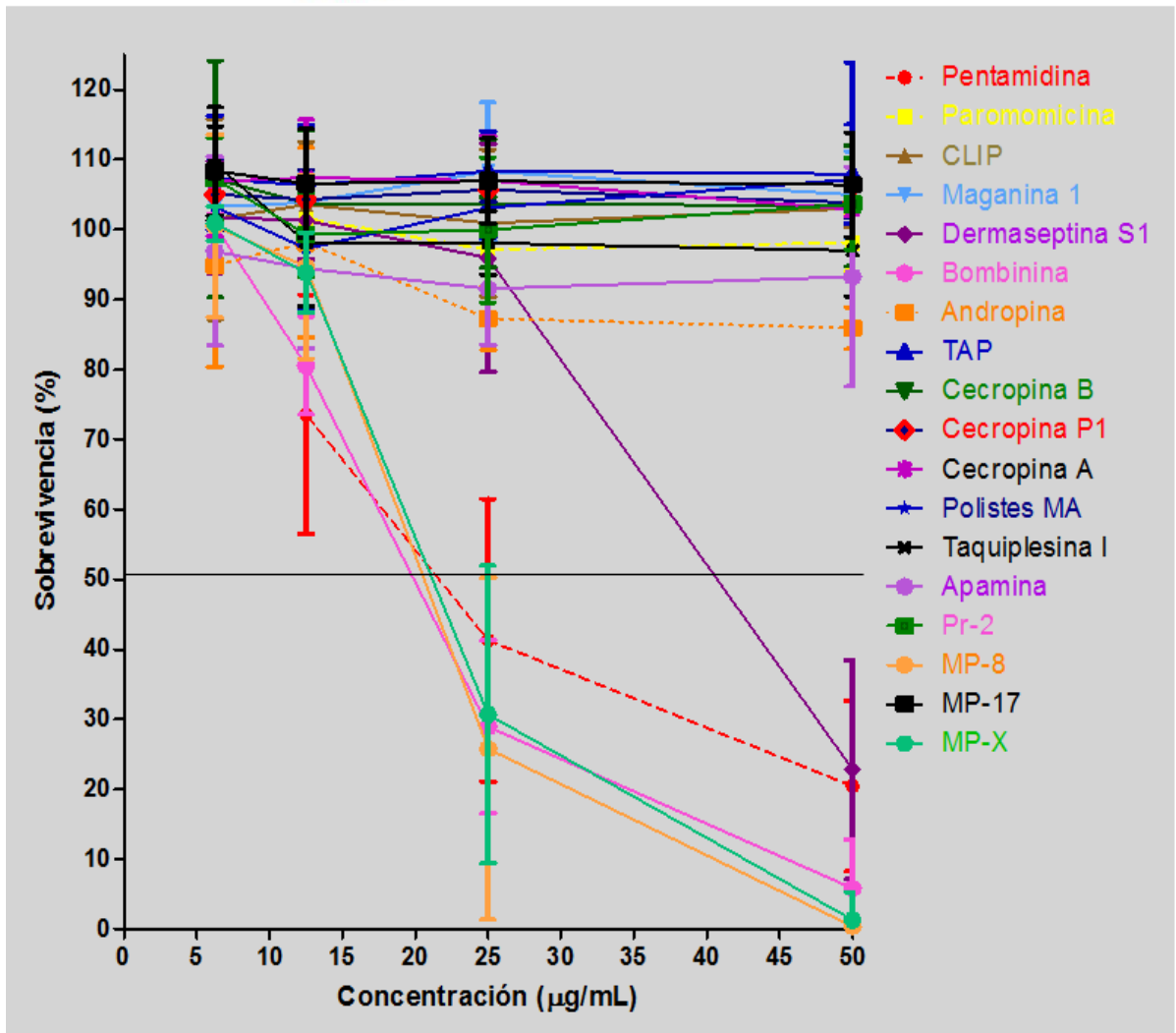
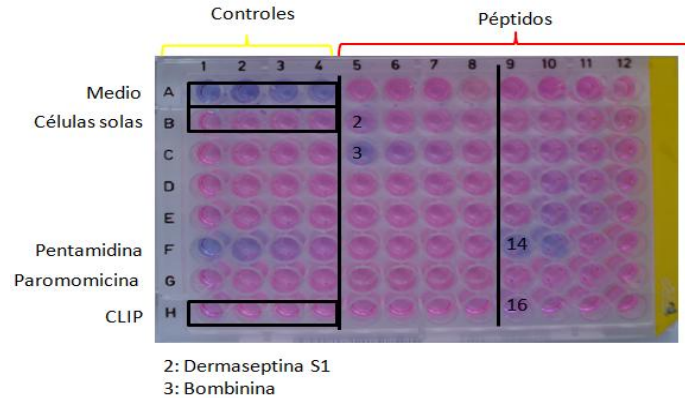


celular a 43.9 µg/mL. El resto de los 12 péptidos y a 50 µg/mL (máxima concentración utilizada), no tuvo efecto sobre las células del fenotipo no adherente ( $p > 0.05$ ) (Tabla 4-A).

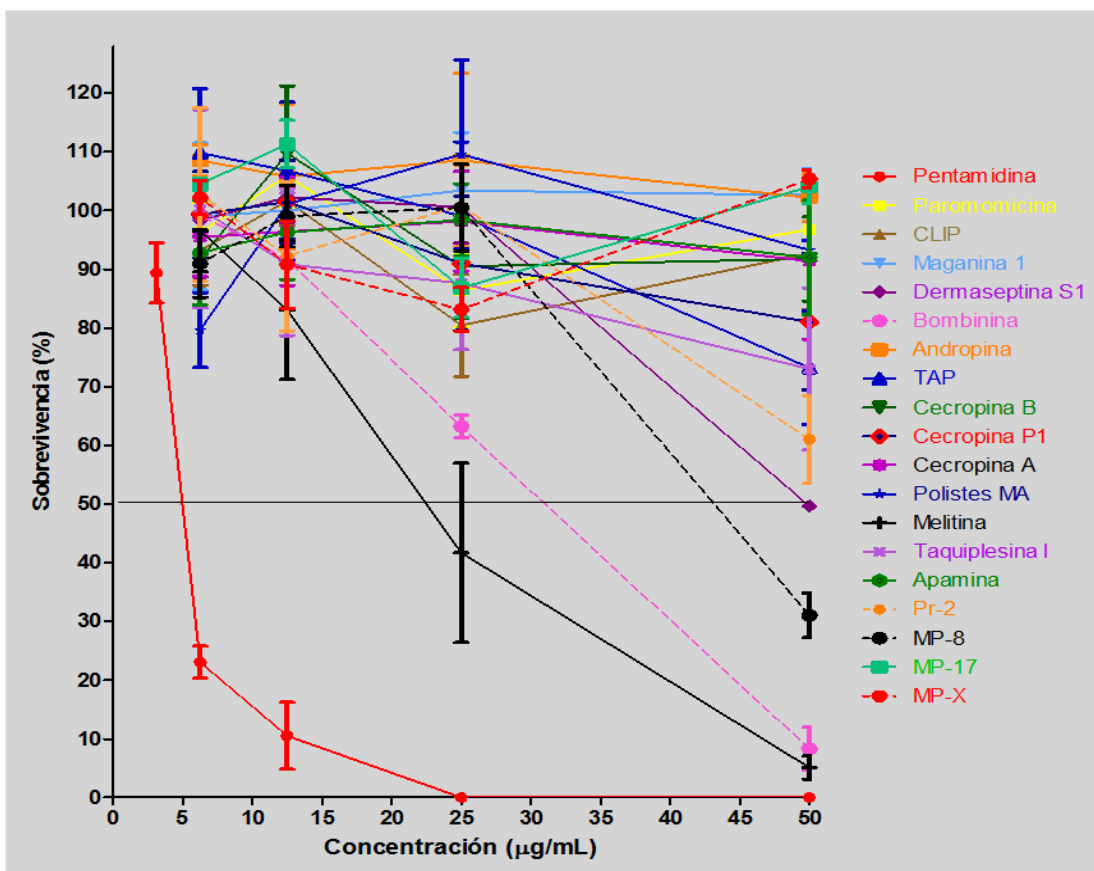
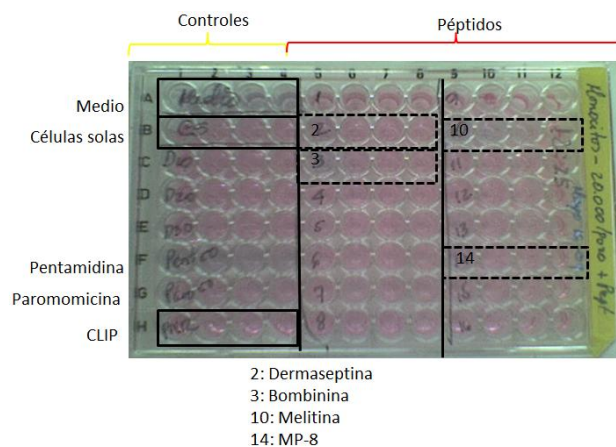
**Figura 10-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células U937 fenotipo adherente



**Figura 11-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células U937 fenotipo no adherente.



**Figura 12-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre monocitos de sangre periférica humana (MSHP)



De los cuatro grupos celulares, los MSPH fueron las células con mayor variabilidad en los resultados. Las diferencias lote a lote de las células obtenidas de las bolsas con “buffy coat” de sangre de donantes, podría haber influido en la calidad de los monocitos

obtenidos y por lo tanto en los resultados, en especial porque hay variaciones en las células producidas por los diferentes individuos (Lewis and Rubin, 1932; Draper et al., 1944).

Aunque Melitina causó el mayor efecto sobre la viabilidad de la población de MSPH, inhibiendo a más del 90% de las células a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; un efecto menor al del medicamento control isotionato de pentamidina, el cual indujo pérdida de la viabilidad del 100% de las células a menores concentraciones (25  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 12-4), permite concluir desde este punto de vista y comparados con la pentamidina, todos los péptidos serían seguros sobre las células hospedadoras.

El isotionato de pentamidina causó inhibición de la viabilidad de los cuatro tipos celulares evaluados a las más bajas  $\text{CI}_{50}$ , en un rango de 4 a 20.3  $\mu\text{g/mL}$ , comparado con las  $\text{CI}_{50}$  de los Péptidos antimicrobianos y que estuvieron en un rango entre 22.3 a 49.4  $\mu\text{g/mL}$ .

La línea celular monoblástica de origen humano U937, se caracteriza por ser no adherente y tener muchas de las características bioquímicas y morfológicas de los monocitos en sangre. Estas células cuando son sometidas a estímulo con DMSO, ácido retinoico, vitamina D3, lipopolisacárido (LPS), acetato de forbol miristato (PMA), IF- $\gamma$ , solo o en combinación, se diferencian y convierten en células adherentes y con características de macrófagos tisulares, expresando marcadores fenotípicos; constituyéndose en una de las pocas líneas que muestran muchas particularidades del monocito y sirviendo como modelo para la diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos (Watanabe et al., 1993; Baek et al., 2009).

