

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 8 2 6 4 1 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA A-MELITINA CON

ACCIÓN LEISHMANICIDA

Estudio de CA(1-8)M(1-18)

Pilar Díaz Achirica

1997

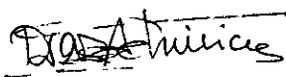
TESIS DOCTORAL

PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA A-MELITINA CON ACCIÓN

LEISHMANICIDA

Estudio de CA(1-8)M(1-18)

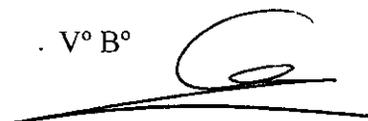
Memoria presentada por PILAR DÍAZ ACHIRICA para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas



Pilar Díaz Achirica

Dr. LUIS IGNACIO RIVAS LÓPEZ, Doctor en Ciencias Químicas y Colaborador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CERTIFICA que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada por la Licenciada Pilar Díaz Achirica en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C., Madrid), bajo mi dirección.

Vº Bº



Dr. Luis Rivas López

**A mis padres y hermano.
A mi familia, á mi clan
(a ellos y a vosotros).**

AGRADECIMIENTOS

Hay mucha gente que a lo largo de la realización de esta tesis me ha dado su apoyo, ayuda, consejos y amistad; ha sido mucho tiempo y si me olvido de alguien le pido perdón, siempre estaréis en mis recuerdos.

Esta tesis no hubiese sido posible si Luis, mi director, no me hubiera dejado trabajar en su laboratorio, que más que un jefe ha sido un amigo; enseñándonos no sólo ciencia sino CULTURA y algo muy importante, a usar la cabeza (y si no lo ha conseguido ha sido, por supuesto, por torpeza mía). Sabes que te debo muchas cosas y que te estaré siempre agradecida. De todo corazón GRACIAS.

Carmen (“chicharrillo”) y Quique (“fontes”) que os puedo decir; en vosotros tengo dos AMIGOS. Gracias por dejarme compartir parte de vuestra vida, gracias por soportarme, gracias por estar a mi lado, gracias por mil ayudas, gracias por TODO. Por cierto, ¿cuándo vamos al cine?

He tenido la suerte de tener unos grandes vecinos: los “bioenergéticos” del Dr. Rial. A Susana, Iñaki, Mar, Pilar y Eduardo les agradezco toda su ayuda en mi iniciación en el “apasionante mundo de la mitocondria”. Y si necesitas elevar tus niveles de glucosa o de moral recurre a “Pilara”.

Hay una serie de gente a la cual tarde o temprano, todos los que estamos en el CIB recurrimos, gente de cuyo trabajo depende el nuestro, y esa son las gentes de los Servicios del CIB: Cultivo de células animales (Blanca siempre dispuesta a escucharte, siempre dispuesta a ayudarte), Esterilización (Rosa siempre animosa, siempre animando), Animalario (Diego y Manolo), Biblioteca (Esperanza y M^a Antonia), Microscopía Electrónica (Lola), Fotografía (antes Pepe, ahora Vicky y Monika), Citofluorimetría (Pedro, ¿cuando nos tomamos unas cervezas para seguir hablando?), Química de proteínas (Javier), Radiactividad (Marta), Delineación (Aurelio) e Instrumentación (Antonio cuando necesites un peso para escorar la nave, ya sabes...). A todos vosotros y a todos los que están con vosotros, muchísimas gracias.

Gracias al Dr. David Andreu y al Dr. Josep Ubach por los péptidos, a la Dra. Almudena Guinea Díaz por su ayuda con las muestras de microscopía electrónica, al Dr. Salvatore Turco por cedernos la cepa mutante R2D2, el LPG y el PG, al Dr. Francisco Gamarro por su cepa resistente a fármacos, al Dr. Luis Miguel Ruíz Pérez por el vector, al Dr. Jorge Alvar por cedernos los ratones infectados, al Dr. Ricardo Molina por su trabajo con los flebotomos, al Dr. Sebastián Cerdán por su colaboración en la resonancia magnética nuclear.

En fin, a todos aquellos que me han ayudado, soportado y confortado durante este periodo millones de **GRACIAS**.

