

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida de cuatro péptidos sintéticos derivados de la piel de anfibios del Ecuador

Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación

Johanna Carolina Molina Tabares

**Sonia Zapata, PhD.
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del título de Magíster en Microbiología

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida de cuatro péptidos sintéticos derivados de la piel de anfibios del Ecuador

Johanna Carolina Molina Tabares

Nombre del Director del Programa: Patricio Rojas
Título académico: M.D., Ph.D.
Director del programa de: Maestría en Microbiología

Nombre del Decano del colegio Académico: Carlos Valle
Título académico: Ph.D.
Decano del Colegio: COCIBA

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados: Hugo Burgos
Título académico: Ph.D.

Quito, diciembre 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Johanna Carolina Molina Tabares

Código de estudiante: 00209986

C.I.: 1721961330

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

DEDICATORIA

A las personas que tengo allá en el infinito: mi mami, mi abuelita Shuli y mi ñañita Fabi. A ustedes todo, porque lo que soy y he hecho ha sido gracias al esfuerzo, cuidado y amor que siempre me brindaron mientras estaban conmigo en la vida terrena.

En memoria de María Cecilia Tabares Silva.

Mami, te amo por siempre. Esto es por y para ti.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CEDIA por el financiamiento de este gran proyecto; a Carolina Proaño, Giovanna Morán y demás equipo de trabajo de IKIAM quienes lograron la obtención de los péptidos empleados en estos ensayos.

Gracias a Franklin Espinoza, Miryan Rivera, Ailín Blasco y Mateo Sánchez por toda la ayuda y guía recibidas a lo largo del desarrollo de este trabajo de titulación pues sin ellos no hubiera sido posible llevarlo a cabo.

De manera especial quiero agradecer a Patricio Rojas, Pato, gracias por darte el tiempo de enseñarme cultivo celular desde cero, por tenerme tanta paciencia y estar presto siempre que lo necesitaba, incluso en días festivos o fines de semana.

Un gracias infinito a todos mis profesores, compañeros y demás personal del Instituto de Microbiología de la USFQ de quienes aprendí muchísimo y con quienes compartí tantos momentos en estos últimos tres años.

Gracias a mi familia, a mis amigos y cariños (JP, Sarito, Edgar, Clau, Leo, Fer, Pao y Sebas). A todas esas personas que confiaron en mí, que fueron mi empuje y fortaleza para sobrellevar momentos duros y no caer ante la adversidad.

Asimismo, quiero agradecer a la USFQ por confiar en mí, por becarme todos estos 7 maravillosos años (tanto en pregrado como en posgrado); por brindarme la oportunidad de estudiar lo que me llena el alma, descubrir nuevas cosas y acrecentar mi pasión por los bichos.

Finalmente, me quiero agradecer a mí mismo, sin ser narcisista o ególatra. Caro, solo tú sabes cuánto esfuerzo, dedicación y tiempo te tomó llegar hasta aquí a pesar de estar quebrada emocionalmente. Te lo mereces. Disfrútalo.

RESUMEN

La leishmaniasis en el Ecuador es una enfermedad desatendida que afecta principalmente a las áreas rurales de las zonas tropicales y subtropicales de las tres regiones geográficas (hasta los 2500 msnm) debido a sus condiciones socioeconómicas precarias y a su composición geoambiental. Los tratamientos actuales para esta enfermedad no siempre son exitosos y tienen varias limitaciones, entre ellas, el abandono del mismo por su alto costo y los efectos secundarios debido a su alta toxicidad. Por este motivo, la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que reemplacen las empleadas hoy en día, es requerida. En este contexto, se evaluó *in vitro* la actividad antiparasitaria contra promastigotes de *Leishmania mexicana* y la actividad citotóxica contra la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 de cuatro versiones sintéticas de péptidos antimicrobianos derivados de las secreciones cutáneas de tres ranas de Ecuador (*Cruziohyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* y *Boana picturata*). La reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en formazán en placas de 96 pocillos mostró que los cuatro péptidos (cruzioseptina-1, cruzioseptina-4, dermaseptina SP-2 y pictuseptina-1) fueron capaces de matar las formas parasitarias extracelulares de *L. (L) mexicana* en una forma dosis-dependiente (IC_{50} = 0.543, 0.088, 0.609 y 0.100 μ M, respectivamente). Todos los péptidos empleados también tuvieron actividad citotóxica contra los macrófagos murinos RAW 264.7 (CC_{50} = 1.113, 3.633, 1.579 y 0.8753 μ M, respectivamente). Únicamente la cruzioseptina-4 demostró ser un buen agente leishmanicida y no altamente citotóxico con un índice de selectividad >10 (IS = 41.36), por lo que puede ser considerado a futuro como un candidato potencial para el tratamiento de leishmaniasis cutánea.

Palabras clave: Leishmaniasis, *Leishmania mexicana*, péptidos antimicrobianos, cruzioseptina, dermaseptina, pictuseptina, leishmanicida.

ABSTRACT

Leishmaniasis in Ecuador is a neglected tropical disease that mainly affects rural areas in the tropics and subtropics of the three geographic regions (up to 2,500 meters above sea level) due to their precarious socioeconomic conditions and geoenvironmental composition. Current treatments for this disease are not always successful and have several limitations, including the abandonment of it due to its high cost, and its side effects due to its high toxicity. For this reason, the searching for new therapeutic options to replace those used today is highly required. In this context, the antiparasitic activity against promastigotes of *Leishmania mexicana* and the cytotoxic activity against the murine macrophage cell line RAW 264.7 of four synthetic versions of antimicrobial peptides derived from the skin secretions of three frogs from Ecuador (*Cruzirohyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* and *Boana picturata*) were tested *in vitro*. Metabolic reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) into formazan in 96-well plates showed that all four peptides (cruzioseptin-1, cruzioseptin-4, dermaseptin SP-2 and pictuseptin-1) were capable to kill the extracellular parasitic forms of *L. (L) mexicana* in a dose-dependent manner (IC_{50} = 0.543, 0.088, 0.609 and 0.100 μ M, respectively). All the peptides had also cytotoxic activity against murine macrophages RAW 264.7 (CC_{50} = 1.113, 3.633, 1.579 and 0.8753 μ M, respectively). Only cruzioseptin-4 demonstrated to be a good leishmanicidal agent and not highly cytotoxic with a selectivity index >10 (SI = 41.36). This peptide may be considered in the future as a potential candidate for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Key words: Leishmaniasis, *Leishmania mexicana*, antimicrobial peptides, cruzioseptin, dermaseptin, pictuseptin, leishmanicidal.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Tabla de contenido	9
Índice de Tablas.....	10
Índice de Figuras	11
Introducción	12
Revisión de la literatura.....	15
Metodología y diseño de la investigación.....	15
Análisis de datos.....	29
Discusión y Conclusiones.....	30
Referencias	37
Tablas	41
Figuras	43
Índice de anexos.....	47
Anexos.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas, secuencias y origen de los cuatro péptidos antimicrobianos derivados de la secreción cutánea de ranas.	41
Tabla 2. Concentración inhibitoria del 50% (IC ₅₀), concentración citotóxica del 50% (CC ₅₀) e índice de selectividad (IS) de cada péptido.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de ensayo dosis-respuesta en placas de 96 pocillos para cada péptido antimicrobiano derivado de la secreción cutánea de ranas.	43
Figura 2. Actividad leishmanicida de los péptidos: Evaluación del efecto de la Cruzioseptina-1 (A), Cruzioseptina-4 (B), Dermaseptina SP-2 (C) y Pictuseptina-1 (D) sobre promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	44
Figura 3. Actividad citotóxica de los péptidos: Evaluación del efecto de la Cruzioseptina-1 (A), Cruzioseptina-4 (B), Dermaseptina SP-2 (C) y Pictuseptina-1 (D) sobre macrófagos RAW 264.7.....	45
Figura 4. Curva de dosis respuesta de cada uno de los péptidos (CZS-1, CZS-4, DRS-SP-2 y PIC-1) contra promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> (A) y macrófagos RAW 264.7 (B)...	46

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical parasitaria desatendida causada por protozoos flagelados del género *Leishmania* (Güran, 2018). Estos parásitos se transmiten por la picadura de hembras de flebotominos infectados; aunque rara vez ocurre por otros medios como transfusiones sanguíneas, compartimiento de agujas o por transmisión vertical (Alemayehu & Alemayehu, 2017). Esta enfermedad afecta principalmente a poblaciones socioeconómicamente desfavorecidas; y es endémica en áreas tropicales y subtropicales de todos los continentes con excepción de Oceanía y la Antártida (Güran, 2018). Existen tres formas principales: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) que comprometen la piel, las mucosas y las vísceras, respectivamente (Inceboz, 2019). En Ecuador se han reportado casos únicamente de la forma cutánea y mucocutánea en 22 de las 24 provincias del país; siendo Pichincha, Esmeraldas y Manabí las más prevalentes. Las principales especies causales de leishmaniasis en Ecuador son cuatro: *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, y *L. (L) mexicana*.

Dado que, hasta el momento no se dispone de una vacuna eficaz para prevenir la leishmaniasis, la quimioterapia con medicamentos de primera y segunda línea constituyen la única opción terapéutica para cualquiera de sus formas clínicas (Robles-Loaiza et al., 2021). Los medicamentos de primera línea se basan en antimoniales pentavalentes (Sb^{5+}) como Pentostam (estibogluconato de sodio) y Glucantime (antimoniato de meglumina). Mientras que, los medicamentos alternativos incluyen: anfotericina B, pentamidina, miltefosina y paromomicina (Oryan, 2015). A pesar de esta variedad medicinal, los tratamientos no siempre son exitosos y tienen varias limitaciones, entre ellas: el abandono de los pacientes debido a los regímenes de administración prolongados, su alto costo, administración parenteral (excepto miltefosina) realizado por personal médico calificado, y sus efectos secundarios asociados a la toxicidad. Todo esto sumado a la reciente aparición de cepas quimiorresistentes han conllevado

al fracaso terapéutico (R. Kumar et al., 2017; Nafari et al., 2020). En Ecuador, el tratamiento recomendado por el Ministerio de Salud Pública del país es el Glucantime administrado por vía intramuscular (10-15 mg/kg/día) hasta por 30 días.

Por tales razones, la búsqueda y el desarrollo de nuevas y mejores opciones terapéuticas se ha convertido en una prioridad (Marr et al., 2012). En los últimos años, varias nuevas moléculas de origen natural o sintético, incluso fármacos reutilizados que inicialmente no fueron desarrollados para tratar esta enfermedad parasitaria han exhibido actividad *in vitro* contra las diferentes especies y formas de *Leishmania* (Mendes et al., 2020). Entre esas moléculas con efecto leishmanicida se hallan 140 péptidos antimicrobianos (AMPs) derivados de distintas fuentes naturales, sobretodo, de anfibios (Robles-Loaiza et al., 2021). En general, la fuente más rica de estos AMPs de origen anfibio provienen de las secreciones cutáneas de ranas de la subfamilia Phyllomedusinae que representan casi el ~50% (n=24) de los 46 péptidos en total descritos (Brand et al., 2013; Robles-Loaiza et al., 2021).