Dos tipos de respuesta en una misma línea celular U937 con diferente fenotipo podría explicarse por un fenómeno mecánico en el que las células no adherentes al estar en el cultivo libres, tienen mayor tiempo y superficie de contacto con los diferentes compuestos, en especial porque no es posible retirar el todo el medio consumido durante 72 horas de exposición a los péptidos, los cuales continúan ejerciendo su acción durante las cuatro horas adicionales que se requieren para la producción de resofurina. Adicionalmente, no hay que descartar un potencial efecto de proteasas y en particular metaloproteasas producidas por los macrófagos U937 activados (Welgus et al., 1990),

efecto no evaluado en el presente estudio pero de relevancia a la hora de considerar el uso terapéutico de los Péptidos antimicrobianos, en especial cuando se pretenda administrar por vía sistémica, porque los péptidos podrían ser degradados por este tipo de enzimas presentes en los fluidos corporales.

Las células U937 tienen el potencial de producir diferentes concentraciones de proteasas dependiendo del estado de maduración de las células. Los monocitos estimulados con PMA, expresan mayor concentración de enzimas que degradan colágeno tipo IV que los estimulados con vitamina D (fenotipo no adherente y no activado). Estas enzimas son del grupo de las metaloproteasas o MMPs. MMP-2, MMP-9, MMP-7, elastasa leucocitaria, catepsina G y proMMP-9, y se encuentran involucradas en la proteólisis de las matrices adhesivas estructurales, relacionadas con la invasión de las células a los tejidos. En varios organismos se ha descrito la producción de enzimas proteolíticas capaces de degradar a los Péptidos antimicrobianos; estas son del grupo de las elastasas, gelatinasas, metaloproteinasas, metaloproteasas, proteasas de cisteína y proteasas de superficie producidas por *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* (Nizet, 2006) y *Salmonella spp* (Gunn, 2001). Otro tipo de enzima que podría afectar a los péptidos, es la Gp63 o leishmanolisina, una metaloproteasa presente en la membrana celular de la *Leishmania* que la protege del efecto de los Péptidos antimicrobianos del tipo Maganinas,  $\alpha$ -Defensinas y Catelicidinas (Kulkarni et al., 2006; Kulkarni et al., 2011), lo que sugiere la necesidad de evaluar la resistencia o susceptibilidad de los péptidos a estas enzimas, al igual que su presencia en los sobrenadantes de cultivos de células, promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares.

#### **4.2.2 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células HeLa**

Esta línea celular designada como HeLa (Henrietta Lacks) por uno de sus autores en 1951 (Scherer et al., 1953) fue obtenida del carcinoma epidermoide de cuello uterino. Las células HeLa poseen cualidades inherentes que las hacen adecuadas para realizar estudios *in vitro*, estos son: a) la estabilidad de estas células en el pasaje serial continuo, b) la capacidad para crecer en medios líquidos y c) la facilidad con que estas células pueden ser separadas de las superficies para replicar los cultivos en masa y utilizarlas en



Solo uno de los Péptidos antimicrobianos, la Melitina, redujo la viabilidad del 60% de la población a la máxima concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ , sin diferencias significativas con el control isotionato de pentamidina ( $p > 0.05$ ) (Figura 13-4); seguidos por MP-8 y MP-X con  $\text{CI}_{50}$  por encima de los 50  $\mu\text{g/mL}$ . El resto de los 13 péptidos, no afectó la viabilidad celular a las cuatro concentraciones utilizadas (6.25 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p > 0.05$ ).

Teniendo en cuenta el origen de las células HeLa y los resultados anteriores, en donde solo la Melitina causó un efecto deletéreo sobre la viabilidad celular, permite concluir que se pueden utilizar con cierto grado de seguridad los siguientes Péptidos antimicrobianos, en especial si se pretende utilizarlos tópicamente: Maganina 1, Dermaseptina S1, Bombinina, Andropina, TAP, Cecropinas B, P1 y A, Mastoparanes 8, 17, X y Polistes MA, Taquiplesina, Apamina y Pr-2. El TAP fue el único con identidad con proteínas humanas, pero no se considera pueda causar una reacción inmune importante, dado el uso que se pretende dar al péptido.

### **4.2.3 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre las células HepG2**

Las células HepG2 son un adecuado modelo *in vitro* para el estudio del potencial efecto en hepatocitos humanos. Las células HepG2 en condiciones de cultivo apropiadas muestran unas características funcionales y morfológicas que recuerdan a los canalículos biliares y dominios sinusoidales, *in vivo* (Chiu et al., 1990), de ahí que estas células representen tanto a las células de origen hepático como a los epitelios.

En esta línea celular al igual que en todas las células anteriormente evaluadas: J774, U937 fenotipo no adherente, monocitos de sangre periférica y células HeLa, el péptido Melitina tuvo el mayor efecto sobre la viabilidad de las células, pero nunca como el observado con el isotionato de pentamidina.

En las células HepG2, únicamente la Melitina redujo la viabilidad del 70% de la población celular a 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $\text{CI}_{50}$  36  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 14-4) y por lo tanto, podría causar un efecto indeseable sobre las células hepáticas. Se puede considerar el empleo con cierto grado





En resumen, no se observaron diferencias significativas en relación a la sensibilidad mostrada por los macrófagos de líneas celulares de origen murino y humano frente a la acción de los Péptidos antimicrobianos. Las células más resistentes a su actividad fueron HeLa y HepG2, excepto para Melitina y, las más sensibles fueron los monocitos no activados (U937 no adherente y MSPH), dentro del grupo de las potenciales células hospedadoras de los parásitos en los ensayos de infección.

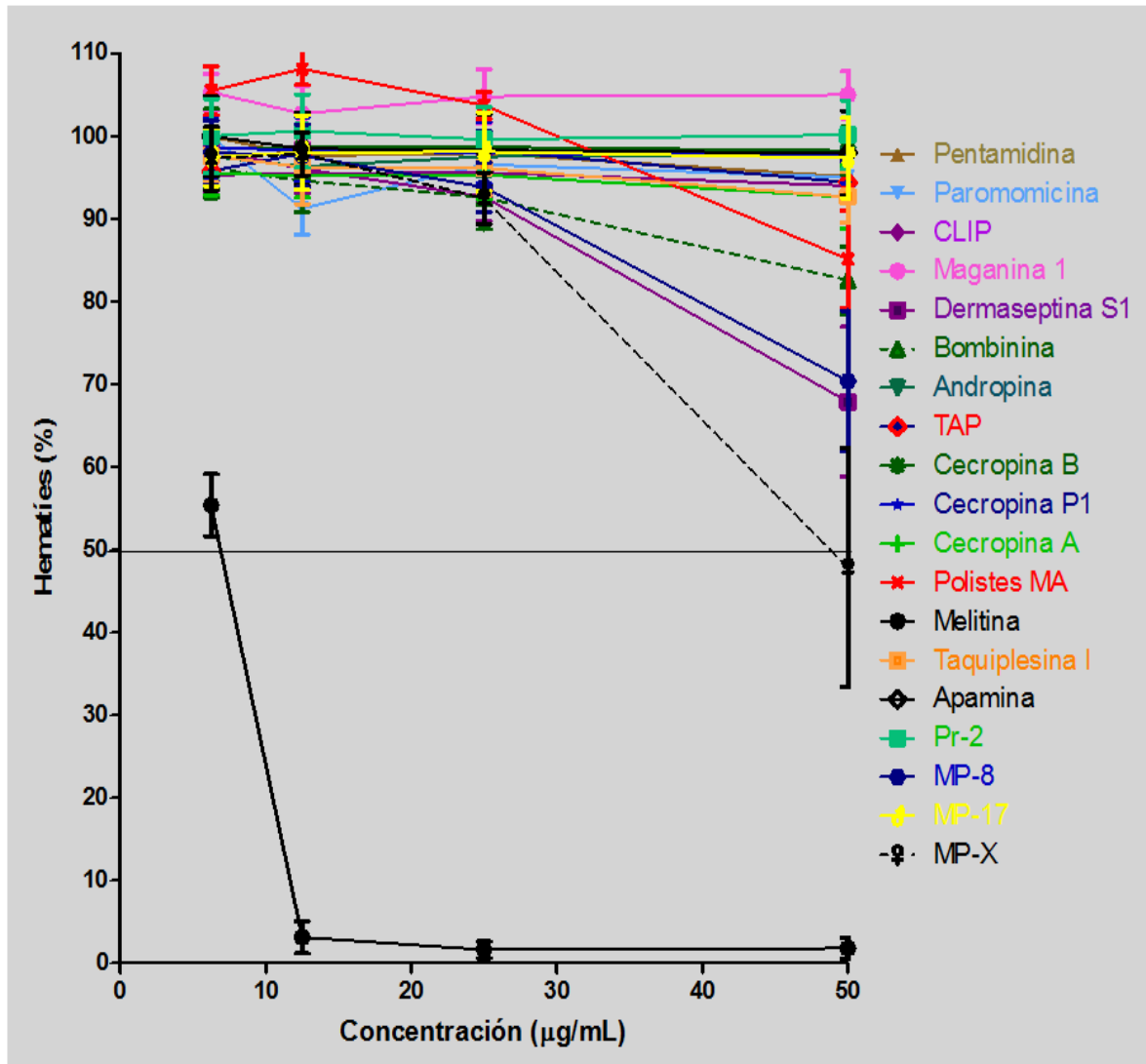
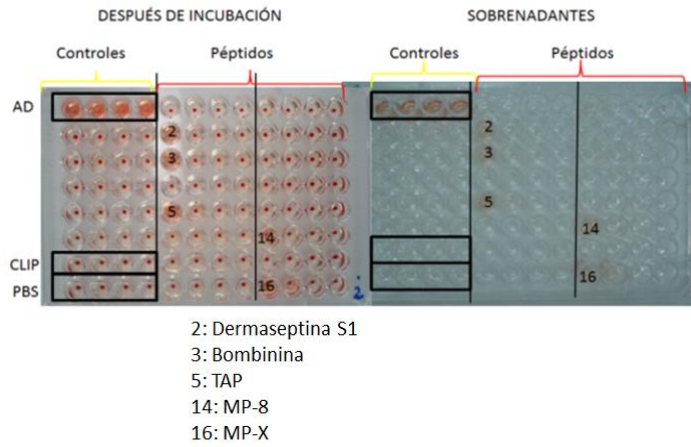
### **4.3 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los eritrocitos**

Melitina fue el péptido más hemolítico, lisando al 96.8% de los eritrocitos a una concentración de 12.5  $\mu\text{g/mL}$  lo que está de acuerdo con la gran actividad hemolítica descrita previamente (Tosteson et al., 1985) y que se corroboró cuando a concentraciones superiores a 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , las lecturas de absorbancia de la Melitina fueron superiores a las obtenidas con el agua destilada utilizado como control del 100% de hemólisis.