ÍNDICE

	Págs.
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	9
<i>1.1. BIOLOGÍA DE LEISHMANIA</i>	11
1.1.1. TAXONOMÍA	12
1.1.2. CARACTERÍSTICAS DE <i>LEISHMANIA</i>	13
1.1.3. CICLO VITAL DE <i>LEISHMANIA</i>	14
1.1.4. CAMBIOS INTERESTADIO	15
<i>1.2. MEMBRANA PLASMÁTICA DE LEISHMANIA</i>	15
1.2.1. COMPONENTES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	18
1.2.1.1. COMPOSICIÓN LIPÍDICA	18
1.2.1.2. GP63	18
1.2.1.2.1. Estructura de gp63	19
1.2.1.2.2. Actividad enzimática	19
1.2.1.2.3. Regulación génica	20
1.2.1.2.4. Gp63 en amastigotes	20
1.2.1.3. LIPIDOFOSFOGLICANO (LPG)	21
1.2.1.3.1. Estructura del LPG	21
1.2.1.3.2. Modificaciones del LPG durante la metacicloogénesis	23
1.2.1.3.3. LPG de amastigotes	23
1.2.1.3.4. Factor de excreción	25
1.2.1.3.5. Funciones del LPG	25
1.2.2. TRANSPORTE DE NUTRIENTES E IONES ATRAVÉS DE LA MEMBRANA	28
1.2.2.1. TRANSPORTE DE PROTONES	28
1.2.2.2. TRANSPORTE DE Ca ²⁺	29
1.2.2.3. TRANSPORTE DE GLUCOSA	30
1.2.2.4. TRANSPORTE DE PROLINA	31
<i>1.3. SUPERVIVENCIA EN EL INTERIOR DEL HOSPEDADOR</i>	32
1.3.1. MECANISMOS DE ENTRADA EN LA CÉLULA HOSPEDADORA	32
1.3.2. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	32
1.3.2.1. ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS	34
<i>1.4. CONTROL DE LA LEISHMANIASIS</i>	36
1.4.1. CONTROL DEL RESERVORIO	36
1.4.2. CONTROL DEL VECTOR	36
1.4.2.1. CONTROL QUÍMICO	37
1.4.2.2. CONTROL BIOLÓGICO	37
1.4.2.3. CONTROL GENÉTICO	37

1.4.3. CONTROL A NIVEL DE PACIENTE	38
1.4.3.1. VACUNACIÓN	38
1.4.3.2. TRATAMIENTO	39
1.4.3.2.1. Antimoniales	39
1.4.3.2.2. Pentamidina	40
1.4.3.2.3. Ketoconazol	40
1.4.3.2.4. Anfotericina	40
1.4.3.2.5. Alopurinol	41
1.4.3.2.6. DFMO (difluormetilornitina)	41
1.4.3.2.7. Inhibidores de la formación y función de los microtúbulos	41
1.4.3.2.8. Inmunoterapia	42
1.4.3.2.9. Otros posibles agentes terapéuticos	42
1.4.3.3. RESISTENCIA A FÁRMACOS	43
1.5. PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS	45
1.5.1. CECROPINAS	48
1.5.1.1. ESTRUCTURA DE LAS CECROPINAS	49
1.5.1.2. REGULACIÓN GÉNICA DE LAS CECROPINAS	50
1.5.1.2.1. Motivos κB en el promotor de genes de cecropina	50
1.5.2. MODELOS DE PERMEABILIDAD POR PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN MEMBRANAS	51
1.5.2.1. MODELO DE PORO TIPO DUELAS DE BARRIL	52
1.5.2.2. MODELO DE ALFOMBRA	53
1.5.2.3. FORMACIÓN DE POROS A ALTA CONCENTRACIÓN DEL PÉPTIDO	54
1.5.3. MELITINA	55
1.5.4. ACCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN PROTOZOOS Y HELMINTOS	56
1.5.5. PÉPTIDOS HÍBRIDOS SINTÉTICOS CECROPINA A-MELITINA	58
2.OBJETIVOS	61
3. MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1. CULTIVO DE CÉLULAS	67
3.1.1. CULTIVO DE PARÁSITOS	67
3.1.1.1. PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	67
3.1.1.2. PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA TROPICA</i> LRC-L39 (C1)	67
3.1.1.3. PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA PIFANOI</i>	68
3.1.1.4. AMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA PIFANOI</i>	68
3.1.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS	68
3.2. PÉPTIDOS EMPLEADOS	68
3.2.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA A-MELITINA	69
3.3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE <u><i>LEISHMANIA</i></u> EN PRESENCIA DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS	69
3.3.1. INCORPORACIÓN DE ³ H-METIL-TIMIDINA	70
3.3.2. INCORPORACIÓN DE ³⁵ S-AMINOÁCIDOS	70