En estudios preliminares se caracterizó el peptidoma de las secreciones cutáneas de tres especies de ranas: *Cruziohyala calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* (subfamilia: Phyllomedusinae), y *Boana picturata* (subfamilia: Hyalinae) donde se identificaron 94 péptidos de diferentes familias incluyendo dos nuevas. Las familias peptídicas más representativas fueron las dermaseptinas aisladas de *Agalychnis spurrelli*, y las recientemente descritas: cruzioseptinas y pictuseptinas derivadas de *Cruziohyala calcarifer* y *Boana picturata*, respectivamente. Las versiones semisintéticas de cinco de ellos (cruzioseptina-1 (CZS-1), 4 (CZS-4) y 16 (CZS-16); dermaseptina SP-2 (DRS-SP-2); y pictuseptina-1 (PIC-1)) tuvieron una potente actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Proaño-Bolaños, 2020; Proaño-Bolaños et al., 2016, 2019). Asimismo, hasta el momento se ha reportado la actividad antiparasitaria de CZS-1 contra *L. (V) braziliensis* y *L. (L) amazonensis* (Mendes et al., 2020) y de DRS-SP2 contra *Trypanosoma cruzi* (Salazar, 2021).

Por lo tanto, entender los efectos de estos péptidos sobre *Leishmania mexicana*, podría ayudar a encontrar nuevos enfoques de tratamiento de la leishmaniasis cutánea. En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad antiparasitaria contra promastigotes de *L. (L) mexicana* de cuatro péptidos antimicrobianos sintéticos (CZS-1, CZS-4, DRS-SP2 y PIC-1) y derivados de las secreciones cutáneas de tres ranas de Ecuador (*Cruziophyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* y *Boana picturata*) mediante ensayos de viabilidad por colorimetría de la reducción del MTT. El efecto de los péptidos sobre la viabilidad de los macrófagos murinos RAW 264.7 se evaluó adicionalmente como modelo de toxicidad para las células de mamíferos.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Leishmaniasis y formas clínicas

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida que afecta de forma endémica a cerca de 100 países a nivel mundial. No obstante, debido a varios factores como los conflictos civiles, los desastres ecológicos, el cambio climático, la globalización y la migración, esta enfermedad se ha expandido a áreas no endémicas (Steverding, 2017). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de 350 millones de personas a nivel mundial corren riesgo de infección. Un estimado de 700,000 a 1 millón de personas adquieren la enfermedad anualmente, y de estas, cerca de ~70,000 mueren (Organización Mundial de la Salud, 2021). Hoy en día, la leishmaniasis se constituye como la segunda enfermedad tropical parasitaria con mayor mortalidad después de la malaria (Torres-Guerrero et al., 2017).

Esta enfermedad es causada por parásitos del género *Leishmania* y transmitidos por la picadura de hembras de flebótomos infectadas (Inceboz, 2019). Hasta el momento, 98 especies de moscas de la arena han sido implicadas en la transmisión de la leishmaniasis: 42 especies del género *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y 56 del género *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) (Steverding, 2017). Generalmente, el flebótomo hembra adquiere el parásito cuando se alimenta de la sangre de alguno de sus hospedadores infectados (cánidos, roedores, marsupiales y humanos). Tras la laceración de la piel del mamífero, los macrófagos infectados se liberan en la herida y son absorbidos hacia el intestino medio del vector y los amastigotes se transforman en promastigotes (Alemayehu & Alemayehu, 2017). Los promastigotes se multiplican y migran hacia el intestino posterior o anterior (dependiendo del vector) y finalmente hacia la zona bucal. Así, cuando el vector infectado vuelve a alimentarse de sangre de un mamífero sano inocula promastigotes metacíclicos transmitiendo la enfermedad (Torres-Guerrero et al., 2017). Ya en el hospedador, los promastigotes son fagocitados por macrófagos u otros fagocitos y se transforman en amastigotes que viven y se multiplican en los fagolisosomas (fusión de vacuola

parasitófora y el lisosoma) (McGwire & Satoskar, 2014). Finalmente, estos amastigotes pueden diseminarse y provocar las diferentes manifestaciones clínicas (Alemayehu & Alemayehu, 2017; Güran, 2018).

Las tres formas clínicas de la leishmaniasis incluyen: Leishmaniasis cutánea (LC) que afecta la piel y es la forma más común; leishmaniasis mucocutánea (LMC) que ulcera las membranas mucosas (nasales y orales); y leishmaniasis visceral o kala-azar (LV) que afecta algunas vísceras (médula ósea, bazo e hígado) y es la forma más grave (Alemayehu & Alemayehu, 2017). Dentro de la LC existen otras manifestaciones adicionales como: leishmaniasis cutánea difusa (LDC) que afecta a la mayor parte de la piel, y leishmaniasis cutánea localizada (LCL) que cuando su sintomatología se vuelve recurrente se denomina leishmaniasis recidivante (LR). Otra forma es la LC post kala-azar que es una complicación presentada en los pacientes tratados de LV, incluso 20 años después como resultado de una inmunosupresión post-LV. Ocurre principalmente en el este de África y en la India (Güran, 2018; McGwire & Satoskar, 2014).

La LC aparece comúnmente en sitios corporales expuestos como la cara o las extremidades provocando lesiones en el sitio de inoculación que con el tiempo pueden ulcerarse. Cuando la úlcera se localiza en el pabellón auricular se conoce como “úlceras de chiclero” (Inceboz, 2019; Torres-Guerrero et al., 2017). Las lesiones de LC pueden ser unitarias o múltiples; y en muchos casos se resuelven por sí solas en menos de 2 años. Sin embargo, aquellos provocados por *L. (V) braziliensis*, *L. (L) amazonensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. (V) panamensis* tienen mayor riesgo de persistencia causando eventualmente LMC (Abadías-Granado et al., 2021). El tipo de lesiones LMC generalmente son desfigurativas y potencialmente mortales si no se tratan oportunamente (Inceboz, 2019). Finalmente, la LV es causada fundamentalmente por *L. (V) donovani* en adultos y *L. (L) infantum* o *L. (L) chagasi* en niños e inmunodeprimidos (McGwire & Satoskar, 2014).

Parásito

El parásito del género *Leishmania* pertenece a la familia Trypanosomatidae (orden Kinetoplastida) (Alemayehu & Alemayehu, 2017). Este protozoo se clasifica en dos subgéneros de acuerdo a su desarrollo en el intestino del vector: *Leishmania*, que se desarrollan en el intestino medio y anterior, y *Viannia*, en el intestino medio y posterior (Torres-Guerrero et al., 2017). Esta clasificación se debe a que existe alta especificidad entre el parásito y el vector. Asimismo, este parásito se clasifica en dos grupos principales: las especies del Viejo Mundo que se encuentran en Europa, Medio Oriente, África y Asia, y que se transmiten a humanos por flebótomos del género *Phlebotomus*; y las especies del nuevo mundo que se encuentran en Latinoamérica y que son transmitidas por flebotominos del género *Lutzomyia* (Abadías-Granado et al., 2021). Actualmente, existen 53 especies de *Leishmania*, de las cuales, 31 son parásitos de mamíferos y 20 sólo de humanos Anexo 1 (Inceboz, 2019).

Los diferentes cambios tanto morfológicos como bioquímicos de *Leishmania* durante su ciclo de vida permiten que éste infecte a su hospedador, evada su respuesta inmune, se replique y se disemine para establecer la infección. Para que todo esto ocurra el protozoo presenta varios factores de virulencia como: proteínas transportadoras y de shock térmico, proteasas (cisteín-, serin- o metalo-proteasas como la glicoproteína 63 o leishmanolisina (GP63)), fosfatasas ácidas (ACPs), nucleotidasas y la presencia de un glicocáliz denso compuesto de lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicanos (PPG) y glicoinositolfosfolípidos (GILP) (Elmahallawy & Alkhaldi, 2021; Forestier et al., 2014).

Leishmaniasis en el Ecuador

En el Ecuador, los primeros casos de leishmaniasis se describieron en los años 20's (Hashiguchi et al., 2017). Desde entonces, se ha reportado casos anuales autóctonos de esta enfermedad en sus formas LC y LMC en las tres regiones geográficas del país; por lo que, la leishmaniasis se considera endémica. Desde el 2001 hasta el momento, se ha registrado casos positivos nativos en 22 de las 24 provincias, con excepción del Carchi y Galápagos; siendo

Pichincha, Esmeraldas y Manabí las tres provincias con mayor número de casos reportados (Toalombo & Coque, 2020; Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2021). En el país aún no se ha descrito ningún caso de la forma visceral. De acuerdo con la gaceta vectorial de la semana epidemiológica (SE) 43 del 2021 del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), se han registrado en lo que va del año 1018 casos, de los cuales el 97.4% son de LC, y el 2.6% de LMC. Es relevante señalar que el número de casos puede no ser exacto debido a su subregistro ya que la enfermedad ocurre principalmente en áreas rurales donde el transporte y los sistemas médicos son precarios (Hashiguchi et al., 2017).

En Ecuador las especies causales de leishmaniasis son ocho: *L. (V) braziliensis*, *L.(V) guyanensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) lainsoni*, *L.(V) naiffi*, *L. (L) amazonensis*, *L.(L) major-like* y *L.(L)mexicana*. De estas, las tres primeras se distribuyen en las tres regiones geográficas del país; *L.(V) lainsoni* y *L.(V) naiffi* se encuentran sólo en el Oriente; *L. (L.) amazonensis* se ha descrito en Esmeraldas y Bolívar; mientras que, *L.(L)mexicana* y *L. (L.) major-like* circulan en áreas limitadas de Azuay y Chimborazo (Hashiguchi et al., 2018). Todas estas especies producen LC, y sólo *L.(V) braziliensis*, LMC. Estos parásitos son transmitidos en Ecuador por cuatro de las 73 especies de mantas blancas, como se conocen a los flebótomos popularmente: *Lutzomyia gomezi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. tortura* y *Lu. ayacuchensis*. Esta última, es la única especie que se distribuye en el altiplano andino ecuatoriano hasta los 2500 msnm y se ha implicado como vector de *L. (L) mexicana* (Hashiguchi et al., 2018).

En la mayoría de las provincias los brotes son de origen zoonótico donde se han reportado como reservorios mamíferos a: *Sciurus vulgaris granatensis* (ardilla), *Potos flavus* (cusumbo), *Tamandua tetradactyla* (oso hormiguero), *Choloepus hoffmani* (perezoso), *Rattus rattus* (rata) y *Canis familiaris* (perro). Sin embargo, para la región Andina baja de Azuay y Chimborazo, los niños menores de 5 años también se consideran como reservorios (Hashiguchi et al., 2017, 2018).

Para todos los casos, el tratamiento recomendado por el MSP es Glucantime administrado por vía intramuscular (10-15 mg/kg/día) hasta por 30 días (Calvopiña et al., 2020). A pesar de que teóricamente este medicamento es entregado de forma gratuita a los pacientes positivos en los centros de salud, en las áreas rurales donde la enfermedad es prevalente, a veces son escasos. De modo que los pacientes tienen que comprar el medicamento en farmacias privadas a costos elevados (5-7 USD/ampolla), lo que hace insostenible su continuación (Hashiguchi et al., 2017).