A una concentración máxima de 50  $\mu\text{g/mL}$ , indujeron altos porcentajes de hemólisis: MP-X (52.1%), Dermaseptina S1 (32.1%), MP-8 (29.6%), Bombinina (17.4%) y Polistes MA (14.9%). El resto de los 10 péptidos al igual que los medicamentos control, no provocaron hemólisis a 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $p > 0.05$ ). Estos péptidos fueron: Maganina 1, Andropina, TAP, Cecropinas A, B y P1, Taquiplesina, Apamina, Pr-2 y MP-17 (Figura 15-4), el mismo grupo de péptidos que no redujo la viabilidad de las líneas celulares evaluadas (excepto Maganina 1 sobre las células J774) (Tabla 4-4).

El isotionato de pentamidina tuvo mayor efecto inhibitor de la viabilidad en la mayoría de los tipos de células analizadas, con  $CI_{50}$  entre 4.0 y 20.4  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 4-4) lo que estaría de acuerdo con los efectos adversos asociados a la toxicidad del medicamento (Waalkes and Makulu, 1976). A pesar de ello, no causó hemólisis, lo que permite considerar la inducción de lisis en los eritrocitos como un parámetro de seguridad a la hora de identificar a los péptidos promisorios, debido a que se espera que los eritrocitos sean menos susceptibles a la ruptura por la presencia del colesterol en su membrana, molécula que estabiliza la bicapa lipídica e incrementa la resistencia a la entrada de los Péptidos antimicrobianos (Matsuzaki et al., 1999; Shai, 1999).

**Figura 15-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los hematíes 0+.



Se ha descrito que el uso parenteral de los compuestos pentavalentes, los medicamentos de primera elección en el tratamiento de la LC, está asociado con reacciones que van desde cardiotoxicidad (Hepburn et al., 1994), alteraciones de la función hepática y renal y pancreatitis química en los casos más severos, pasando por anemia aplásica, hemolítica, leucopenia y trombocitopenia (Hicsonmez et al., 1988) hasta reacciones leves que incluyen fiebre, náuseas, vómitos, rash, urticaria, cefalea, síncope, disnea, edema facial, dolor abdominal, polineuropatía reversible, artralgias, mialgias al finalizar el uso terapéutico, y la muerte, en raros casos (Oliveira et al., 2005).

Cuando se usan perilesionalmente, solo han mostrado ser capaces de generar una reacción cutánea local caracterizada por induración, edema, eritema y prurito. Por otro lado, después de la administración de isotionato de pentamidina, se ha descrito pancreatitis e hipoglicemia y paradójicamente, hiperglicemia y diabetes insulino-dependiente y en algunos casos, rash cutáneo, tromboflebitis, trombocitopenia, anemia, elevación de las enzimas hepáticas y nefrotoxicidad usualmente reversible (O'Brien et al., 1997).

En el caso de los aminoglucósidos como la paromomicina, son compuestos catiónicos polares que no se absorben a nivel gastrointestinal; cuando se emplean sistémicamente, sus efectos colaterales están limitados al potencial nefrotóxico y ototóxico, sin embargo, cuando se usan tópicamente en el tratamiento de la LC, en forma de ungüento, las reacciones que provoca son leves y pasajeras, consistentes en dolor e induración no pruriginosa alrededor de la úlcera (Romero et al., 1996), lo que lleva a pensar que el uso tópico de una sustancia para el tratamiento de leishmaniasis no se debe descartar así los ensayos *in vitro* muestren que induce inhibición de la viabilidad celular.

La mayoría de los Péptidos antimicrobianos son moléculas catiónicas (como los aminoglucósidos) con regiones hidrofóbicas espacialmente separadas y cargadas, y este “sello diferencial” es importante en el mecanismo de acción propuesto por la interacción entre el péptido y la carga negativa de las superficies de la membrana de los organismos blancos, en particular con los lípidos presentes en la bicapa (Yount and Yeaman, 2005; Brown and Hancock, 2006), lo que explicaría también el bajo ó nulo efecto deletéreo encontrado sobre las células HepG2 (indicador de hepatotoxicidad) y HeLa (indicador de toxicidad sobre epitelios) a las concentraciones utilizadas en el estudio, lo que

favorecería la propuesta de utilizarlos tópicamente a pesar de su perfil de inhibición de la viabilidad celular y hemólisis.

Con base en lo evaluado hasta ahora en las células nucleadas y hematíes, se podrían considerar como no seguros únicamente a los péptidos Melitina y MP-X, medianamente seguros a Dermaseptina S1, MP-8, Bombinina y Polistes MA y como muy seguros a los péptidos que tuvieron un comportamiento similar al CLIP o sea: Maganina 1 (excepto para J774), Andropina, TAP, Cecropinas A, B y P1, Taquiplesina, Apamina, Pr-2 y MP-17. Excepto Melitina y MP-X, los 14 péptidos tienen concentración hemolítica 50 o CH<sub>50</sub> superior a 50 µg/mL.

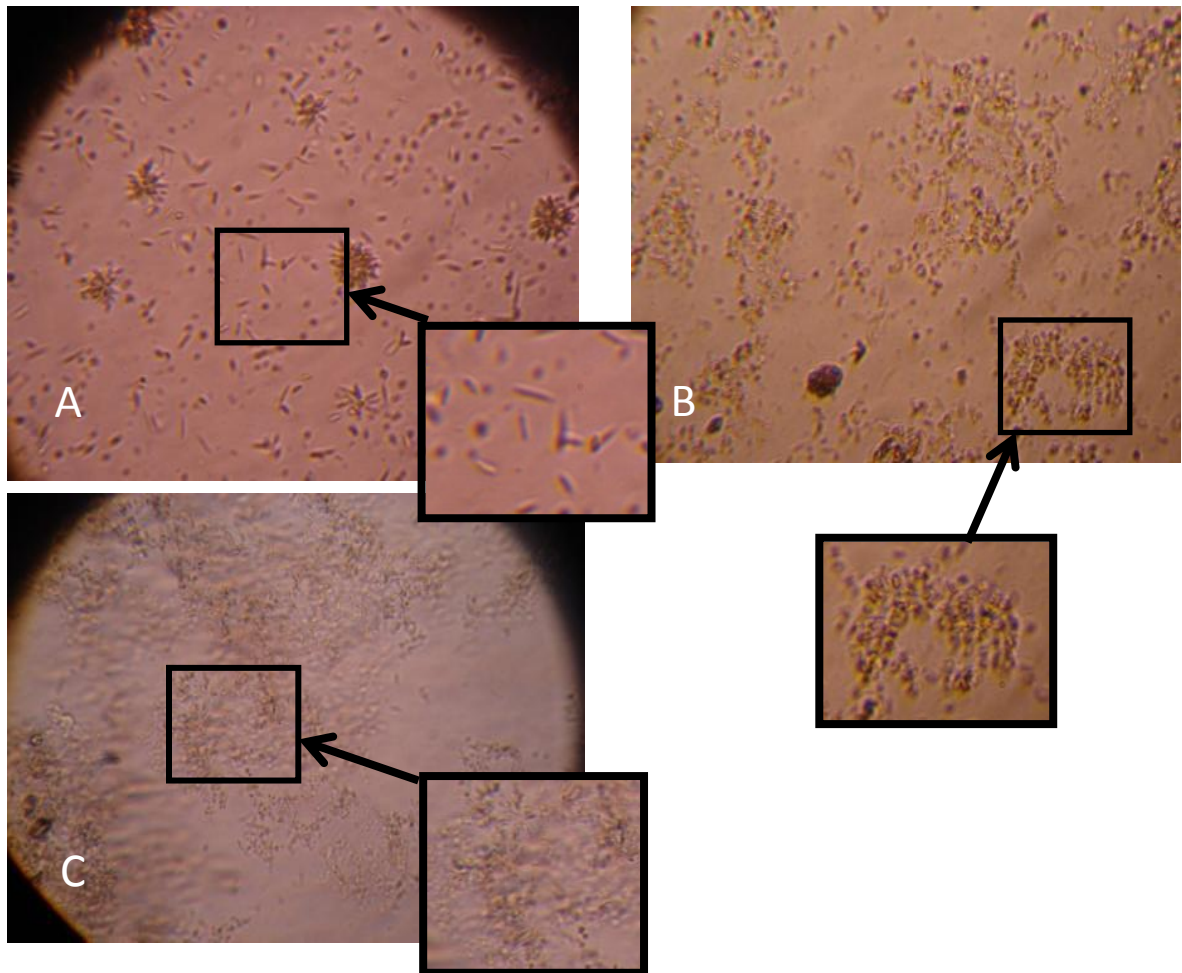
#### **4.4 Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre la forma de promastigotes de *Leishmania***

La Melitina y el isotionato de pentamidina inhibieron la viabilidad del 98 y 100% de las células a concentraciones de 25 y 50 µg/mL respectivamente, mientras que MP-8, Bombinina, Dermaseptina S1 y el sulfato de paromomicina, solo alcanzaron a disminuir la viabilidad del 50% y 80% de la población a esas mismas concentraciones ( $p < 0.05$ ). Los péptidos Polistes MA, MP-X, Pr-2 y TAP, fueron poco activos a 50 µg/mL, reduciendo solamente el 50% de la población. Los nueve péptidos restantes: Maganina 1, Andropina, Cecropinas A, B y P1, Taquiplesina, Apamina, MP-17 y CLIP (control negativo) no tuvieron efecto sobre la viabilidad de los promastigotes a la máxima concentración utilizada (50 µg/mL) y después de 72 horas de exposición (Figura 16-4).

A las cinco horas de incubación, 13 de los Péptidos antimicrobianos (76.5%) indujeron disminución en la motilidad del 25 al 100% de los parásitos a la máxima concentración utilizada (50 µg/mL). Cecropina P1, Apamina, MP-17 y el CLIP no afectaron la motilidad aún después de 72 horas de incubación (Tabla 5-4) (Figura 17-4).



**Figura 17-4:** Cambios morfológicos inducidos por los Péptidos antimicrobianos en los promastigotes de *L. (V.) panamensis* y observados con microscopio invertido – 20 X.



A: no cambios – forma alargada, B: forma globosa (TAP y Cecropina A) y C: detritos (Melitina, MP-8 y MP-X). Fuente: Los autores

Los cambios morfológicos inducidos, fueron diferentes entre los péptidos evaluados, pasando desde no cambios, pasando por una forma redondeada hasta la presencia de abundantes detritos sin parásitos, posiblemente por un efecto citotóxico que conduce a la destrucción de los promastigotes a las concentraciones utilizadas (Tabla 5-4). A las cinco horas, solo los parásitos expuestos a TAP y Cecropina A, adquirieron una forma redondeada. A las 24 horas, se observó la aparición de abundante detrito en los parásitos tratados con Melitina, MP-8 y MP-X y el isotionato de pentamidina; mientras que solo a las 72 horas, en los expuestos a Polistes MA, Taquiplesina I y sulfato de paromomicina. Maganina 1, Dermaseptina S1, Bombinina, Cecropinas B y P1, Apamina y

MP-17 al parecer no inducen cambios en la morfología de los parásitos aún después de estar expuestos por 72 horas.