3.3.3. REDUCCIÓN DE MTT	70
3.4. <i>CONDICIONES DE INTERACCIÓN LEISHMANIA-CA(1-8)M(1-18)</i>	71
3.4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA	71
3.4.2. EFECTO DE SEROALBÚMINA BOVINA	71
3.4.3. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES	72
3.4.4. EFECTO DEL pH	72
3.4.5. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA	72
3.5. <i>EFECTO DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LEISHMANIA</i>	73
3.5.1. INCORPORACIÓN DE PROLINA	73
3.5.2. MEDICIÓN DE NIVELES DE Ca ²⁺ INTRACELULAR	73
3.5.3. MEDIDAS DE pH INTRACELULAR	74
3.5.4. VALORACIÓN DE ATP	74
3.5.4.1. VALORACIÓN DE ATP EN LEISHMANIAS TRANSFECTADAS CON LUCIFERASA	75
3.5.4.2. ESPECTROS DE ³¹ P RMN DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA	75
3.5.5. CONSUMO DE OXIGENO EN LEISHMANIA	76
3.5.5.1. MEDIDAS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE MITOCONDRIA	76
3.5.6. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-LEISHMANIA	77
3.6. <i>ALTERACIONES MORFOLÓGICAS</i>	77
3.6.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	77
3.7. <i>OTRAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR CA(1-8)M(1-18)</i>	78
3.7.1. INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE "STRESS"	78
3.8. <i>INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO CA(1-8)M(1-18) CON POLIANIONES</i>	79
3.8.1. SU EFECTO EN LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-LEISHMANIA	79
3.8.1.1. OBTENCIÓN DE LPG	79
3.8.1.2. HIDRÓLISIS DE PG	79
3.8.1.3. INHIBICIÓN DE LA INTERACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18) POR HEPARINA, PG Y LPG	79
3.8.2. VARIACIONES DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE CA(1-8)M(1-18) EN PRESENCIA DE COMPUESTOS POLIANIÓNICOS	80
3.9. <i>ENSAYOS SOBRE LEISHMANIAS MULTIRRESISTENTES</i>	80
3.9.1. EFECTO DEL VERAPAMIL	81
3.10. <i>ENSAYOS EN EL HOSPEDADOR</i>	81
3.10.1. ENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS EN LIPOSOMAS	81
3.10.2. INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	81
3.10.3. TRATAMIENTO DE RATONES INFECTADOS CON LEISHMANIA MAJOR	82
3.11. <i>ENSAYOS DE VIABILIDAD DE PROMASTIGOTES EN EL INTERIOR DEL VECTOR</i>	83

4. RESULTADOS	85
4.1. INHIBICIÓN DE VIABILIDAD DE <u>LEISHMANIA</u> POR PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA-MELITINA	87
4.1.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD DE PROMASTIGOTES DE <u>LEISHMANIA DONOVANI</u>	87
4.1.2. ACTIVIDAD DE DIFERENTES PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN LA VIABILIDAD DE <u>LEISHMANIA</u>	89
4.2. FACTORES DE LA INTERACCIÓN <u>LEISHMANIA-CA(1-8)M(1-18)</u>	90
4.2.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA	90
4.2.2. EFECTO DE BSA (seroalbúmina bovina)	93
4.2.3. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE CA(1-8)M(1-18)	94
4.2.4. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE CA(1-8)M(1-18) CON EL pH DEL MEDIO	96
4.2.5. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA	97
4.3. ALTERACIONES DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA DE <u>LEISHMANIA</u>	98
4.3.1. INCORPORACIÓN DE PROLINA	98
4.3.2. VARIACIÓN DE LOS NIVELES Ca ²⁺ INTRACELULAR	99
4.3.3. EFECTO DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE EL pH INTRACELULAR	101
4.3.4. MEDIDAS DE ATP INTRACELULAR	102
4.3.5. INHIBICIÓN DE LA VELOCIDAD DEL CONSUMO DE OXÍGENO	105
4.3.6. VARIACIÓN DEL POTENCIAL DE MITOCONDRIA	106
4.3.7. DEPENDENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTERACCIÓN CA(1-8)M(1-18) CON PROMASTIGOTES DE <u>LEISHMANIA</u> <u>DONOVANI</u>	106
4.4. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS	109
4.5. INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE "STRESS"	114
4.6. EFECTO DE SUSTANCIAS POLIANIÓNICAS EN LA ACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE PROMASTIGOTES DE <u>LEISHMANIA DONOVANI</u>	114
4.6.1. EFECTO DE LA HEPARINA	114
4.6.1.1. ACTIVIDAD DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE EL MUTANTE R2D2 DE <u>LEISHMANIA DONOVANI</u> DEFICIENTE EN LA BIOSÍNTESIS DE LPG	117
4.6.2. EFECTO DEL LPG, PG Y DEL PG HIDROLIZADO SOBRE LA INTERACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18) CON <u>LEISHMANIA DONOVANI</u>	118
4.7. CAMBIOS CONFORMACIONALES DE CA(1-8)M(1-18) INDUCIDOS POR COMPUESTOS POLIANIÓNICOS	120
4.8. EFECTO DEL PÉPTIDO CA(1-8)M(1-18) EN LOS DISTINTOS ESTADOS DE <u>LEISHMANIA</u>	122
4.8.1. EFECTO DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE DIFERENTES ESTADOS DEL PARÁSITO	122