Tratamientos contra la leishmaniasis

Para todas las formas clínicas de la leishmaniasis el tratamiento estándar a nivel mundial es aquel basado en antimoniales pentavalentes como Pentostam y Glucantime durante 12 a 30 días. Asimismo, se pueden usar antimoniales trivalentes (Sb^{3+}) (Repodral o Anthiomalina) hasta por 20 días. Los antimoniales se administran por vía parenteral, ya sea intralesional (local) en el caso de LC o intravenosa (sistémico) para lesiones graves de LC, LMC y LV (McGwire & Satoskar, 2014; Oryan, 2015; Torres-Guerrero et al., 2017). Algunos de los efectos adversos de los antimoniales incluyen irritación y dolor en el sitio de inyección, fiebre, náusea, vómito, cefalea, dolor abdominal, mialgia, artralgia y alteraciones cardíacas (Torres-Guerrero et al., 2017). A pesar de su forma de administración y efectos adversos, los antimoniales forman parte del esquema principal de tratamiento de la leishmaniasis en la mayoría de países endémicos dado su bajo costo y su disponibilidad (Nash et al., 2021). A modo general, estos tratamientos antimoniales presentan resultados clínicos y microbiológicos exitosos; sin embargo, en la India y otras áreas endémicas se han reportado casos de fracaso terapéutico debido al apareamiento de cepas resistentes, lo cual ha condicionado su uso y ha hecho que se empleen otros fármacos (R. Kumar et al., 2017; Torres-Guerrero et al., 2017).

Si los casos de infección por cepas resistentes, y/o además las lesiones y formas de la enfermedad son más graves, las opciones terapéuticas de segunda línea que se usan son: la

pentamidina (administrada vía intramuscular), o a la anfotericina B ya sea liposomal o desoxicolato (administradas por vía endovenosa o por infusión intravenosa, respectivamente) en casos de LV y algunos de LC y LMC (Torres-Guerrero et al., 2017). Asimismo, se ha aprobado el uso de la paramomicina (vía tópica para las formas de LC, o parenteral intramuscular para LMC o LV), y la miltefosina (vía oral) para LV (más frecuentemente) y algunas LC, sobretodo, LC *post-kala-azar* en la India donde aún no hay resistencia para este fármaco (Nash et al., 2021). Aunque la mayoría de estas alternativas son eficaces incluso contra cepas parasitarias resistentes, también son altamente tóxicas, su duración es prolongada (alrededor de tres semanas de uso) y además son costosos; por lo que, el incumplimiento y abandono del tratamiento es frecuente (R. Kumar et al., 2017; Nash et al., 2021).

Para la pentamidina se han descrito efectos secundarios como mialgia, artralgia, dolor gastrointestinal, fatiga, cefalea, arritmias, hiperglucemia, nefro y hepatotoxicidad (Piccica et al., 2021). El desoxicolato de anfotericina B y la anfotericina B liposomal provoca fiebre, náuseas, dolor dorsal, vómitos, cefalea y nefrotoxicidad (insuficiencia renal) (Mosimann et al., 2018). La paramomicina, en cambio, incluye efectos como pancreatitis aguda, hemorragia peritoneal, alteración de la función hepática, cardio y nefrotoxicidad (Musa et al., 2012). La miltefosina, por su parte, es la que menos efectos adversos presenta debido a su forma de administración, entre estos se incluye: problemas gastrointestinales y fatiga, aunque puede también ser teratogénica y anticonceptiva incluso 4 meses post-tratamiento. Otra limitación de la miltefosina es su falta de disponibilidad local (Mosimann et al., 2018; Nash et al., 2021).

En la actualidad, para el tratamiento de lesiones graves de LC, LMC y LV, la combinación entre medicamentos ha sido mucho más exitosa que la administración de forma individual. En algunos casos la combinación de quimioterapias con termo o crioterapia, o el uso de láser ha resultado ser eficaz en el tratamiento de LC (Abadías-Granado et al., 2021). Hoy por hoy, los esfuerzos en la investigación están dirigidos a mejorar los sistemas de

administración con las quimioterapias existentes desarrollando formulaciones orales o tópicas ya que implican un mayor cumplimiento del paciente y menos efectos secundarios; y a buscar nuevas y mejores opciones terapéuticas (Berenguer et al., 2020; Marr et al., 2012; Nafari et al., 2020). Es importante recalcar, que el manejo de la leishmaniasis comprende acciones multidisciplinarias que no solo incluyen el uso de terapias para su tratamiento, sino que también implican el control vectorial y de reservorios, un mejor diagnóstico, y educación en las poblaciones más vulnerables (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Péptidos con actividad leishmanicida

Los péptidos leishmanicidas se categorizan de acuerdo a su origen: 1) péptidos antimicrobianos (AMPs) derivados de fuentes naturales como microorganismos, plantas, invertebrados, insectos, anfibios, mamíferos y organismos acuáticos; y 2) péptidos semisintéticos, aquellos derivados a partir de un AMP y que son modificados químicamente en el laboratorio con el fin de permitir la alteración de sitios diana, mejorar su estabilidad y evitar su proteólisis (Azmi et al., 2016; Huan et al., 2020; Robles-Loaiza et al., 2021).

Los AMPs son pequeñas moléculas naturales de entre 5-100 aminoácidos que se codifican genéticamente y se secretan en distintos tipos celulares para actuar como agentes protectores contra patógenos bacterianos, fúngicos, parasitarios y virales (Zhang et al., 2021). Estos péptidos son principalmente catiónicos (carga neta +1 a +9) aunque algunos también son aniónicos (carga neta de -1 a -8); son anfipáticos y tienen cerca del 50% de residuos hidrófobos (El-dirany et al., 2021; Huan et al., 2020). Los AMPs pueden ser α -helicoidales, de tipo lamina- β , o ambos, o de extensión lineal. Estas particularidades en conjunto, además de la composición lipídica de las membranas microbianas hace que estos péptidos actúen selectivamente sobre su diana específica ya sea de forma directa o indirecta modulando la respuesta inmune del hospedador. Dentro de las bioactividades de los AMPs se ha descrito efectos antiparasitarios

contra *Trichomonas vaginalis*, y diferentes especies de *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* (Huan et al., 2020; Vale et al., 2014).

Al momento, se han descrito más de 3500 AMPs derivados de distintos grupos taxonómicos: bacterias, arqueas, protozoos, hongos, plantas y animales. En eucariotas, los péptidos antimicrobianos están bien preservados y forman parte del sistema inmunitario innato; por lo que se excretan en las partes más vulnerables a posibles infecciones: las semillas, raíces, tallos y hojas en las plantas; en el hemolinfa de los insectos; y en las células mucosas, epiteliales o inmunitarias de otros eucariotas (El-dirany et al., 2021; Huan et al., 2020). La piel y las secreciones cutáneas de las ranas resultan ser una de las fuentes más ricas y diversas de un gran repertorio de péptidos únicos ya que varían por cada especie (Mangoni et al., 2005). Estos péptidos de anuros se subclasifican por sus secuencias de aminoácidos, características estructurales y bioactividades (Demori et al., 2019; Ladram & Nicolas, 2016). De las 41 familias de péptidos descritas en total para este grupo de vertebrados, siete, tienen actividad leishmanicida: bombininas, cruzioseptinas, dermaseptinas, filoseptinas, magaininas, temporinas y ocelatinas. (El-dirany et al., 2021; Mendes et al., 2020; Oliveira et al., 2016).

Otras familias péptidicas con actividad leishmanicida pero derivados de diferente fuente también se han descrito, entre ellas se hallan: la melitina y la jeleina derivada de *Apis mellifera* y su jalea real con efectos contra *L. (L). major*, *L. (V) panamensis*, *L. (L) donovani* e *L. (L) infantum*. Las cecropinas derivadas de *Hyalophora* y *Drosophila* efectivas contra *L. (L) aethiopica* y *L. (V) panamensis*. Las catelicidinas y defensinas derivadas de bovinos y efectivas contra *L. (L) donovani* y *L. (L) major* y *L. (L) amazonensis*. Las eumetinas contra *L. (L) major*; y las histatinas contra *L. (L) donovani*, y *L. (L) pifanoi*.

Se considera que la actividad leishmanicida de las diferentes familias AMPs se produce mayoritariamente mediante la disrupción de la membrana; en pocos casos el efecto ocurre por acción intraparasitaria como inducción de señales apoptóticas (melitinas y catelicidinas), daño

de vacuolas (BMAP28) y alteración mitocondrial (algunas cecropinas), y degradación del ADN con apoptosis tardía (melitinas, catelicidinas defensinas eumetinas e histatinas); mientras que otros sucede a través de la modulación de la respuesta inmunitaria dentro del hospedador para reclutar células inflamatorias en el sitio de infección (catelicidinas, cecropinas, defensinas y eumetinas) (El-dirany et al., 2021; Robles-Loaiza et al., 2021). La acción directa de los AMP sobre las membranas resulta de la unión e inserción de éstos sobre o dentro de las mismas deformándolas, o rompiéndola a través de poros o canales. Esto finalmente, afecta el potencial de membrana, colapsa el sistema energético del parásito y da como resultado su muerte (Marr et al., 2012). El uso de AMPs a pesar de que tiene varias ventajas, sobretodo, su bajo potencial de resistencia a causa de mutaciones en el sitio objetivo; presenta algunos desafíos como su no estabilidad estructural, su posible inactivación mediante sistemas proteolíticos y su biodisponibilidad para aplicaciones *in vivo* (Robles-Loaiza et al., 2021).

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo es parte del proyecto CEPRA XV-2021 “Actividad antiparasitaria de péptidos sintéticos derivados de la piel de anfibios contra malaria, Chagas y leishmaniasis”. Todos los tres ensayos independientes se realizaron por triplicado y se ejecutaron en el Laboratorio de Parasitología y de Cultivo Celular del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Péptidos Antimicrobianos

Los péptidos empleados en este estudio fueron sintetizados en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM. Estas biomoléculas representan las versiones semisintéticas aminadas en el extremo C-terminal de cuatro péptidos derivados de las secreciones cutáneas de tres ranas de Ecuador (*Cruziophyla calcarifer*, *Agalychnis spurrelli* y *Boana picturata*): cruzioseptina-1 y 4 (CZS-1 y 4), dermaseptina-SP-2 (DRS-SP-2) y pictuseptina-1 (PIC-1). Los péptidos se produjeron en fase sólida mediante la química Fmoc y purificaron (pureza > 95 %) como se menciona en (Mendes et al., 2020). Las características bioquímicas, secuencias y el origen de los péptidos se detallan en la **Tabla 1**. Las soluciones madre de los cuatro péptidos se prepararon a ~4 mM. Para las soluciones stock y las diluciones, los péptidos se diluyeron en dimetil sulfóxido (DMSO) de grado molecular (Sigma-Aldrich), y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Cultivo de promastigotes

La cepa de *Leishmania mexicana* empleada fue donada por la Universidad Cayetano Heredia del Perú. Los promastigotes de *L. (L) mexicana* se cultivaron de dos formas en función de su uso: **1)** Para el ensayo en placa, los parásitos se cultivaron en frascos de 25 cm² (Fisherbrand) con 10mL de medio monofásico, SDM 10. El SDM 10 se constituye por: Schneider’s Drosophila Medium (SDM) (SIGMA) + 10% de fetal bovine serum (FBS)

(GIBCO) + 1% de antibiótico 100X (mezcla de penicilina [10.000 UI] y estreptomicina [10.000 µg/ml]) (GIBCO). **2)** Para el mantenimiento del cultivo stock, se empleó tubos con medio bifásico USHMARU, constituido por agar sangre en pico de flauta + 3 ml de SDM 10.