**Tabla 5-4:** Alteración de la motilidad, cambios morfológicos y porcentaje de los mismos, inducidos por los Péptidos antimicrobianos en los promastigotes de *L. (V.) panamensis* a las 5, 24 y 72 horas de exposición a la máxima concentración utilizada en las prueba de efectividad (50 µg/mL).

Analito	Máxima concentración utilizada (µg/mL)	5 horas		24 horas		72 horas	
		Alteración de la motilidad (%)	Tipo de cambios morfológico y porcentaje	Alteración de la motilidad (%)	Tipo de cambios morfológico y porcentaje	Alteración de la motilidad (%)	Tipo de cambios morfológico y porcentaje
Células solas		0	-	0	-	0	Esféricos 25
Maganina-1	50	50	-	75	-	75	-
Dermaseptina S1		50	-	75	-	100	-
Bombinina		75	-	100	-	100	-
Andropina		50	-	50	-	75	Esféricos (25)
TAP		75	Esféricos (25)	75	Esféricos (50)	75	Esféricos (75)
Cecropina B		50	-	50	-	75	-
Cecropina P1		0	-	0	-	0	-
Cecropina A		25	Esféricos (10)	25	Esféricos (10)	25	Esféricos (10)
Polistes MA		50	-	75	-	100	Detritos (100)
Melitina		100	-	100	Detritos (100)	100	Detritos (100)
Taquiplesina I		25	-	50	-	100	Detritos (100)
Apamina		0	-	0	-	0	-
Pr-2		25	-	25	-	90	Esféricos (10)
MP-8		75	-	100	Detritos (100)	100	Detritos (100)
MP-17		0	-	25	-	50	-
MP-X		50	-	100	Detritos (100)	100	Detritos (100)
CLIP		0	-	0	-	0	Esféricos (25)
DMSO 3%	0.003%	0	-	0	-	25	Esféricos (25)
Isotonato de pentamidina	100	100	Esféricos (50)	100%	Detritos (90)	100	Detritos (100)
Sulfato de paromomicina	1600	50	Esféricos (25)	75%	Esféricos (50)	100	Detritos (100)

El hecho que MP-8 y Dermaseptina S1 junto con otros 11 péptidos, disminuyeran la motilidad de los promastigotes de *L. (V.) panamensis* a las 5 horas de incubación y que no se produjeran cambios sustanciales en la morfología (células redondeadas), hace pensar que posiblemente estén ejerciendo su acción a nivel de membrana, en especial considerando el corto tiempo de aparición de actividad sobre los promastigotes y cuando se relaciona este modo de acción, con la tendencia de estructura secundaria de los péptidos a formar hélice  $\alpha$  (Dathe and Wieprecht, 1999). De 17 péptidos, 13 de ellos

(excepto Maganina-1, Polistes MA, Taquiplesina I y CLIP) tienen tendencia a formar hélice  $\alpha$ , basados en los experimentos de Dicroísmo circular realizados (Tabla 1-3).

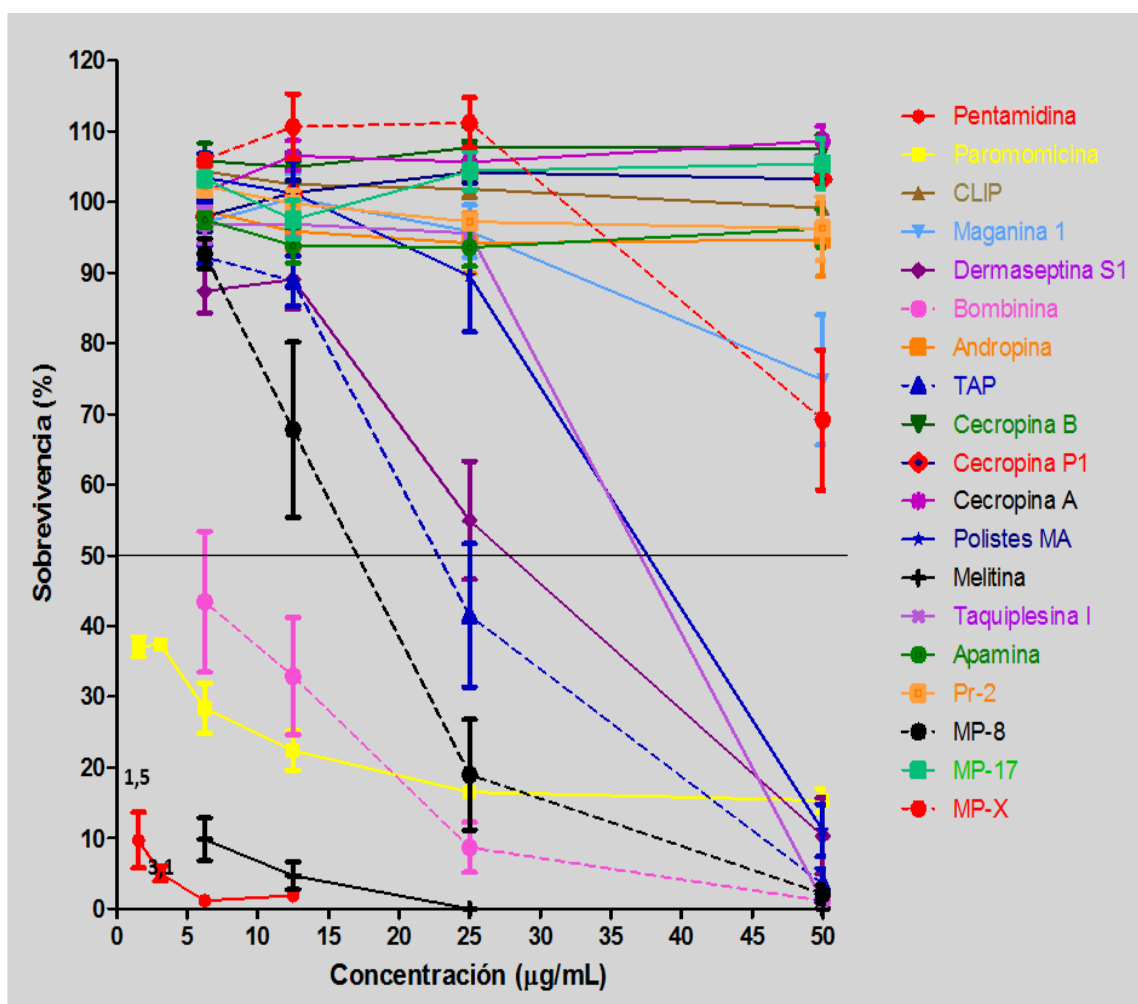
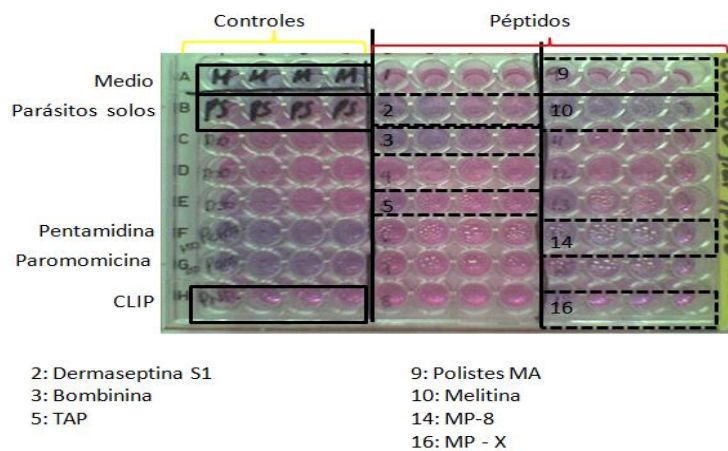
Los seis péptidos que a las 72 horas causaron reducción de la motilidad de los promastigotes en un 100% con destrucción aparente de los parásitos (detritos), fueron a su vez efectivos sobre los promastigotes de *L. (V.) panamensis* en el ensayo con resazurina: Dermaseptina S1, Bombinina, Melitina, Taquiplesina I, MP-8 y MP-X. Como Dermaseptina S1 y Bombinina, causaron reducción de la motilidad sin cambios morfológicos, y Polistes MA que no mostró efectividad en el ensayo de resazurina, hace considerar la posibilidad que se esté dando un modo de acción diferente; pero no se puede concluir al respecto hasta realizar más estudios en especial cuando se ha visto que péptidos como Maganina y Melitina, que forman poros por el mecanismo de “poro toroidal”, presentan comportamientos citotóxicos muy diferentes (Maher and McClean, 2006), siendo evidenciado en el presente estudio.

Melitina y el isotionato de pentamidina redujeron la viabilidad de más del 90% de los promastigotes de *L. (L.) major* a concentraciones menores de 6.3 y 1.5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Bombinina, MP-8 y sulfato de paromomicina, tuvieron efecto sobre la viabilidad del 80% de los parásitos a 25  $\mu\text{g/mL}$ ; y TAP y Dermaseptina S1, redujeron la población de parásitos en un 50 y 80% a concentraciones alrededor de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Maganina 1 y MP-X, inhibieron a menos del 30% de la población a 50  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que los péptidos Cecropinas A, B y P1, Andropina, Pr-2, CLIP, Apamina y MP-17 no fueron activos sobre la forma de promastigotes de *L. (L.) major* a la máxima concentración utilizada de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19-4).

Los resultados obtenidos muestran el efecto in vitro de un grupo de Péptidos antimicrobianos sintéticos de origen catiónico sobre las formas extracelulares de *L. (V.) panamensis* uno de los principales agentes causantes de la LC en Colombia y el segundo en Latinoamérica después de *L. (V.) braziliensis* y sobre el principal agente en Afro-Eurasia, la *L.(L.) major*.



**Figura 18-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre los promastigotes de *Leishmania (L.) major*.



**Tabla 6-4:** Efecto de los Péptidos antimicrobianos sobre la viabilidad de los promastigotes de *Leishmania (V.) panamensis* y *L. (L.) major*, después de 72 horas de exposición.