4.8.2. EFECTO SOBRE PROMASTIGOTES DENTRO DEL VECTOR	123
4.9. <i>EL PÉPTIDO COMO POSIBLE AGENTE TERAPÉUTICO</i>	124
4.9.1. ACCIÓN SOBRE PROMASTIGOTES MULTIRRESISTENTES A DROGAS	124
4.9.2. EFECTO SOBRE MACRÓFAGOS INFECTADOS <i>IN VITRO</i>	125
4.9.3. TRATAMIENTO DE RATONES	127
5. DISCUSIÓN	129
5.1. <i>EFFECTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN <u>LEISHMANIA</u></i>	132
5.1.1. MÉTODOS DE VIABILIDAD	132
5.1.2. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE ANÁLOGOS CECROPINA A-MELITINA	134
5.2. <i>FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA INTERACCIÓN <u>LEISHMANIA-PÉPTIDO</u></i>	136
5.3. <i>LA MEMBRANA COMO DIANA DEL PEPTIDO</i>	138
5.3.1. TRANSPORTE DE PROLINA	138
5.3.2. PERMEABILIDAD DE MEMBRANA A Ca^{2+} Y A H^{+}	139
5.4. <i>ALTERACIONES MORFOLÓGICAS</i>	141
5.5. <i>INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE "STRESS"</i>	142
5.6. <i>ALTERACIONES EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE <u>LEISHMANIA</u> POR LA ACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18)</i>	142
5.7. <i>MECANISMO PROPUESTO DE ACCIÓN LETAL DEL PÉPTIDO SOBRE <u>LEISHMANIA</u></i>	144
5.8. <i>MOLÉCULAS DE <u>LEISHAMANIA</u> IMPLICADAS EN LA INTERACCIÓN CON CA(1-8)M(1-18)</i>	148
5.9. <i>DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS ESTADOS DEL PARÁSITO</i>	151
5.9.1. DIFERENCIAS ENTRE PROMASTIGOTES PROCÍCLICOS Y METACÍCLICOS	151
5.9.2. DIFERENCIAS ENTRE PROMASTIGOTES Y AMASTIGOTES	152
5.9.3. EFECTO SOBRE PROMASTIGOTES EN EL VECTOR	152
5.9.4. CA(1-8)M(1-18) EN MACRÓFAGOS INFECTADOS Y EN EL MODELO MURINO DE LA LEISHMANIASIS	153
5.10. <i>PÉPTIDOS CECROPINA A- MELITINA EN CEPAS MULTIRRESISTENTES A FÁRMACOS</i>	156
5.11. <i>UTILIZACIÓN TERAPEÚTICA DE PÉPTIDOS CON FUNCIÓN LEISHMANICIDA</i>	157

5.12. INTERACCIÓN DE <u>LEISHMANIA</u> CON PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS EN LA NATURALEZA	159
6. CONCLUSIONES	163
7. BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