Los promastigotes se cultivaron a 25 °C y su crecimiento se observó en el microscopio invertido (NIKON). A las 48 h, los parásitos extracelulares se centrifugaron a 2000 rpm (448 g) por 10 min (Thermo Scientific) y se lavaron con 10 mL de solución phosphate-buffered saline (PBS) 1X (BIO BASIC). Una vez realizado esto, se cambió el medio de cultivo a uno fresco. A las 96 h de cultivo, se realizó un segundo lavado y un nuevo pase. Para un pase de medio monofásico a bifásico, se colocó 50 µL de cultivo en un nuevo tubo con medio USHMARU. Para un pase de medio bifásico a monofásico, se colocaron 200 µL del cultivo en un nuevo frasco de 25 cm². Si se observaban rosetas, éstas se rompieron pasando el cultivo a través de jeringas de 10 mL con agujas 27G (NIPRO).

Cultivo de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue donada por el laboratorio del Dr. Ilya Raskin de la Universidad de Rutgers, Estados Unidos. Los macrófagos se cultivaron en frascos de 75 cm² (Fisherbrand) con 10 mL de medio DMEM 10 (Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) [alto en glucosa, con glutamina y rojo fenol] (LONZA) + 10% de FBS + 1% de antibiótico 100X (mezcla de penicilina [10,000 UI] y estreptomicina [10,000 µg/ml])). Las condiciones de cultivo fueron: 37 °C, 5 % CO₂ y 97 % de humedad relativa. El frasco se observó directamente en el microscopio invertido para corroborar el crecimiento celular. Las células se lavaron a las 48h con 10 mL de PBS 1X; posterior a lavado, se realizó el cambio de medio a uno fresco. Un nuevo pase se realizó cuando en el frasco había más de un 80% de confluencia, generalmente a las 96 h. Para esto, se lavó al cultivo por una segunda ocasión y se despegaron las células con raspadores celulares plásticos (scrapers) (BIOLOGIX). Para cada pase se suspendió 0.5mL de cultivo en 9.5mL de DMEM 10 fresco.

Contaje celular en la cámara de Neubauer (hemocitómetro)

Para saber el número de parásitos por mL obtenidos del cultivo en medio monofásico, se preparó una dilución 1:10 (160 μ L de PBS 1X + 20 μ L de cultivo de *L. (L) mexicana* + 20 μ L de formalina al 10%), este último reactivo se adicionó con el fin de inmovilizar a los parásitos.

*Después de 10 min de espera, se colocó 10 μ L de esta dilución en la cámara de Neubauer y se contó todos los promastigotes del cuadro central (A). Para el recuento de macrófagos RAW 264.7 vivos/muertos por mL obtenidos del cultivo, se preparó una dilución 1:1 (10 μ L de Trypan Blue al 0.4% (GIBCO) + 10 μ L de células) e inmediatamente se colocó 10 μ L en la cámara de Neubauer. Por último, se contabilizaron los macrófagos existentes en los cuatro cuadrantes laterales externos (L1-4). En ambos casos, el hemocitómetro se observó a 40X. Para el cálculo del recuento celular ver **Anexo 1. Especies de Leishmania que afectan a humanos.** (Fuente: Inceboz, 2019)*

Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killickia_a</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoia_a</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhamia_a</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis_b</i>	
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

^aSpecies status is under discussion.

^bTaxonomic position is under discussion.

Ensayos dosis-respuesta para evaluar actividad leishmanicida

La actividad leishmanicida *in vitro* de los cuatro péptidos se evaluó frente a la etapa de promastigotes de *L. (L) mexicana*. Los promastigotes derivados del cultivo monofásico en fase de crecimiento se suspendieron en SDM + 1% de antibiótico 100X sin FBS a una concentración de 5×10^6 parásitos/mL. En placas de 96 pocillos con fondo cónico (SARSTEDT) se sembraron por pocillo, 1×10^6 parásitos con 200 μ L de medio como volumen final. Enseguida, se probaron los diferentes tratamientos (**Figura 1**): células sin tratar (control de crecimiento); 1 μ M de anfotericina B (Sigma-Aldrich) diluida en DMSO (control positivo); DMSO al 0.25% (control negativo); y cada uno de los péptidos a una concentración final de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 μ M. Las placas se incubaron a 25 °C por 48 h.

Ensayos dosis-respuesta para evaluar citotoxicidad

La actividad citotóxica *in vitro* de los cuatro péptidos se evaluó en los macrófagos murinos RAW 264.7. Para esto, las células se suspendieron en DMEM + 1% de antibiótico 100X sin FBS a una concentración de 2.5×10^5 macrófagos/mL. En placas de 96 pocillos con fondo plano (BIO BASIC) se sembraron por pocillo, 5×10^4 macrófagos en 200 μ L de medio como volumen final. Las placas se incubaron por 30 min bajo las condiciones de cultivo de macrófagos descritas anteriormente para que las células se adhirieran al plato. Transcurrido este tiempo se añadieron a los pocillos los diferentes tratamientos (**Figura 1**): células sin tratar (control de crecimiento); saponina al 3% (Sigma-Aldrich) diluida en PBS 1X (control positivo); DMSO al 0.25% (control negativo), y cada uno de los péptidos a las mismas concentraciones finales a las que se sometieron los parásitos (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 μ M). Las placas se volvieron a incubar por otras 48 h en las mismas condiciones.

Ensayo colorimétrico con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

La viabilidad de *L. (L) mexicana* y macrófagos murinos RAW 264.7 se midió según la reducción de la sal de tetrazolio MTT. La actividad metabólica de las células vivas permite reducir el MTT (sustrato de color amarillo) en cristales de formazán (color violeta) mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Por lo tanto, la falta o no de actividad oxidativa mitocondrial de los parásitos y macrófagos detectada por este ensayo tras la exposición a los tratamientos, puede emplearse para calcular los IC₅₀ o CC₅₀ (Pinto et al., 2013).

Para este ensayo, se diluyó 10mg de MTT (Sigma-Aldrich) en 1mL de PBS 1X. Se agregó 20µL de esta dilución a cada una de los pocillos de las placas de parásitos y de macrófagos, y se las volvió a incubar por 2 h más en oscuridad bajo las respectivas condiciones de cultivo. Pasado este tiempo, las placas se centrifugaron a 4000rpm (1792 g) por 10 min y se retiró el sobrenadante. Los cristales de formazán de las placas de los parásitos y macrófagos se resuspendieron con 50 y 100 µL de DMSO, respectivamente. Las absorbancias (A₅₇₀₋₆₃₀) se leyeron en las instalaciones del CISEAL de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en un espectrofotómetro de placas (Biorad).

Análisis estadístico de datos

Los datos crudos se procesaron inicialmente en Microsoft Excel Versión 16.16.27 (201012) para calcular el porcentaje de viabilidad celular en base a las lecturas de las placas obtenidas en el espectrofotómetro. Posteriormente, los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism Versión 9.2.0 (283).

Para evaluar la significancia estadística de los resultados de cada tratamiento en los ensayos individuales para cada péptido (cada uno con nueve réplicas totales) los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar su normalidad o no, y así

conocer su distribución. De acuerdo con esta información, se corrieron test ANOVA de una vía para datos paramétricos, o su correspondiente no paramétrica (Kruskal-Wallis). Para ambos casos, se realizaron análisis post-hoc para comparaciones múltiples con respecto al control de crecimiento aplicando la prueba de Tukey o Dunn, respectivamente. Para todos los datos, la significancia se fijó un $p < 0.05$.

Adicionalmente, se determinaron los valores IC_{50} y CC_{50} de cada péptido usando una regresión no lineal con curva de ajuste [Modelo: log (inhibitor) vs. response (three parameters)]. Se estableció un intervalo de confianza del 95%. La IC_{50} (concentración inhibitoria) y el CC_{50} (concentración citotóxica) se definieron como la concentración de péptido que inhibió el 50% del crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* o de RAW 264.7, en comparación con el control de crecimiento respectivo. Finalmente, se determinó el índice de selectividad (IS) como se describe en (Pinto et al., 2013) dividiendo el valor de CC_{50} de macrófagos para el IC_{50} de parásitos.

ANÁLISIS DE DATOS

Actividad leishmanicida contra promastigotes

Luego de 48h de cultivo, los cuatro péptidos: CZS-1, CZS-4, DRS-SP-2 y PIC-1, en sus diferentes concentraciones (rango micromolar) inhibieron significativamente el crecimiento de promastigotes en comparación con el control de crecimiento. La respuesta parasitaria ante cada péptido fue dependiente de la dosis; es decir, hubo mayor efecto antiparasitario en dosis de concentraciones más altas (*Figura 2*). La actividad leishmanicida de la CZS-1 y 4 fue significativamente diferente al control en todas las concentraciones testeadas incluso en las dos más bajas de 0.1 y 0.5 μM . Por otro lado, la dermaseptina-SP2 y la pictuseptina-1 presentaron efecto significativo antipromastigotes a partir de 1 μM . Los valores de IC_{50} variaron entre 0.088 (CZS-4) y 0.609 (DRS-SP-2) (*Tabla 2, Figura 4A*).

Citotoxicidad contra macrófagos murinos RAW 264.7

Las cuatro biomoléculas redujeron la viabilidad celular de forma dosis-dependiente después de 48h de incubación con relación a las células no tratadas (*Figura 3*). El péptido más citotóxico en todas las concentraciones fue la Pictuseptina-1. Este péptido redujo a menos del 56% la viabilidad celular a 0.1 μM y a menos del 4% en la concentración más alta de 10 μM . De la misma forma, la CZS-1 y la DRS-SP2 presentaron bajas viabilidades a 0.5 y 0.1 μM (5-18%). La CZS-4, por su parte, no tuvo efecto significativo a 0.1 μM , mientras que a 5 y 10 μM la viabilidad se redujo al ~42 y 16%, respectivamente. Los valores de CC_{50} para estas células variaron de 0.875 μM (PIC-1) a 3.633 μM (CZS-4) (*Tabla 2, Figura 4B*).

Todos los valores de CC_{50} fueron mayores con respecto a los IC_{50} de los promastigotes. De acuerdo con el valor del índice de selectividad ($\text{IS} > 10$) se evidenció que la cruzioseptina-4 tuvo el valor más alto ($\text{IS} = 41.36$). Ninguno de los otros tres péptidos mostró efecto selectivo sobre las líneas celulares ($\text{IS} < 10$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La leishmaniasis cutánea es la forma más común de esta enfermedad, y aunque existen algunas opciones terapéuticas de primera y segunda línea, los tratamientos tienen una eficacia clínica limitada debido a los altos costos, vía de administración y sus efectos adversos graves. La falta de una vacuna como estrategia preventiva y la creciente resistencia parasitaria a la quimioterapia convencional, ha provocado que se investiguen nuevas moléculas con actividad leishmanicida (R. Kumar et al., 2017; Marr et al., 2012; Nafari et al., 2020). Dentro de estas moléculas, se hallan los péptidos antimicrobianos derivados de distintas fuentes naturales, los cuales han sido estudiados en varias publicaciones para evaluar su acción contra las dos formas de *Leishmania* (El-dirany et al., 2021; Robles-Loaiza et al., 2021). De los seis grupos de AMPs de acuerdo a su origen natural, aquel derivado de anfibios incluidas las secreciones de piel de rana, es el más descrito y comprende una gran cantidad de péptidos leishmanicidas (Mendes et al., 2020; Robles-Loaiza et al., 2021). Por tal razón, se investigó la actividad leishmanicida de cuatro péptidos aislados de secreciones cutáneas de tres especies de ranas contra promastigotes de *Leishmania mexicana*, agente causal de LC en América.