Analito	<i>L. (V.) panamensis</i>		<i>L. (L.) major</i>	
	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de confianza 95%	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de confianza 95%
Maganina-1	> 50.0		> 50.0	
Dermaseptina S1	24.6	19.3 - 31.8	25.4	
Bombinina	26.4	19.7 - 37.6	< 6.3	
Andropina	> 50.0		> 50.0	
TAP	46.3		23.2	19.1 - 26.0
Cecropina B	> 50.0		> 50.0	
Cecropina P1	> 50.0		> 50.0	
Cecropina A	> 50.0		> 50.0	
Polistes MA	> 50.0		40.7	
Melitina	7.2	11.9	< 6.3	
Taquiplesina I	> 50.0		42.1	
Apamina	> 50.0		> 50.0	
Pr-2	> 50.0		> 50.0	
MP-8	27.0		15.9	12.9 - 19.9
MP-17	> 50.0		> 50.0	
MP-X	49.9		> 50.0	
Isotionato de pentamidina	< 6.3		< 1.5	
Sulfato de paromomicina	22.8	12	< 1.5	
CLIP	> 50.0		> 50.0	

Se identificó en esta prueba de tamizaje que los Péptidos antimicrobianos activos sobre las formas de promastigotes de *L.(V.) panamensis* fueron Melitina, Dermaseptina S1, Bombinina y MP-8, seguida por TAP, MP-X, Polistes MA y Pr-2 y, sobre *L. (L.) major*, Melitina, Bombinina, MP-8, TAP, Dermaseptina S1, seguidos por Taquiplesina I, Polistes MA, MP-X y Maganina I, concluyéndose que hay diferencias en la sensibilidad de estas dos especies de parásitos en la forma de promastigotes a la acción de los péptidos TAP, Bombinina, Polistes MA y el sulfato de paromomicina (Tabla 6-4). *L. (L.) major* fue sensible a la acción de un mayor número de péptidos. Las CE<sub>50</sub> de los péptidos efectivos sobre los promastigotes de *L. (V.) panamensis* estuvieron en un rango entre 7.2 y 49.9 µg/mL (Melitina y MP-X, respectivamente), mientras que en *L. (L.) major*, entre 15.9 y 40.7 µg/mL (MP-8 y Polistes MA respectivamente), concentraciones superiores a las obtenidas para el medicamento control isotionato de pentamidina (CE<sub>50</sub> de <6.3 µg/mL en *L. (V.) panamensis* y <1.5 µg/mL en *L. (L.) major*) y el sulfato de paromomicina (CE<sub>50</sub> de 22.8 µg/mL en *L. (V.) panamensis* y <1.5 µg/mL en *L. (L.) major*).

Para Péptidos antimicrobianos a los que se les piensa dar un uso clínico, la selectividad es crucial para garantizar que solo tengan actividad sobre el parásito y no sobre las

células hospedadoras del organismo receptor, contribuyendo a que su uso sea seguro, y es por eso que se calcula el índice de selectividad o IS. En los estudios de infección, se acepta un IS de dos, calculado a partir de la  $CL_{50}$  o  $CI_{50}$  de una sustancia en la célula hospedadora dividido sobre la  $CE_{50}$  en los amastigotes (Muñoz et al., 2006); en el caso de los promastigotes, varios autores estiman que un índice de selectividad (IS) mayor de uno, calculado a partir de la  $CI_{50}$  de una sustancia en la célula hospedadora dividido sobre la  $CE_{50}$  en los promastigotes, indica que dicha sustancia evaluada es más selectiva para el parásito y un valor igual o menor de 1 es más selectivo para la célula hospedadora (Tiuman et al., 2005; Martin-Quintal et al., 2009), basados en la diferencia entre las sensibilidades entre amastigotes y promastigotes, identificándose a estos últimos como más resistentes a la acción de sustancias con actividad antileishmanial (Travi, 2009; Vermeersch et al., 2009).

Utilizando la  $CI_{50}$  en las células de origen humano (U937 fenotipos adherente y en suspensión y MSPH) y murino (J774) y relacionándolas con las  $CE_{50}$  de los péptidos en los promastigotes, se encontró más selectividad ( $IS > 1$ ) sobre *L. (V.) panamensis* de Melitina, Dermaseptina S1, MP-8, Bombinina y TAP y en *L. (L.) major* de Bombinina, Melitina, MP-8, TAP, Dermaseptina S1, Polistes MA y Taquiplesina I (Tabla 7-4).

Los miembros del subgénero *Viannia* expresan niveles de LPG solo en un 5 o 10% de lo encontrado en el subgénero *Leishmania* (Muskus et al., 1997; Soares et al., 2005), reportándose altos niveles de GIPLs en las membranas de los parásitos del subgénero *Viannia*: *L. (V.) panamensis* y *braziliensis* (Zawadzki et al., 1998; Silveira et al., 2005), y como los Péptidos antimicrobianos tienen afinidad por los fosfolípidos, ese menor porcentaje de LPG a nivel de membrana en el subgénero *Viannia* comparado con el subgénero *Leishmania*, podría dar lugar a una menor interacción con la membrana y explicar la diferencia en la actividad sobre *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) major*.







Las membranas de los eucariotes contienen predominantemente fosfolípidos neutros y por lo tanto son generalmente menos susceptibles a la ruptura por los Péptidos antimicrobianos; adicionalmente, la presencia de colesterol estabiliza la bicapa lipídica e incrementa su resistencia a la acción de estas moléculas. Los Péptidos antimicrobianos tienen generalmente menor afinidad por la membrana de las células que presentan una carga neta neutra por una composición fosfolipídica rica en zwitteriónicos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina o esfingomiélin) presente comúnmente en las membranas citoplasmáticas de mamíferos (Matsuzaki et al., 1999; Shai, 1999). Comparativamente, la membrana de la *Leishmania* presenta algunas características particulares; a) tiene una fuerte carga negativa debido a los altos niveles del polisacárido aniónico LPG, que cubre más del 60% de la superficie; b) está asociada con una alta actividad proteolítica debido a la presencia de Gp63 (más de  $5 \times 10^5$  copias/parásito) y c) su composición lipídica es caracterizada por tener un más alto porcentaje de fosfolípidos aniónicos que las membranas de mamíferos estándar, teniendo un 30% de ergosterol en lugar de colesterol; contribuyendo a aumentar la fluidez de la membrana (Diaz-Achirica et al., 1998). Todo lo anterior ayudaría a explicar el porqué de la selectividad que tuvieron los péptidos Melitina, MP-8, Dermaseptina S1, Bombinina, TAP, Polistes MA y Taquiplesina I sobre los promastigotes ( $IS > 1$ ).

En conclusión, los péptidos seleccionados como promisorios son aquellos efectivos sobre los promastigotes de *Leishmania* ( $IS > 1$ ) e inductores de porcentajes de hemólisis (criterio de seguridad) a concentraciones superiores a las inhibitorias de la viabilidad de las células nucleadas de origen humano (Tabla 5-4). Ellos son: MP-8, Bombinina, Dermaseptina S1 y TAP para ambas especies de parásito y Taquiplesina I y Polistes MA selectivamente para *L. (L.) major*, cuya efectividad debe corroborarse con los estudios sobre la forma intracelular o de amastigote. Aunque Melitina presentó altos IS no se puede considerar como promisorio debido a su comportamiento altamente hemolítico y citotóxico, previamente reportados (Tosteson et al., 1985; Maher and McClean, 2006).

Las CE50 publicadas en estudios anteriores para Taquiplesina I, Dermaseptina S1 y Melitina sobre promastigotes de *Leishmania*, son muy cercanas a las reportadas en el presente estudio (Tabla 8-4) y las diferencias pueden deberse a las características propias de las membranas de las diferentes especies, a variaciones lote y lote de los péptidos, a los porcentajes de impurezas presentes luego del proceso de síntesis, o a la

técnica utilizada para evaluar la actividad antileishmanial. En este estudio, se utilizó la reducción de la resazurina para evaluar la actividad de los péptidos sobre los parásitos, con el inconveniente que no fue posible retirar el medio consumido durante 72 horas de incubación por estar los parásitos en suspensión, los que adicionalmente estuvieron expuestos a los compuestos 48 horas adicionales reduciendo la resazurina a resofurina, situación que pudo influir en los resultados obtenidos. En el caso de los péptidos utilizados, la pureza fue del 95%.

**Tabla 8-4:** Péptidos antimicrobianos y efectividad sobre promastigotes de *Leishmania* reportados y comparados con los encontrados en el presente estudio, expresados en  $\mu\text{M}/\text{mL}$ .

Péptido	Parásito (promastigotes)	CE <sub>50</sub>	Referencia
Taqiuplesina I	<i>L. braziliensis</i>	12.50 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Lofgren <i>et al</i> , 2008
	<i>L. panamensis</i>	> 22.2 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Presente estudio
	<i>L. major</i>	18.7 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Presente estudio
Dermaseptina S1	<i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. chagasi</i> y <i>L. mexicana</i>	1.0 a 20 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Brand <i>et al</i> , 2006 y Savoia <i>et al</i> , 2008
	<i>L. panamensis</i> y <i>L. major</i>	18.5 $\pm$ 0.7 y 5.2 $\pm$ 0.6 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Pérez-Cordero <i>et al</i> , 2011
	<i>L. panamensis</i>	7.2 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Presente estudio
	<i>L. major</i>	7.4 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Presente estudio
Melitina	<i>L. donovani</i>	< 1.0 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Luque-Ortega <i>et al</i> , 2008
	<i>L. panamensis</i> y <i>L. major</i>	> 35.3 y 26.2 $\pm$ 0.4 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Pérez-Cordero <i>et al</i> , 2011
	<i>L. panamensis</i>	2.7 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Presente estudio
	<i>L. major</i>	2.2 $\mu\text{M}/\text{mL}$	Presente estudio

Para el cálculo de las CE<sub>50</sub> se tuvieron en cuenta los pesos moleculares calculados y reportados durante el proceso de síntesis para Taquiuplesina (PM 2251.2), Dermaseptina S1 (PM 3437.6) y Melitina (PM 2829.7).

Péptidos como Andropina, Cecropinas A, B y P1, Apamina, Pr-2 y MP-17 y MP-X (Figuras 15-4 y 17-4), no fueron muy efectivos sobre la forma de promastigotes de *Leishmania* a las máximas concentraciones utilizadas (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sin embargo, no se deben descartar como sustancias sin actividad antileishmanial en especial cuando (excepto MP-X) a) no indujeron inhibición del crecimiento celular ni hemólisis a las máximas concentraciones del estudio, lo que los haría seguros, b) pueden utilizar un mecanismo de entrada diferente al de formar poros de membrana (Luque-Ortega *et al*, 2008) lo que se evidenció al observarlos al microscopio induciendo cambios morfológicos (Tabla 5-4), c) pueden requerir de mecanismos celulares para poder ejercer su acción, y por lo tanto no sean activos sobre los promastigotes pero si sobre amastigotes; es conocido que sustancias como las sales de antimonio pentavalente no muestran efectos



sobre los promastigotes debido a que requieren de estos mecanismos intracelulares para poder actuar sobre los parásitos (Lucumi et al., 1998), adicionalmente, se ha reportado efecto de Andropina y Pr-2 sobre la forma de amastigotes intracelulares en un modelo de infección con células dendríticas (Perez-Cordero et al., 2011), d) es posible que los péptidos hayan sido sensibles a la acción de las metaloproteasas de superficie producidas por los parásitos (Kulkarni et al., 2006) y e) hay diferencias significativas entre los promastigotes y los amastigotes en su bioquímica y sensibilidad a fármacos estándar y experimentales (Escobar et al., 2002); se ha descrito que los promastigotes son más resistentes que los amastigotes (Vermeersch et al., 2009), por ejemplo, Travi encontró que al evaluar 73 moléculas guía utilizando un sistema *ex vivo* y promastigotes en cultivo, hubo una falta de correlación entre los resultados, siendo los promastigotes más resistentes (69.8%) que los amastigotes intracelulares (Travi, 2009), y es por todo lo anterior que los tamizajes que solo utilizan la forma de promastigote o de amastigotes axénicos no son suficientes para decidir sobre la efectividad de una determinada sustancia (De Muylder et al., 2011), lo que motiva a proponer el inicio del estudio *in vitro* sobre la forma de amastigotes intracelulares pero con al menos ocho diluciones seriadas, partiendo de una concentración de 10 µg/mL o sea 5 veces menos a la que se espera produzca efecto inhibitorio de la viabilidad de las células hospederas (Muñoz et al., 2006; Perez-Cordero et al., 2011).