Los cuatro péptidos probados: cruzioseptinas-1 y 4, dermaseptina-SP2 y pictuseptina-1 tuvieron una actividad dosis dependiente contra promastigotes de *L. (L) mexicana* en un rango micromolar (**Figura 2**, **Figura 4A**) al igual que las dermaseptinas (S1-S5) o las temporinas (A, B, 1Sa, F y L), péptidos antimicrobianos de similar origen anfibio ensayados contra la misma especie y forma del parásito (Eggimann et al., 2015; Pérez-Cordero et al., 2011). Diferentes péptidos derivados de anfibios, sobretodo, de aquellos provenientes de la subfamilia Phyllomedusinae probados contra otras nueve especies de *Leishmania* tanto del subgénero *Viannia* como *Leishmania* también han tenido efectos antipromastigotes en concentraciones micromolares (André et al., 2020; Brand et al., 2013; Guerrero et al., 2004; Lozano et al., 2014; Mangoni et al., 2005; Pinto et al., 2013).

El rango de actividad de todos los péptidos reportados como leishmanicidas hasta el momento varia ampliamente desde valores 1.7×10^{-5} nM hasta $>100 \mu\text{M}$, y esta variación puede deberse no solo a las características fisicoquímicas de los péptidos sino a las variaciones estructurales de las diferentes especies de *Leishmania* (Eggimann et al., 2015; Robles-Loaiza et al., 2021). Particularmente, para los péptidos probados contra *L. (L) mexicana* se han descrito valores IC_{50} entre 3-5 μM con valores atípicos de 14 y 38 μM para las temporinas F y B, respectivamente; estos valores bajos, en general se deben a la composición estructural más simple de la membrana celular de esta especie de *Leishmania* (Eggimann et al., 2015; Pérez-Cordero et al., 2011).

En este trabajo se reporta por primera vez valores bajos de $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ (Tabla 2) para promastigotes de *Leishmania mexicana* expuestos ante péptidos antimicrobianos sintéticos derivados de secreciones cutáneas de ranas. Este hallazgo es similar al de Díaz-Achirica et al., 1998, donde describió valores de $\text{IC}_{50} < 1.5 \mu\text{M}$ para promastigotes de *L. (L) donovani* expuestos contra péptidos híbridos sintéticos de cecropina A y melitina, AMPs aislados de insectos como *Hyalophora*, *Drosophila*, y del veneno de *Apis mellifera*, respectivamente (El-dirany et al., 2021). Asimismo, se han descrito tres péptidos químicamente modificados muy efectivos contra promastigotes de *L. (L) donovani* y *L. (L) major* con valores de IC_{50} mínimos, incluso más bajos que el nuestro. Estos péptidos son: la indolicidina ($\text{IC}_{50} = 3.5 \times 10^{-5} \mu\text{M}$), el 27RP ($\text{IC}_{50} = 1.7 \times 10^{-8} \mu\text{M}$) y el RI-1018 ($\text{IC}_{50} = 0.6 \mu\text{M}$) derivados de AMPs de origen bovino como el plasma seminal o los gránulos de neutrófilos, respectivamente (Bera et al., 2003; Robles-Loaiza et al., 2021). Por otro lado, las filoseptinas-1, 4, 7 y 8 derivadas de *Phyllomedusa nordestina* también han exhibido valores similares de IC_{50} ($\text{IC}_{50} = 0.25-0.68 \mu\text{M}$) pero contra tripomastigotes de *T. cruzi*, otro parásito tripanosomátido, y agente causal de la enfermedad de Chagas (Pinto et al., 2013).

Las características bioquímicas distintivas de los AMPs como la cationicidad y la anfipaticidad están dadas por el alto contenido de aminoácidos catiónicos y alifáticos en sus estructuras primarias, y son precisamente estas propiedades las que hacen que estos pequeños péptidos sean efectivos contra las diferentes formas de *Leishmania* (Robles-Loaiza et al., 2021). Todos los péptidos aquí probados son catiónicos, anfipáticos y además son aminados en la región C-terminal (**Tabla 1**) (Proaño-Bolaños et al., 2016, 2019). Esta última característica mejora y facilita su función antimicrobiana; pues confiere a los péptidos mayor estabilidad cuando se encuentra en entornos lipídicos, transformando total o parcialmente las moléculas libres en una estructura α -helicoidal (Proaño-Bolaños et al., 2016; Zhang et al., 2021). Se sabe que para que los AMPs sean activos contra patógenos, éstos deben estabilizar sus conformaciones α -helicoidales cuando están en contacto con las bicapas lipídicas cargadas negativamente. Generalmente, dicha estabilización es reforzada en entornos altamente hidrofóbicos; de modo que los péptidos pueden agregarse a la membrana celular para luego desestabilizarla y finalmente matar al microorganismo (Lozano et al., 2014).

Estudios anteriores han demostrado que CZS-1, CZS-4 y DRSP-SP2 son altamente efectivos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con rangos MIC de 2.68-56.64 μM y mínimamente hemolíticos a esas mismas concentraciones (Proaño-Bolaños et al., 2016, 2019). Otros estudios indican que CZS-1 y DRS-SP2 tenían actividad inhibitoria contra las formas extra e intracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*. Cruzioseptina-1 resultó ser medianamente citotóxica contra macrófagos derivados de la médula ósea de ratón (BMDMs) (CC_{50} = 112.34 μM), y un buen agente leishmanicida contra *L. (V) braziliensis* y *L. (L) amazonensis* (EC_{50} = 9.17- 51.4 μM) (Mendes et al., 2020). Dermaseptina-SP2, en cambio, mostró ser efectivo contra tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* (IC_{50} = 1.26 y 5.85 μM , respectivamente) y no tan citotóxico contra células de riñón de mono (LLc-Mk2) (CC_{50} = 9.83 μM) (Salazar, 2021).

En todos estos casos, se comprobó que el mecanismo de acción tanto antibacteriano como antiprotozoario fue el de disrupción o ataque de membrana. Por lo tanto, se puede suponer que el mecanismo de acción de los cuatro péptidos probados sobre los promastigotes de *Leishmania mexicana* es similar. Cabe resaltar, que CZS-4 presenta la mejor actividad leishmanicida (**Tabla 2**) a pesar de que tiene baja cationicidad (+1) y mediana hidrofobicidad (0.53), por lo que el éxito de este péptido puede estar directamente relacionado con el mayor porcentaje de hélices- α (82.61%) que permite una mayor estabilidad estructural cuando interacciona con el parásito. La bioactividad por daño membranal ya se ha comprobado para promastigotes de *L.(L) mexicana* expuestos a temporinas (Eggimann et al., 2015). En dicho estudio se sugirió que los lipofosfoglicanos (LPG) y los proteofosfoglicanos (PPG) que componen el glicocálix de la membrana del promastigote juegan un rol importante para interaccionar con los AMPs, pues su carga negativa atrae a estos péptidos catiónicos. Después de esta primera interacción electrostática, los péptidos pueden provocar una destrucción o permeabilización de la membrana que termina con la lisis del parásito. Este mecanismo de ataque membranal en *Leishmania* se ha descrito también en las otras seis familias de péptidos derivados de anfibios como las: bombininas, cruzioseptinas, dermaseptinas, filoseptinas, magaininas y ocelatinas (El-dirany et al., 2021; Mendes et al., 2020; Oliveira et al., 2016).

Para corroborar que cualquier compuesto activo contra *Leishmania* es lo suficientemente seguro para las células del hospedador mamífero (Mendes et al., 2019); se determinó también la toxicidad de los péptidos contra la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Aquí, se obtuvo valores de CC_{50} entre 0.88-3.63 μ M (**Tabla 2, Figura 4B**). Resultados similares se describieron para la melitina que demostró ser eficaz en células LLcMK2 a una concentración de 1.756 μ M a las 48 horas de exposición peptídica (Salazar, 2021). Los valores de CC_{50} e IC_{50} obtenidos permitieron calcular índices de selectividad $IS = 2.05-41.36$ (**Tabla 2**). En base a esto y de acuerdo a la literatura, sólo CZS-4 al tener un $IS > 10$ resulta ser un

buen candidato como potencial terapéutico, ya que este péptido sintetizado tiene mayor actividad leishmanicida y una menor citotoxicidad (Mendes et al., 2020).

El hecho de que uno de los cuatro péptidos sea más efectivo que los otros, o que, en general exista variación de bioactividad entre sí, puede deberse a las divergencias entre las cargas netas, los perfiles de hidrofobicidad o los porcentaje de hélices- α de cada péptido (Mendes et al., 2020). Tales diferencias, también pueden repercutir en la afinidad de la molécula hacia diferentes tipos de membranas. Un ejemplo es la ocelatina-PT, derivada de secreciones cutáneas de la rana *Leptodactylus ocellatus*, que tiene mayor afinidad hacia las membranas de protozoos que hacia las de mamífero BMDM debido también a la diferencia del perfil lipídico de las membranas de ambas células. Esta hipótesis también se especuló en un estudio con taquiplesina (Tpl) donde se sugirió que este péptido podría tener receptores específicos para componentes membranales de promastigotes de *Leishmania* como LPG y ergosterol, compuestos diana esenciales para ejecutar su bioactividad, pero que no podría tener receptores para componentes de la superficie externa de la membrana celular de mamíferos como fosfatidilcolina, esfingomiélin y colesterol; pero, aún faltan estudios para corroborar este supuesto (V. Kumar & Chugh, 2021). Sin embargo, esta posibilidad no se puede descartar hasta el momento y puede que esto esté ocurriendo con la CZS-4 y la DRS-SP2 fueron los dos péptidos menos citotóxicos mantuvieron una buena actividad antiparasitaria.

Exclusivamente para la PIC-1, el único péptido proveniente de la subfamilia Hyliinae, se puede explicar que su fuerte efecto contra macrófagos RAW 264.7 y promastigotes de *L. mexicana* puede deberse a la presencia de un residuo de arginina (R) y cuatro de leucina (K) en su estructura primaria. Se conoce que, los residuos de R provocan mayores interacciones con la membrana celular que los residuos de K; pues la guanidina de su cadena lateral comparada con el amonio de la lisina facilita dichas interacciones (Robles-Loaiza et al., 2021). Un ejemplo es el péptido p-AclR7, rico en R, y modificado a partir del p-Acl derivado de la

toxina fosfolipasa A2 del veneno de serpiente *Agkistrodon contortrix*. Éste tuvo mayor efecto leishmanicida contra promastigotes de *L. (L) amazonensis* PH8 ($IC_{50} = 27.19 \mu M$) versus el péptido original no enriquecido ($IC_{50} = 50.98 \mu M$) (Mendes et al., 2019). Una desventaja de esta propiedad es que el péptido podría tener efectos citotóxicos no deseados. De hecho, esta característica es aprovechada mayormente en péptidos anticancerígenos. Adicionalmente, la presencia de residuos de leucina confiere a los AMPs características hidrofóbicas y también la capacidad de resistir a gradientes de sales y escisiones proteolíticas, sin embargo, varios péptidos ricos en este aminoácido han mostrado ser altamente tóxicos, limitando su aplicación clínica (Robles-Loaiza et al., 2021).