Por otro lado y aunque el modelo de infección en células de origen humano U937 ha sido ampliamente utilizado para evaluar actividad antileishmanial (Rey et al., 1990), la producción de proteasas por estas células podría causar daño en los péptidos e inhibir su actividad, razón por lo que se propone utilizar además otros tipos de macrófagos de origen humano para realizar los ensayos *in vitro*, amparados también en las diferencias encontradas entre las  $CE_{50}$  en los dos fenotipos evaluados y que necesitan ser confirmadas. Como ejemplo de otro tipo de macrófagos humanos están la línea celular TPH-1 (Dasgupta et al., 2003) o macrófagos diferenciados a partir de los MSPH (Berman et al., 1979).

Adicionalmente, todavía deben resolverse algunos problemas relacionados con su uso *in vivo* ya que algunos de estos péptidos naturales (por ejemplo, Melitina) son particularmente hemolíticos o presentan una semivida corta debido a su baja estabilidad en la sangre posiblemente por la presencia de proteasas y, en particular de peptidasas,

lo cual hace indispensable que a los péptidos que resulten promisorios luego del estudio en modelos de infección *in vitro* e *in vivo* en hámster, se les evalúe su perfil de resistencia o sensibilidad a la acción de proteasas en especial si se considera utilizarlos por una vía diferente a la tópica y porque la *Leishmania* también produce proteasas capaces de dañar a los péptidos inhibiendo su acción (Kulkarni et al., 2006). La resistencia mostrada por las células HeLa y HepG2 sugiere que al menos los péptidos evaluados y excepto la Melitina, podrían no tener efecto deletéreo sobre los epitelios y hepatocitos, lo que favorecería aún más el uso que tópico que se pretende darles.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que:

- Del grupo de Péptidos antimicrobianos evaluados solo el TAP tiene un 48% de identidad con proteínas humanas y homología con el Péptido antimicrobiano  $\beta$ -Defensina 4A, y dado su peso molecular inferior a 5000 Da y su potencial uso tópico no induciría inmunogenicidad.
- Los péptidos hemolíticos fueron Melitina, MP-X, Dermaseptina S1 y MP-8, siendo Melitina, el péptido que presentó la actividad hemolítica más fuerte, superior a la del agua destilada utilizada como control de hemólisis (100%).
- Los péptidos Melitina, Bombinina, MP-8, MP-X y Dermaseptina S1 disminuyeron la viabilidad de las potenciales células hospedadoras humanas y murinas a mayores concentraciones ( $CI_{50}$  de 20.9 a 49.9  $\mu\text{g/mL}$ ) que la pentamidina ( $CI_{50}$ , de < 3.4 a 20.5  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo los monocitos no activados: MSPH y U937 no adherentes, las células más sensibles a la acción de los péptidos y Melitina el péptido que tuvo un efecto deletéreo sobre todas las células evaluadas: monocitos – macrófagos, hepáticas, epiteliales, hematíes, limitando su potencial uso en humanos.
- Las células U937 en sus dos fenotipos adherente y no adherente, presentaron un comportamiento diferente, con mayor efecto de los Péptidos antimicrobianos Bombinina, MP-8 y MP-X sobre las células en suspensión y casi nulo en el fenotipo adherente a las concentraciones del estudio; situación que necesita ser investigada

para descartar un posible efecto de la técnica empleada, de tipo mecánico o una producción de enzimas proteolíticas por parte de las células U937 activadas.

- La mayor actividad de los péptidos Melitina, MP-X, MP-8, Bombinina y Dermaseptina S1 sobre las células nucleadas y anucleadas y los parásitos con reducción de la motilidad sin cambios aparentes de la morfología de *L. (V.) panamensis* en las primeras cinco horas, se relaciona con la tendencia de estructura secundaria en hélice  $\alpha$  (Dicroísmo circular), señalando un potencial modo de acción sobre membrana. La actividad de los péptidos TAP (hélice  $\alpha$ ), Polistes MA (no estructurado) y Taquiplesina I (hebra  $\beta$ ) con selectividad sobre los promastigotes de *L. (L.) major* podría indicar un modo de acción diferente al de tipo membranal.
- Los péptidos Melitina, Bombinina, Dermaseptina S1, MP-8 y TAP fueron los más efectivos sobre la forma de promastigotes de *L. (V.) panamensis* ( $CE_{50}$  entre 7.6 y 46.3  $\mu\text{g/mL}$ ) y *L. (L.) major* ( $CE_{50}$  entre < 6.3 y 42.1  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo estos últimos sensibles a un mayor número de péptidos (7/16 (43.5%)) comparado con *L. (V.) panamensis* (4/16 (25%)), permitiendo seleccionar los péptidos que podrían considerarse como promisorios por inducir poca hemólisis y tener un IS >1 a: MP-8, Bombinina, Dermaseptina S1 y TAP para ambas especies del parásito y Taquiplesina I y Polistes MA selectivamente sobre *L. (L.) major*. En la revisión bibliográfica realizada a la fecha, no se encuentra ningún reporte previo (a excepción de la Dermaseptina) de actividad antileishmanial de MP-8, Bombinina, TAP y por lo tanto merecen continuar siendo estudiados para identificar su efectividad sobre la forma de parásito intracelular en un modelo de infección *in vitro* e *in vivo*, con miras a elaborar un producto de uso tópico para el tratamiento de LC. Además, las  $CE_{50}$  reportadas en estudios anteriores para Taquiplesina I, Dermaseptina S1 y Melitina sobre promastigotes de *Leishmania* pero de especies diferentes, son cercanas a las encontradas en el presente estudio.

## 5.2 Recomendaciones

- Realizar estudios de efectividad *in vitro* e *in vivo* en hámster evaluando adicionalmente su potencial actividad inmunomoduladora de los péptidos promisorios: MP-8, Bombinina, TAP y Dermaseptina S1 sobre *L. (V.) panamensis*, y MP-8, Bombinina, TAP, Dermaseptina S1, Polistes MA y Taquiplesina I sobre *L. (L.) major*.
- Evaluar la estabilidad de los péptidos a la degradación por proteasas.
- Identificar si en los sobrenadantes de los cultivos de las células, parásitos (promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares) hay presencia de proteasas.
- Verificar la citotoxicidad de los péptidos en las células y en los parásitos.
- Confirmar el efecto de los péptidos sobre la integridad de la membrana plasmática y/o inducción de muerte por necrosis, autofagia o apoptosis en células y parásitos, con ayuda de la microscopía y citometría de flujo y avanzar en la elucidación del mecanismo de acción sobre los parásitos.
- No descartar a péptidos como Maganina 1, Andropina, Cecropinas A, B y P1, Apamina, Pr-2, MP-17 y MP-X, por no mostrar actividad sobre la forma de promastigotes de *Leishmania*.

## Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2010). Cellular and molecular immunology. New York, Elsevier.
- Abbassi, F., Oury, B., Blasco, T., Sereno, D., Bolbach, G., Nicolas, P., et al. Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African sand fly *Phlebotomus perniciosus*. *Peptides*. 2008;29(9):1526-1533.
- Adam, I. and Hagelnur, A. A. Artesunate plus sulfamethoxypyrazine/pyrimethamine for the treatment of cutaneous leishmaniasis: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(4):380-381.
- Akopyants, N. S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 2009;324(5924):265-268.
- Akuffo, H., Hultmark, D., Engstom, A., Frohlich, D. and Kimbrell, D. *Drosophila* antibacterial protein, cecropin A, differentially affects non-bacterial organisms such as *Leishmania* in a manner different from other amphipathic peptides. *Int J Mol Med*. 1998;1(1):77-82.
- Al Hamdi, K., Awad, A. H. and Moker, H. M. Evaluation of intralesional 0.2% ciprofloxacin as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J*. 2010;16(1):89-93.
- Alberola, J., Rodriguez, A., Francino, O., Roura, X., Rivas, L. and Andreu, D. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(2):641-643.
- Arana, B. A., Navin, T. R., Arana, F. E., Berman, J. D. and Rosenkaimer, F. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimonate with or without interferon-gamma in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin Infect Dis*. 1994;18(3):381-384.
- Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1269-1281.
- Awasthi, A., Mathur, R. K. and Saha, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 2004;119(6):238-258.
- Azzouz, S., Maache, M., Garcia, R. G. and Osuna, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;96(1):60-65.
- Babaev, O. G. and Babaeva, O. B. [Topical treatment of cutaneous leishmaniasis with a carbon dioxide laser]. *Vestn Dermatol Venerol*. 1985;(4):52-55.
- Baek, Y. S., Haas, S., Hackstein, H., Bein, G., Hernandez-Santana, M., Lehrach, H., et al. Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC Immunol*. 2009;10:18.
- Beisswenger, C. and Bals, R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;6(3):255-264.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. and Sacks, D. A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 2000;165(2):969-977.

- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R. and Vaidya, T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;127(1):23-35.
- Berman, J. D., Dwyer, D. M. and Wyler, D. J. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro*. *Infect Immun.* 1979;26(1):375-379.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Rodríguez-Palenzuela, P., García-Olmedo, F. and Rivas, L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Exp Parasitol.* 2009;122(3):247-249.
- Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., et al. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Exp Parasitol.* 2011;127(3):637-645.
- Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:61-92.
- Botsford, J. L. A comparison of ecotoxicological tests. *Altern Lab Anim.* 2002;30(5):539-550.
- Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, L., et al. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2004;72(12):7140-7146.
- Bradford, S. M. and Kulkarni, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology* 2010;126(3):397 - 405.
- Brand, G. D., Leite, J. R., de Sa Mandel, S. M., Mesquita, D. A., Silva, L. P., Prates, M. V., et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(3):739-746.
- Brand, G. D., Leite, J. R., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V., Azevedo, R. B., et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49332-49340.
- Brodie, T. M., Smith, M. C., Morris, R. V. and Titus, R. G. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun.* 2007;75(5):2359-2365.
- Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-250.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., Jr. and Tack, B. F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(5):465-478.
- Brown, K. L. and Hancock, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(1):24-30.
- Cáceres, R. A. (2007). *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*, Ediciones Diaz de Santos.
- Cárdenas, R., Sandoval, C. M., Rodríguez-Morales, A. J. and Franco-Paredes, C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):273-277.
- Correia, D., Macedo, V. O., Carvalho, E. M., Barral, A., Magalhaes, A. V., de Abreu, M. V., et al. [Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996;29(5):447-453.

- Croft, S. L., Seifert, K. and Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):399-410.
- Croft, S. L. and Yardley, V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des.* 2002;8(4):319-342.
- Chicharro, C., Granata, C., Lozano, R., Andreu, D. and Rivas, L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(9):2441-2449.
- Chiu, J. H., Hu, C. P., Lui, W. Y., Lo, S. C. and Chang, C. M. The formation of bile canaliculi in human hepatoma cell lines. *Hepatology.* 1990;11(5):834-842.
- Dasgupta, B., Roychoudhury, K., Ganguly, S., Akbar, M. A., Das, P. and Roy, S. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. *Scand J Immunol.* 2003;57(4):366-374.
- de Freitas Balanco, J. M., Moreira, M. E., Bonomo, A., Bozza, P. T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol.* 2001;11(23):1870-1873.
- De Muylder, G., Ang, K. K., Chen, S., Arkin, M. R., Engel, J. C. and McKerrow, J. H. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(7):e1253.
- de Oliveira-Silva, F., de Moraes-Teixeira, E. and Rabello, A. Antileishmanial activity of azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(5):745-749.
- Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(3):239-243.
- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-318.
- Desjeux, P. and Alvar, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97 Suppl 1:3-15.
- Diaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Andreu, D. and 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 ( Pt 1):453-460.
- Draper, G., Ramsey, H. J. and Dupertuis, C. W. Variation in behavior of buffy coat cultures among individuals of different constitution types *J Clin Invest.* 1944;23(6):864-874.
- Epand, R. M. and Vogel, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462(1-2):11-28.
- Escobar, L., Rivera, A. and Aristizabal, F. A. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas *Vitae.* 2010;17(1):67-74.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C. and Croft, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 2002;81(2):151-157.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y. and Henson, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory



- cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101(4):890-898.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C. and Van der Auwera, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010;10(2):238-245.
- Fuerzas Militares de Colombia. Rendición de Cuentas - Subsistema de salud de las Fuerzas 2010 - 2011.[citado 9 Abr 2012] [22 pantallas]. Disponible en: URL: [http://www.mindefensa.gov.co/irj/go/km/docs/Mindefensa/Documentos/descargas/Sobre\\_el\\_Ministerio/RendicionCuentas/2011/informeSanidadMilitar.pdf](http://www.mindefensa.gov.co/irj/go/km/docs/Mindefensa/Documentos/descargas/Sobre_el_Ministerio/RendicionCuentas/2011/informeSanidadMilitar.pdf).
- Gopal, R., Park, J. S., Seo, C. H. and Park, Y. Applications of circular dichroism for structural analysis of gelatin and antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3229-3244.
- Gordon, Y. J., Romanowski, E. G. and McDermott, A. M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res.* 2005;30(7):505-515.
- Grogl, M., Schuster, B. G., Ellis, W. Y. and Berman, J. D. Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin. *J Parasitol.* 1999;85(2):354-359.
- Guerrero, E., Saugar, J. M., Matsuzaki, K. and Rivas, L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):2980-2986.
- Gunn, J. S. Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res.* 2001;7(1):57-62.
- Hancock, R. E. and Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000;8(9):402-410.
- Henao, H. H., Osorio, Y., Saravia, N. G., Gomez, A. and Travi, B. Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application. *Biomedica.* 2004;24(4):393-402.
- Hepburn, N. C., Nolan, J., Fenn, L., Herd, R. M., Neilson, J. M., Sutherland, G. R., et al. Cardiac effects of sodium stibogluconate: myocardial, electrophysiological and biochemical studies. *Qjm.* 1994;87(8):465-472.
- Hepburn, N. C., Tidman, M. J. and Hunter, J. A. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88(6):700-703.
- Hernandez, C., Mor, A., Dagger, F., Nicolas, P., Hernandez, A., Benedetti, E. L., et al. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. *Eur J Cell Biol.* 1992;59(2):414-424.
- Hicsonmez, G., Jama, H. and Ozsoylu, S. Severe leucopenia during treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(3):417.
- Houghten, R. A., Ostresh, J. M. and Pratt, S. M. Modified solid-phase methods for the rapid synthesis of opioid peptides. *NIDA Res Monogr.* 1991;112:239-255.
- Instituto Nacional de Salud. Informe Epidemiológico Nacional 2009. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial [Serial on line] 2009 [citado 25 Ago 2011] [332 pantallas]. Disponible en: URL: <http://190.27.195.165:8080/index.php?idcategoria=82972>.
- Instituto Nacional de Salud. Estadística de la vigilancia - Casos totales y acumulados a semana 43 de 2011. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial [Serial on line] 2011 [citado

- 16 Nov 2011] [2 pantallas]. Disponible en: URL: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=83974&pag=2>
- Johnson, W. D., Jr., Mei, B. and Cohn, Z. A. The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *J Exp Med.* 1977;146(6):1613-1626.
- Kedzierski, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis.* 2010;2(2):177-185.
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10125-10130.
- Koczulla, A. R. and Bals, R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs.* 2003;63(4):389-406.
- Konno, K., Rangel, M., Oliveira, J. S., Dos Santos Cabrera, M. P., Fontana, R., Hirata, I. Y., et al. Decoralin, a novel linear cationic alpha-helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides.* 2007;28(12):2320-2327.
- Kuckelhaus, S. A., Leite, J. R., Muniz-Junqueira, M. I., Sampaio, R. N., Bloch, C., Jr. and Tosta, C. E. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). *Exp Parasitol.* 2009;123(1):11-16.
- Kulkarni, M. M., Barbi, J., McMaster, W. R., Gallo, R. L., Satoskar, A. R. and McGwire, B. S. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. *Cell Microbiol.* 2011;13(6):913-923.
- Kulkarni, M. M., McMaster, W. R., Kamysz, E., Kamysz, W., Engman, D. M. and McGwire, B. S. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol.* 2006;62(5):1484-1497.
- Kulkarni, M. M., McMaster, W. R., Kamysz, W. and McGwire, B. S. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem.* 2009;284(23):15496-15504.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 2008;9(4):299-306.
- Lateef, S. S., Gupta, S., Jayathilaka, L. P., Krishnanchettiar, S., Huang, J. S. and Lee, B. S. An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody production using DMF to solubilize peptides. *J Biomol Tech.* 2007;18(3):173-176.
- Lemaitre, C., Barre, A., Citti, C., Tardy, F., Thiaucourt, F., Sirand-Pugnet, P., et al. A novel substitution matrix fitted to the compositional bias in Mollicutes improves the prediction of homologous relationships. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:457.
- Lesmes, L. P., Bohorquez, M. Y., Carreno, L. F., Patarroyo, M. E. and Lozano, J. M. A C-terminal cationic fragment derived from an arginine-rich peptide exhibits in vitro antibacterial and anti-plasmodial activities governed by its secondary structure properties. *Peptides.* 2009;30(12):2150-2160.
- Lewis, W. H. and Rubin, M. I. Changes in the neutrophils and monocytes in cultures of the buffy coat of human blood in serum. *The Anatomical Record.* 1932;53(2):249 - 254.

- Lieke, T., Nylen, S., Eidsmo, L., McMaster, W. R., Mohammadi, A. M., Khamesipour, A., et al. Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol.* 2008;153(2):221-230.
- Lofgren, S. E., Miletti, L. C., Steindel, M., Bachere, E. and Barracco, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp Parasitol.* 2008;118(2):197-202.
- Loiseau, P. M., Gupta, S., Verma, A., Srivastava, S., Puri, S. K., Sliman, F., et al. *In vitro* activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1777-1780.
- Lopes, H. S. and Cruz, L. M., Eds. *Computational Biology and Applied Bioinformatics Croatia: InTech.* 2011.
- Lucumi, A., Robledo, S., Gama, V. and Saravia, N. G. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):1990-1995.
- Luenser, K. and Ludwig, A. Variability and evolution of bovine beta-defensin genes. *Genes Immun.* 2005;6(2):115-122.
- Luque-Ortega, J. R., Saugar, J. M., Chiva, C., Andreu, D. and Rivas, L. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem J.* 2003;375(Pt 1):221-230.
- Luque-Ortega, J. R., van't Hof, W., Veerman, E. C., Saugar, J. M. and Rivas, L. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *Faseb J.* 2008;22(6):1817-1828.
- Lynn, M. A., Kindrachuk, J., Marr, A. K., Jenssen, H., Pante, N., Elliott, M. R., et al. Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of leishmanolysin in parasite survival. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e1141.
- Mahdavi, M. A., Ed. *Bioinformatics - Trends and Methodologies.* Croatia: InTech. 2011.
- Maher, S. and McClean, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(9):1289-1298.
- Mahoney, A. B., Sacks, D. L., Saraiva, E., Modi, G. and Turco, S. J. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry.* 1999;38(31):9813-9823.
- Mandard, N., Bulet, P., Caille, A., Daffre, S. and Vovelle, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. *Eur J Biochem.* 2002;269(4):1190-1198.
- Mangoni, M. L., Papo, N., Saugar, J. M., Barra, D., Shai, Y., Simmaco, M., et al. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. *Biochemistry.* 2006;45(13):4266-4276.
- Mangoni, M. L., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M. and Rivas, L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J Biol Chem.* 2005;280(2):984-990.
- Martin-Quintal, Z., Moo-Puc, R., Gonzalez-Salazar, F., Chan-Bacab, M. J., Torres-Tapia, L. W. and Peraza-Sanchez, S. R. *In vitro* activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. *J Ethnopharmacol.* 2009;122(3):463-467.
- Martin, E., Ganz, T. and Lehrer, R. I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol.* 1995;58(2):128-136.

- Matsuzaki, K., Sugishita, K. and Miyajima, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 1999;449(2-3):221-224.
- McConville, M. J. and Naderer, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:543-561.
- McGwire, B. S. and Kulkarni, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp Parasitol.* 2010;126(3):397-405.
- Mencia-Gutierrez, E., Gutierrez-Diaz, E., Rodriguez-Peralto, J. L. and Monsalve-Cordova, J. Old World eyelid cutaneous leishmaniasis: a case report. *Dermatol Online J.* 2005;11(3):29.
- Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. an Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry.* 1964;3:1385-1390.
- Mikus, J. and Steverding, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int.* 2000;48(3):265-269.
- Ministerio de Protección Social de Colombia. Guía de atención de la leishmaniasis. [Medicina & Laboratorio ISSN 0123-2576] 2011 [citado 16 Abr 2012] [28 pantallas]. Disponible en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2011/myl1111-12d.pdf>.
- Minodier, P. and Parola, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 2007;5(3):150-158.
- Mishra, B. B., Kale, R. R., Singh, R. K. and Tiwari, V. K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia.* 2009;80(2):81-90.
- Mitropoulos, P., Konidas, P. and Durkin-Konidas, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63(2):309-322.
- Montalvo, A. M., Sifontes, S., Montano, I. and Espino, A. M. [The need for the use of chromogens for quantifying *Leishmania promastigotes* on plates from 96 wells]. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52(2):95-100.
- Morales, M. A., Cruz, I., Rubio, J. M., Chicharro, C., Canavate, C., Laguna, F., et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* 2002;185(10):1533-1537.
- Morsy, T. A., Abdel Rahman, E. G. and Ahmed, M. M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with Pentostam or cryosurgery. *J Egypt Soc Parasitol.* 1989;19(2):533-543.
- Mougneau, E., Bihl, F. and Glaichenhaus, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev.* 2011;240(1):286-296.
- Muniaraj, M., Sinha, P. K. and Das, P. Antileishmanial activity of drug infused mini-agar plates on *Leishmania donovani* promastigotes. *Trop Biomed.* 2010;27(3):657-661.
- Muñoz, D., Cardona, D., Cardona, A., Carrillo, L., Quiñones, W., Echeverri, F., et al. Efecto de hidrazonas sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis* y una proteasa de cisteína parasitaria. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 2006;13(2):5 - 12.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. and Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-1577.