En conclusión, se reporta por primera vez la acción leishmanicida de la pictuseptina-1, un nuevo péptido antimicrobiano perteneciente a la nueva familia peptídica de las pictuseptinas derivadas de la secreción cutánea de *Boana picturata*. Todos los cuatro péptidos probados: CZS-1, CZS-4, DRS-SP2 y PIC-1 disminuyeron *in vitro* la viabilidad de los promastigotes de *Leishmania mexicana* de una forma dosis-dependiente. Aunque estas moléculas también presentaron actividad citotóxica contra los macrófagos murinos RAW 264.7, los parásitos fueron más sensibles. El porcentaje de hélices alfa de los péptidos parece contribuir de manera importante en su acción leishmanicida, ya que está relacionada con su estabilidad estructural y los posteriores efectos de disrupción de membrana; pero aún falta corroborar el mecanismo de acción de los péptidos para confirmar este hallazgo.

Los resultados aquí mostrados indican que los péptidos probados, principalmente CZS-4, merecen una mayor investigación, más aún, porque se sabe que estos compuestos bioactivos tienen baja probabilidad de generar cepas resistentes, lo que los hace interesantes para el desarrollo farmacológico en la era “post-antibióticos” (Robles-Loaiza et al., 2021). La búsqueda y el hallazgo de moléculas con nuevos enfoques terapéuticos como son estos péptidos

sintéticos derivados AMPs de origen natural pueden ser candidatos potenciales para tratamientos contra enfermedades tropicales como la leishmaniasis cutánea.

Una limitación del estudio fue que no pudieron llevarse a cabo los ensayos con amastigotes que es la forma clínicamente importante que afecta humanos dada su condición intracelular ya que aún no se han estandarizado los protocolos de cultivo en el laboratorio. Se recomienda a futuro probar los péptidos contra esta forma parasitaria. Además, se puede incrementar el rango de concentraciones con valores menores a las ensayadas para interpolar con un mejor ajuste el IC_{50} de la CZS-4 que es el único péptido que tuvo un valor IC_{50} por fuera del rango de concentraciones ensayado ($< 0.1 \mu M$).

Finalmente, como se presume un posible daño membranal como mecanismo de acción de los péptidos, se ejecutarán a corto plazo ensayos de microscopía ya sea electrónica o de fluorescencia para corroborar esta hipótesis. Para la ejecución de estos puntos en particular, la mayor limitante fue la cantidad disponible de péptidos (una única alícuota de 5mg por cada péptido). Es por esto que una alternativa a usarse también pueden ser ensayos *in silico* como docking molecular.

REFERENCIAS

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, *112*(7), 601–618. <https://doi.org/10.1016/J.AD.2021.02.008>
- Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, *11*(4), 519. <https://doi.org/10.21767/1791-809X.1000519>
- André, S., Raja, Z., Humblot, V., Piesse, C., Foulon, T., Sereno, D., Oury, B., & Ladram, A. (2020). Functional characterization of temporin-she, a new broad-spectrum antibacterial and leishmanicidal temporin-sh paralog from the sahara frog (*Pelophylax saharicus*). *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21186713>
- Azmi, F., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2016). Towards the Development of Synthetic Antibiotics: Designs Inspired by Natural Antimicrobial Peptides. *Current Medicinal Chemistry*, *23*(41), 4610–4624. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160825162435>
- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., & Vaidya, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *127*(1), 23–35. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00300-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00300-6)
- Berenguer, D., Alcover, M. M., Sessa, M., Halbaut, L., Guillén, C., Boix-montañés, A., Fisa, R., Calpena-campmany, A. C., Riera, C., & Sosa, L. (2020). Topical amphotericin B semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: Physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. *Pharmaceutics*, *12*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020149>
- Brand, G. D., Santos, R. C., Arake, L. M., Silva, V. G., Veras, L. M. C., Costa, V., Costa, C. H. N., Kuckelhaus, S. S., Alexandre, J. G., Feio, M. J., & Leite, J. R. S. A. (2013). The Skin Secretion of the Amphibian *Phyllomedusa nordestina*: A Source of Antimicrobial and Antiprotozoal Peptides. *Molecules* *2013*, Vol. 18, Pages 7058-7070, *18*(6), 7058–7070. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES18067058>
- Calvopiña, M., Bohorquez, P., Villacís, P., & Encalada, M. (2020). *Vista de Leishmaniasis Cutánea “Úlcera de Chiclero” en la Amazonia, Ecuador | Práctica Familiar Rural*. <https://doi.org/https://doi.org/10.23936/pfr.v5i2.153>
- Demori, I., Rashed, Z. El, Corradino, V., Catalano, A., Rovegno, L., Queirolo, L., Salvidio, S., Biggi, E., Zanotti-Russo, M., Canesi, L., Catenazzi, A., & Grasselli, E. (2019). Peptides for skin protection and healing in amphibians. *Molecules*, *24*(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020347>
- Eggimann, G. A., Sweeney, K., Bolt, H. L., Rozatian, N., Cobb, S. L., & Denny, P. W. (2015). The role of phosphoglycans in the susceptibility of *Leishmania mexicana* to the temporin family of anti-microbial peptides. *Molecules*, *20*(2), 2775–2785. <https://doi.org/10.3390/molecules20022775>
- El-dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-sater, F., & Gonzalez-gaitano, G. (2021). *Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against Leishmania and Other Parasites: An Overview*. 1–18.
- Elmahallawy, E. K., & Alkhaldi, A. A. M. (2021). Insights into leishmania molecules and their potential contribution to the virulence of the parasite. *Veterinary Sciences*, *8*(2), 1–

21. <https://doi.org/10.3390/vetsci8020033>
- Forestier, C. L., Gao, Q., & Boons, G. J. (2014). Leishmania lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*, 193. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2014.00193/BIBTEX>
- Fumarola, L., Spinelli, R., & Brandonisio, O. (2004). In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. *Research in Microbiology*, *155*(4), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.001>
- Guerrero, E., Saugar, J. M., Matsuzaki, K., & Rivas, L. (2004). Role of Positional Hydrophobicity in the Leishmanicidal Activity of Magainin 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(8), 2980–2986. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2980-2986.2004>
- Güran, M. (2018). An Overview of Leishmaniasis: Historic to Future Perspectives. *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81643>
- Hashiguchi, Y., Gomez, E. A. L., Cáceres, A. G., Velez, L. N., Villegas, N. V., Hashiguchi, K., Mimori, T., Uezato, H., & Kato, H. (2018). Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the causative Leishmania parasites and clinico-epidemiological features. *Acta Tropica*, *177*(September 2017), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.028>
- Hashiguchi, Y., Velez, L. N., Villegas, N. V., Mimori, T., Gomez, E. A. L., & Kato, H. (2017). Leishmaniasis in Ecuador: Comprehensive review and current status. *Acta Tropica*, *166*, 299–315. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2016.11.039>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, *0*, 2559. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.582779>
- Inceboz, T. (2019). Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. *Current Topics in Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.86359>
- Kumar, R., Chauhan, S. B., Ng, S. S., Sundar, S., & Engwerda, C. R. (2017). Immune checkpoint targets for host-directed therapy to prevent and treat leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, *8*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01492>
- Kumar, V., & Chugh, A. (2021). Peptide-mediated leishmaniasis management strategy: Tachyplesin emerges as an effective anti-leishmanial peptide against Leishmania donovani. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1863*(8), 183629. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183629>
- Ladram, A., & Nicolas, P. (2016). Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, *21*(7), 1341–1371. <https://doi.org/10.2741/4461>
- Lozano, J. M., Cuadrado, B. S., Delgado, G., & Patarroyo, M. E. (2014). Cationic Peptides Harboring Antibiotic Capacity are Selective for Leishmania panamensis and Leishmania major. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, *6*(2), 54–62. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000122>
- Mangoni, M. L., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M., & Rivas, L. (2005). Temporins, Small Antimicrobial Peptides with Leishmanicidal Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(2), 984–990. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410795200>
- Marr, A. K., McGwire, B. S., & McMaster, W. R. (2012). Modes of action of Leishmanicidal

- antimicrobial peptides. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.12.85*, 7(9), 1047–1059.
<https://doi.org/10.2217/FMB.12.85>
- Mcgwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Qjm*, 107(1), 7–14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Mendes, B., Almeida, J. R., Vale, N., Gomes, P., Gadelha, F. R., Da Silva, S. L., & Miguel, D. C. (2019). Potential use of 13-mer peptides based on phospholipase and oligoarginine as leishmanicidal agents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 226, 108612. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2019.108612>
- Mendes, B., Proaño-Bolaños, C., Gadelha, F. R., Almeida, J. R., & Miguel, D. C. (2020). Cruzioseptins, antibacterial peptides from *Cruziophyla calcarifer* skin, as promising leishmanicidal agents. *Pathogens and Disease*, 78(6), 1–8.
<https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTAA053>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador, M. (2021). *Gaceta Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Vectores SE 43*.
- Mosimann, V., Neumayr, A., Paris, D. H., & Blum, J. (2018). Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. *Acta Tropica*, 182, 246–250. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2018.03.016>
- Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A. A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroge, S., Manduku, V., Mutuma, G., ... Wasunna, M. (2012). Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1674. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001674>
- Nafari, A., Cheraghypour, K., Sepahvand, M., Shahrokhi, G., Gabal, E., & Mahmoudvand, H. (2020). Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00156. <https://doi.org/10.1016/J.PAREPI.2020.E00156>
- Nash, T. E., Ware, J. M., O'connell, E. M., Brown, T., Wetzler, L., Talaat, K. R., Nutman, T. B., & Nash, T. E. (2021). Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), e2457–e2562.
<https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1238>
- Oliveira, M., Gomes-Alves, A. G., Sousa, C., Mirta Marani, M., Plácido, A., Vale, N., Delerue-Matos, C., Gameiro, P., Kückelhaus, S. A. S., Tomas, A. M., José, J. R., & Eaton, P. (2016). Ocellatin-PT antimicrobial peptides: High-resolution microscopy studies in antileishmania models and interactions with mimetic membrane systems. *Biopolymers*, May, 873–886. <https://doi.org/10.1002/bip.22925>
- Organización Mundial de la Salud. (2021, May 20). *Leishmaniasis*.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Oryan. (2015). *Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis*. 16(1), 1–19.
- Pérez-Cordero, J. J., Lozano, J. M., Cortés, J., & Delgado, G. (2011). Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides*, 32(4), 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.011>
- Piccica, M., Lagi, F., Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2021). Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. *Journal of Travel Medicine*, 28(6). <https://doi.org/10.1093/JTM/TAAB065>

- Pinto, E. G., Pimenta, D. C., Antoniazzi, M. M., Jared, C., & Tempone, A. G. (2013). Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 135(4), 655–660. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2013.09.016>
- Proaño-Bolaños, C. (2020). *Un gran laboratorio farmacéutico llamado Biodiversidad*:
- Proaño-Bolaños, C., Blasco-Zúñiga, A., Almeida, J. R., Wang, L., Llumiquinga, M. A., Rivera, M., Zhou, M., Chen, T., & Shaw, C. (2019). Unravelling the Skin Secretion Peptides of the Gliding Leaf Frog, *Agalychnis spurrelli* (Hylidae). *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 667, 9(11), 667. <https://doi.org/10.3390/BIOM9110667>
- Proaño-Bolaños, C., Zhou, M., Wang, L., Coloma, L. A., Chen, T., & Shaw, C. (2016). Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyala calcarifer*. *Journal of Proteomics*, 146, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.017>
- Robles-Loaiza, A. A., Pinos-Tamayo, E. A., Mendes, B., Teixeira, C., Alves, C., Gomes, P., & Almeida, J. R. (2021). Peptides to tackle leishmaniasis: Current status and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094400>
- Salazar, M. (2021). Trypanocidal activity of dermaseptins isolated from *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) skin secretion. *Repositorio -Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo*.
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2017 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2028-5>
- Toalombo, C. J., & Coque, M. (2020). MEDICIENCIAS UTA Revista Universitaria con proyección científica, académica y social REVISTA UNIVERSITARIA, CON PROYECCIÓN CIENTÍFICA, ACADÉMICA Y SOCIAL CARRERA MEDICINA-UTA. *Revista Universitaria MEDICIENCIAS*, 4(1), 21–27. <https://medicienciasuta.uta.edu.ec/index.php/MedicienciasUTA>
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.11120.1>
- Vale, N., Aguiar, L., & Gomes, P. (2014). Antimicrobial peptides: A new class of antimalarial drugs? *Frontiers in Pharmacology*, 5(DEC), 275. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00275/BIBTEX>
- Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research* 2021 8:1, 8(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S40779-021-00343-2>

TABLAS

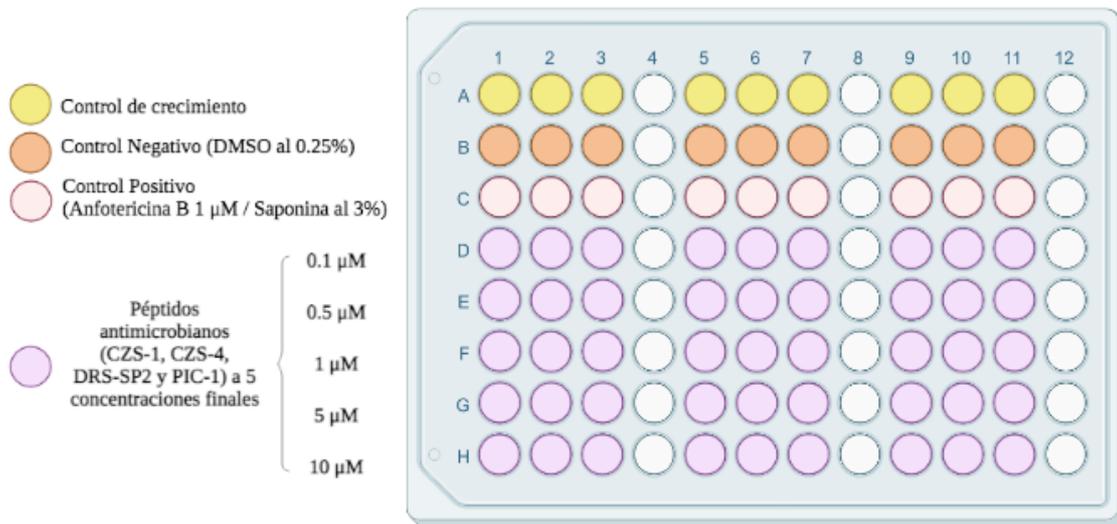
Tabla 1. Características bioquímicas, secuencias y origen de los cuatro péptidos antimicrobianos derivados de la secreción cutánea de ranas. (Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM).

Péptido	Origen	Longitud	Secuencia	Carga neta (z)	Masa Molecular teórica (Da)	Hidrofobicidad <H>	Alfa hélice %
Cruzioseptina-1 (CZS-1)	<i>Cruziophyla calcarifer</i>	21 aa	GFLDIVKGVGK VALGAVSKLF-NH2	+3	2117,26	0.581	47.62
Cruzioseptina-4 (CZS-4)			23 aa				
Desrmaseptina-SP2 (DRS-SP2)	<i>Agalychnis spurrelli</i>	28 aa	ASWKVFLKNIG KAAGKAVLNS VTDMVNQ-NH2	+4	2988,62	0.358	78.57
Pictuseptina-1 (PIC-1)	<i>Boana picturata</i>	22 aa	GFLDTLKNIGK TVGRIALNVLT -NH2	+3	2342,37	0.489	68.18

Tabla 2. Concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀ en μM), concentración citotóxica del 50% (CC₅₀ en μM) e índice de selectividad (IS) de cada péptido.

Péptido	RAW 264.7			<i>L. (L) mexicana</i>			IS
	CC ₅₀	IC	R ²	IC ₅₀	IC	R ²	
Cruzioseptina-1 (CZS-1)	1.113	(0.812-1.547)	0.94	0.543	(0.433-0.681)	0.96	2.049
Cruzioseptina-4 (CZS-4)	3.633	(2.508-5.666)	0.96	0.088	(0.039-0.245)	0.80	41.28
Desrmaseptina-SP2 (DRS-SP2)	1.579	(1.227-2.074)	0.97	0.609	(0.375-0.981)	0.90	2.59
Pictuseptina-1 (PIC-1)	0.875	(0.509-1.490)	0.89	0.101	(0.072-0.142)	0.94	8.66

FIGURAS



(Elaboración propia, BioRender.com)

Figura 1. Esquema de ensayo dosis-respuesta en placas de 96 pocillos para cada péptido antimicrobiano derivado de la secreción cutánea de ranas.

Para cada péptido se realizó una placa de promastigotes de *Leishmania mexicana* (para ensayo de actividad leishmanicida) y una de macrófagos murinos RAW 264.7 (para ensayo de citotoxicidad). Cada ensayo contiene nueve réplicas.

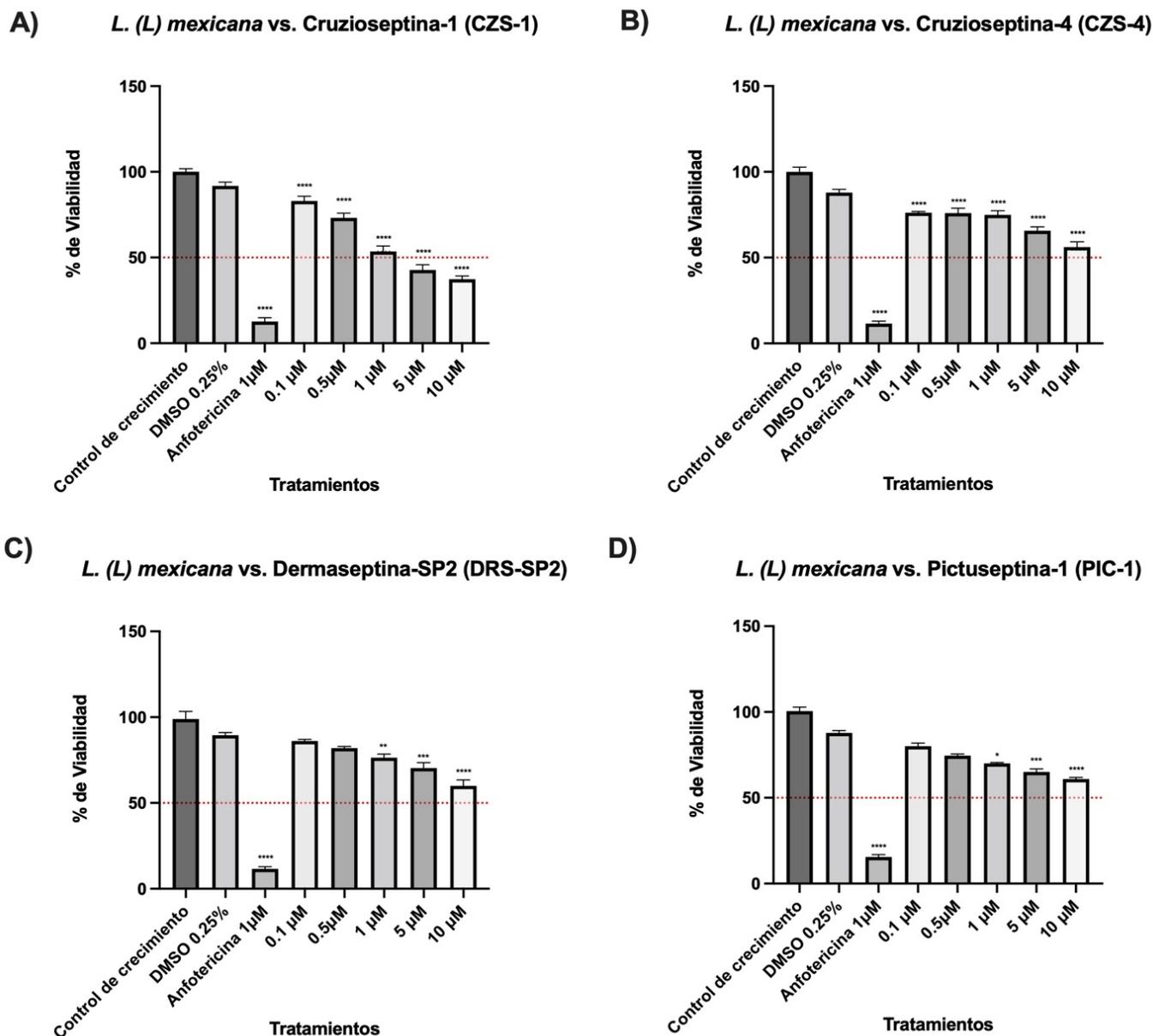


Figura 2. Actividad leishmanicida de péptidos sintéticos procedentes de la piel de anfibios sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. Cruzioseptina-1 (A), cruzioseptina-4 (B), dermaseptina SP-2 (C) y pictuseptina-1 (D).

Se observó una disminución significativa de los parásitos extracelulares tratados con diferentes concentraciones de péptidos. Para la cruzioseptina-1 y la cruzioseptina-4, los datos se expresan como la media \pm DE obtenidos del test ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Para la dermaseptina-2 y la pictuseptina-1 se muestra la mediana con el 95% de IC obtenidos a partir de la prueba de Kruskal-Wallis más la post hoc de Dunn ($p < 0.05$). La línea roja entrecortada señala el 50% de viabilidad. Clasificación del valor p: 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