- Muskus, C., Segura, I., Oddone, R., Turco, S. J., Leiby, D. A., Toro, L., et al. Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania viannia* subgenus. *J Parasitol.* 1997;83(4):671-678.
- Najim, R. A., Sharquie, K. E. and Farjou, I. B. Zinc sulphate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an *in vitro* and animal study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(6):831-837.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Nizet, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol.* 2006;8(1):11-26.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421-5426.
- O'Brien, J. G., Dong, B. J., Coleman, R. L., Gee, L. and Balano, K. B. A 5-year retrospective review of adverse drug reactions and their risk factors in human immunodeficiency virus-infected patients who were receiving intravenous pentamidine therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1997;24(5):854-859.
- Oliveira-Neto, M. P., Schubach, A., Mattos, M., da Costa, S. C. and Pirmez, C. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil--an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol.* 1997;36(6):463-468.
- Oliveira, M. C., Amorim, R. F., Freitas Rde, A. and Costa Ade, L. [A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(3):258-260.
- Olivier, M., Gregory, D. J. and Forget, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):293-305.
- Ovalle, C. E., Porras, L., Rey, M., Rios, M. and Camargo, Y. C. Geographic distribution of *Leishmania* species isolated from patients at the National Institute of Dermatology Federico Lleras Acosta E.S.E., 1995-2005. *Biomedica.* 2006;26 Suppl 1:145-151.
- Pan American Health Organization. Leishmaniasis. 2012 [citado 9 Abr 2012]; [1 pantalla]. Disponible en: URL: [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=3835&Itemid=4098&lang=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3835&Itemid=4098&lang=en) .
- Paredes, R., Laguna, F. and Clotet, B. Leishmaniasis in HIV-infected persons: a review. *J Int Assoc Physicians AIDS Care.* 1997;3(6):22-39.
- Paul, W. E. Infectious diseases and the immune system. *Sci Am.* 1993;269(3):90-97.
- Perez-Cordero, J. J., Lozano, J. M., Cortes, J. and Delgado, G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides.* 2011;32(4):683-690.
- Rasmussen, E. S. Use of Fluorescent Redox Indicators to Evaluate Cell Proliferation and Viability. *In Vitro Mol Toxicol.* 1999;12:47 - 58.
- Reddy, K. V., Yedery, R. D. and Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(6):536-547.
- Reithinger, R., Mohsen, M., Wahid, M., Bismullah, M., Quinnell, R. J., Davies, C. R., et al. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2005;40(8):1148-1155.

- Resende, J. M., Moraes, C. M., Prates, M. V., Cesar, A., Almeida, F. C., Mundim, N. C., et al. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides*. 2008;29(10):1633-1644.
- Rey, J. A., Travi, B. L., Valencia, A. Z. and Saravia, N. G. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43(6):623-631.
- Ricciardi, L. V. d. Terapéutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gac Méd Caracas*. 2009;117(2):93-111.
- Roch, P., Beschin, A. and Bernard, E. Antiprotozoan and Antiviral Activities of Non-cytotoxic Truncated and Variant Analogues of Mussel Defensin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2004;1(2):167-174.
- Romero, G. A., Lessa, H. A., Macedo, V., de Carvalho, E. M., de Magalhaes, A. V., Orge, M. d. I. G., et al. [Aminosidine in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;29(2):215-216.
- Rosengren, K. J., Mcmanus, A. and Craik, D. J. The structural and functional diversity of naturally occurring antimicrobial peptides. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents*. 2002;1(4):319 - 341.
- Russell, D. G. and Talamas-Rohana, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol Today*. 1989;10(10):328-333.
- Rzany, B., Krutmann, J., Goertler, E. and Schopf, E. [Cutaneous leishmaniasis: treatment with cryotherapy and intramuscular injections of meglumine antimonate (glucantime)]. *Hautarzt*. 1990;41(2):98-101.
- Salamanca-Capusiri, E., Pinell, G. R., Huallpara, J. C. T. and Turba, A. G. Método colorimétrico - XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *Biofarbo*. 2008;16:21-27.
- Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N. and Regis-Roggero, A. Leishmaniasis *Dermatología Peruana*. 2004;14(2):82-98.
- Savoia, D., Guerrini, R., Marzola, E. and Salvadori, S. Synthesis and antimicrobial activity of dermaseptin S1 analogues. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(17):8205-8209.
- Savoia, D., Scutera, S., Raimondo, S., Conti, S., Magliani, W. and Polonelli, L. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol*. 2006;113(3):186-192.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. and Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*. 1953;97(5):695-710.
- Sereno, D., Cordeiro da Silva, A., Mathieu-Daude, F. and Ouaisi, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int*. 2007;56(1):3-7.
- Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1462(1-2):55-70.
- Sharquie, K. E. A new intralesional therapy of cutaneous leishmaniasis with hypertonic sodium chloride solution. *J Dermatol*. 1995;22(10):732-737.

- Silva, P. I., Jr., Daffre, S. and Bulet, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33464-33470.
- Silveira, T. G., Yoneyama, K. A., Takahashi, H. K. and Straus, A. H. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* glycolipid antigens and their reactivity with mAb SST-1, specific for parasites of *Viannia* subgenus. *Parasitology.* 2005;131(Pt 6):737-745.
- Singh, N., Gupta, R., Jaiswal, A. K., Sundar, S. and Dube, A. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(2):370-374.
- Soares, R. P., Cardoso, T. L., Barron, T., Araujo, M. S., Pimenta, P. F. and Turco, S. J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol.* 2005;35(3):245-253.
- Soto, J., Fuya, P., Herrera, R. and Berman, J. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clin Infect Dis.* 1998;26(1):56-58.
- Soto, J. and Soto, P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006;4(2):177-185.
- Soto, J. and Soto, P. [Oral miltefosine to treat leishmaniasis]. *Biomedica.* 2006;26 Suppl 1:207-217.
- Spath, G. F., Lye, L. F., Segawa, H., Sacks, D. L., Turco, S. J. and Beverley, S. M. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science.* 2003;301(5637):1241-1243.
- Tiuman, T. S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D. A., Dias Filho, B. P., Morgado-Diaz, J. A., de Souza, W., et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):176-182.
- Tosteson, M. T., Holmes, S. J., Razin, M. and Tosteson, D. C. Melittin lysis of red cells. *J Membr Biol.* 1985;87(1):35-44.
- Travi, B. Modelos animales para la búsqueda de drogas anti-*Leishmania*. *Biomedica.* 2009;29(Suplemento 1):114-115.
- Trun, W., Kiderlen, A. F. and Kolodziej, H. Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in *Leishmania*-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (Eps 7630). *Phytomedicine.* 2006;13(8):570-575.
- UniProt Consortium. UniProt Knowledgebase (UniProtKB), 2012 [citado 18 Abr 2012] [2 pantallas]. Disponible en: URL: <http://www.uniprot.org/help/about>
- van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(37):13837-13842.
- Vélez, I. D. and Agudelo, S. (1996). *Leishmaniasis. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea americana.* Medellín, Universidad de Antioquia.
- Vermeersch, M., da Luz, R. I., Tote, K., Timmermans, J. P., Cos, P. and Maes, L. *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3855-3859.

- Villa, S. Z. (2007). *Inmunología básica y Clínica México*, McGraw-Hill.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R. and Girkontaite, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390(6658):350-351.
- Waalkes, T. P. and Makulu, D. R. Pharmacologic aspects of pentamidine. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1976;43:171-177.
- Wang, G., Li, X. and Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 37, D933-D937. 2012 Abr [citado 23 Abr 2012]; [1 pantalla]. Disponible en: URL: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>
- Watanabe, H., Nakanishi, I., Yamashita, K., Hayakawa, T. and Okada, Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci*. 1993;104 ( Pt 4):991-999.
- Weinrauch, L., Livshin, R. and el-On, J. Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol*. 1987;117(5):666-668.
- Welgus, H. G., Campbell, E. J., Cury, J. D., Eisen, A. Z., Senior, R. M., Wilhelm, S. M., et al. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest*. 1990;86(5):1496-1502.
- World Health Organization. Report of the consultative meeting on cutaneous leishmaniasis. Neglected Tropical Diseases. Innovative and Intensified Disease Management Leishmaniasis Control Programme. [Serial on line]. 2008 [citado 22 Oct 2009] [36 pantallas]. Disponible en: URL: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Cutaneous\\_leish\\_cm\\_2008.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Cutaneous_leish_cm_2008.pdf).
- World Health Organization. Leishmaniasis control: Executive board 126 th session. Provisional agenda Item 4.13 EB 126/16. [Serial online] 2009 Nov [citado 21 feb 2011]; [3 pantallas]. Disponible en: URL: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB126/B126\\_16-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB126/B126_16-en.pdf). 2011, Feb 21 from [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Cutaneous\\_leish\\_cm\\_2008.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Cutaneous_leish_cm_2008.pdf)
- World Health Organization. Control of the Leishmaniases: Report of the meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniases. WHO Technical report . Series 949, 2010. [Serial online] 2010 Mar [citado 25 Aug 2011]; [201 pantallas]. Disponible en: URL: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf).
- World Health Organization. Leishmaniasis control: Executive board 126 th session. Provisional agenda Item 4.13 EB 126/16. [Serial online] 2009 Nov [citado 21 feb 2011]; [3 pantallas]. Disponible en: URL: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB126/B126\\_16-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB126/B126_16-en.pdf).
- Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*. New York, Cambridge University Press.
- Yount, N. Y. and Yeaman, M. R. Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein Pept Lett*. 2005;12(1):49-67.
- Zampa, M. F., Araujo, I. M., Costa, V., Nery Costa, C. H., Santos, J. R., Jr., Zucolotto, V., et al. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomedicine*. 2009;5(3):352-358.
- Zapata Lesmes, A. C., Cardenas Castro, E. and Bello, F. Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) and their susceptibility



- to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Med Sci Monit.* 2005;11(12):BR457-464.
- Zawadzki, J., Scholz, C., Currie, G., Coombs, G. H. and McConville, M. J. The glycoinositolphospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties. *J Mol Biol.* 1998;282(2):287-299.