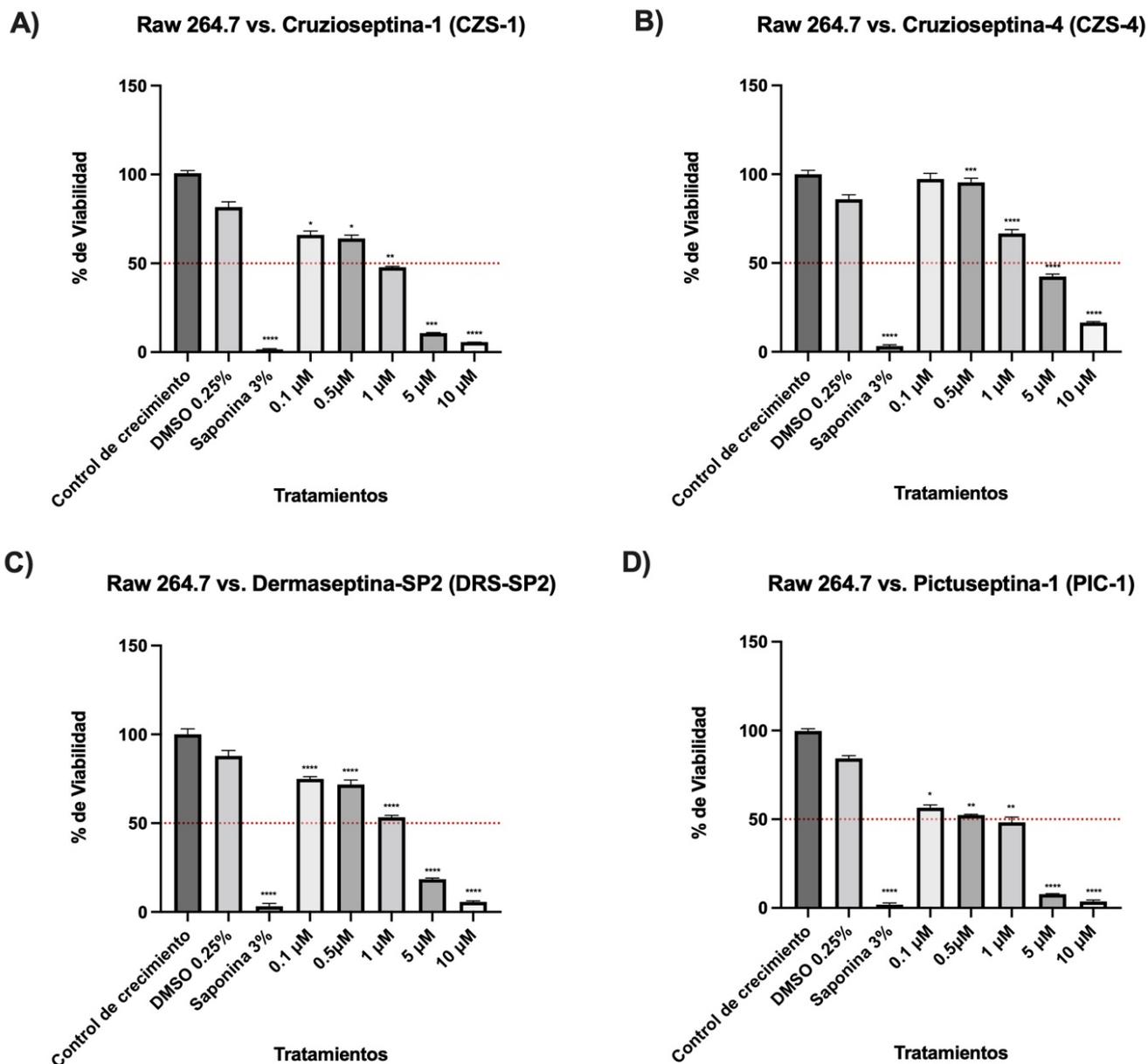
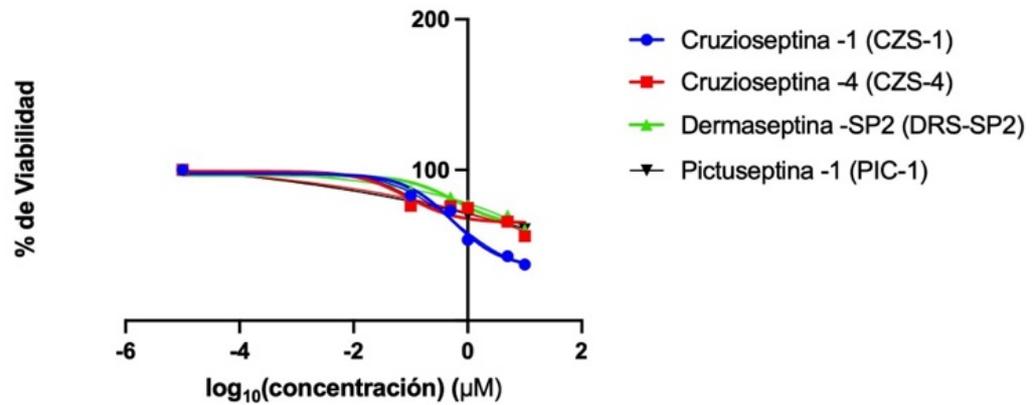


Figura 3. Actividad leishmanicida de péptidos sintéticos procedentes de la piel de anfibios sobre sobre macrófagos RAW 264.7. Cruzioseptina-1 (A), cruzioseptina-4 (B), dermaseptina SP-2 (C) y pictuseptina-1 (D).

Se observó una disminución significativa de las células tratadas con diferentes concentraciones de péptidos. Para la cruzioseptina-4 y la dermaseptina-2, los datos se expresaron como la media \pm DE obtenidos del test ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Para cruzioseptina-1 y la pictuseptina-1 se muestra la mediana con el 95% de IC obtenidos a partir de la prueba de Kruskal-Wallis más la post hoc de Dunn ($p < 0.05$). La línea roja entrecortada señala el 50% de viabilidad. Clasificación del valor p: 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****).

A)

***L. (L) mexicana* vs. Péptidos Antimicrobianos de secreción cutánea de ranas**



B)

Raw 264-7 vs. Péptidos Antimicrobianos de secreción cutánea de ranas

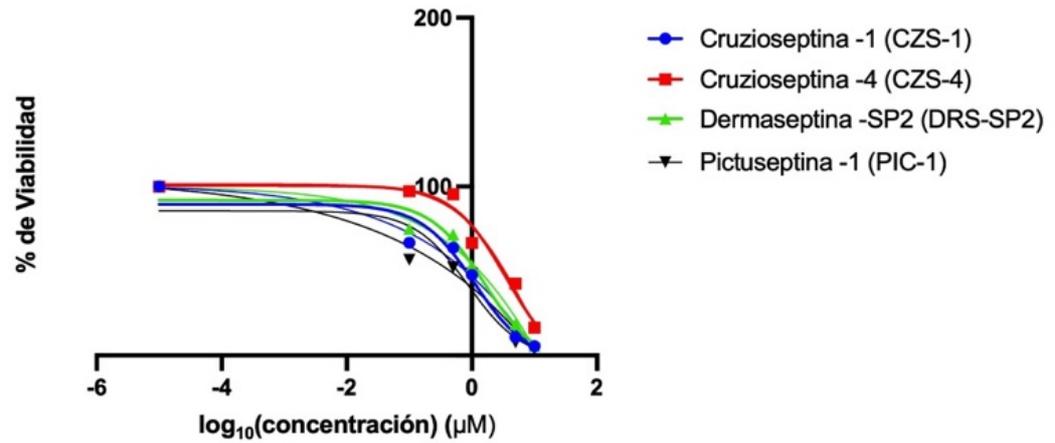


Figura 4. Curva de dosis respuesta de cada uno de los péptidos (CZS-1, CZS-4, DRS-SP-2 y PIC-1) contra promastigotes de *Leishmania mexicana* (A) y macrófagos RAW 264.7 (B).

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Especies de <i>Leishmania</i> que afectan a humanos. (Fuente: Inceboz, 2019)	48
Anexo 2. Cámara de Neubauer (hemocitómetro) y cálculo del recuento celular de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> (A) y de macrófagos murinos RAW 264.7 (B).....	49

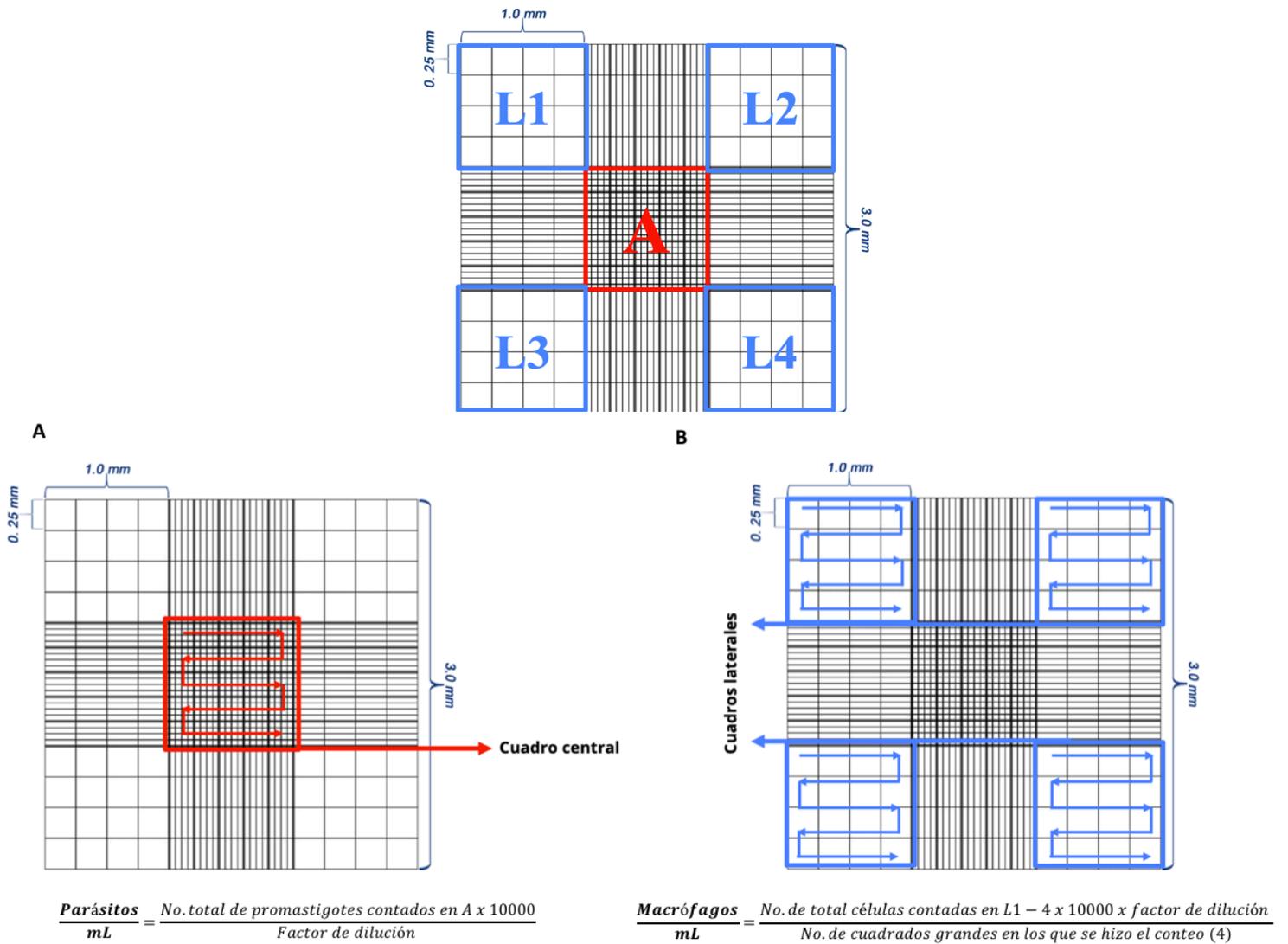
ANEXOS

Anexo 1. Especies de *Leishmania* que afectan a humanos. (Fuente: Inceboz, 2019)

Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killickia_a</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi_a</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhamia_a</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis_b</i>	
	Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic

^aSpecies status is under discussion.^bTaxonomic position is under discussion.

Anexo 2. Cámara de Neubauer (hemocitómetro) y cálculo del recuento celular de promastigotes de *Leishmania mexicana* (A) y de macrófagos murinos RAW 264.7 (B).



(Adaptado de blogceta.zaragoza.unam.mx)