BCECF	tetra-acetoximetil 2',7'-bis-(carboxietil) 5,6, carboxifluoresceína
BSA	seroalbúmina bovina
CR1	receptor del componente C3 del sistema de complemento
CR3	receptor del componente C3bi del sistema de complemento
DFMO	difluormetilornitina
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilen-glicol-bis(β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetraacético
Fc	región constante de las inmunoglobulinas
FCCP	carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenil-hidrazona
GIPL	glicoinositolfosfolípido
GM-CSF	factor estimulante de formación de colonia de granulocitos-macrófagos
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HBSS	solución salina Hanks sin glucosa
HEPES	ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico
HIV	virus de inmunodeficiencia humana (human immunodeficiency virus)
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
hsp	proteína de choque térmico (heat shock protein)
IFN γ	interferón gamma
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintetasa inducible
IR	infrarrojo
LD ₅₀	dosis letal media
LFA	antígeno de linfocitos asociados a función
LPG	lípidofosfoglicano
LPS	lipopolisacárido
M-CSF	factor estimulante de formación de colonia de macrófagos
MDR	gen de multirresistencia a fármacos (multidrug resistance)
MOPS	ácido 4-morfolinosulfónico
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NK	célula asesina (natural killer)
NO	óxido nítrico
O. M. S.	Organización Mundial de la Salud
PBS	tampón fosfato salino
PG	fosfoglicano
PKC	proteína kinasa C
ppm	partes por millón
PPO	2,5-difeniloxazol
RMN	resonancia magnética nuclear
SDS	dodecilsulfato sódico
SFBI	suero fetal bovino inactivado por calor
T	tesla

TCA	ácido tricloracético
TFA	ácido trifluoracético
TGF β	factor de crecimiento tumoral beta
Th ₁	subconjunto 1 de linfocitos T cooperadores
Th ₂	subconjunto 2 de linfocitos T cooperadores
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
TRIS	tris-hidroximetilaminometano

6

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA DE *LEISHMANIA*

Leishmania es un protozoo parásito de vertebrados, incluido el hombre, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* y causante del conjunto genérico de patologías denominado leishmaniasis, cuyos cuadros clínicos son muy diversos y dependen tanto de la especie de *Leishmania* responsable de la infección como del estado inmunológico del hospedador (Alvar, 1994; Alvar et al., 1997). Su distribución comprende zonas tropicales y subtropicales, alcanzando zonas templadas.

La incidencia mundial de la enfermedad se cifra en 14 millones de casos con 400.000 nuevos cada año (Ashford et al., 1992) sin tendencia a disminuir, debido a diversos factores como la colonización de áreas endémicas, el aumento de cepas resistentes a los distintos fármacos usados para su tratamiento (Grogl et al., 1992) y la asociación de infección de *Leishmania* con estados de inmunodepresión, tales como los producidos por tratamientos en transplantes de órganos, leucemias o infección por HIV (Alvar, 1994; Alvar et al., 1996; Alvar et al., 1997); la O.M.S. ha estimado que entre un 1% y un 5% de pacientes con HIV en el área mediterránea desarrollarán leishmaniasis (Anónimo, 1991).

En España el agente causante es *Leishmania infantum*, perteneciente al complejo *donovani* (Alvar, 1988). El número de casos anuales declarados se sitúa alrededor de 120-130, aunque el número de leishmaniasis cutáneas que autocuran y que no son declaradas puede ser considerablemente mayor. Alrededor de un 80% de los cuadros viscerales en adultos se asocian a infección por HIV (Alvar, 1994; Alvar et al., 1996; Alvar et al., 1997). A excepción de las leishmaniasis antroponóticas de China e India, donde el hombre es el reservorio de la enfermedad, y el nuevo ciclo descrito en drogadictos (Alvar et al., 1997), la leishmaniasis es una enfermedad zoonótica mantenida por mamíferos salvajes o domésticos, como ocurre en España con el perro, y en menor medida el zorro y la rata (Marín et al., 1982).

Conforme al cuadro clínico de la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud establece tres formas principales de la enfermedad (Anónimo, 1990):

a) **Leishmaniasis visceral o kala-azar.**- Afecta a todo el sistema retículoendotelial (hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos), es la forma más grave y está producida por especies pertenecientes al complejo *donovani*.

b) **Leishmaniasis cutánea.**- Varía desde manifestaciones leves como el llamado botón de Oriente, producido por distintas especies de *Leishmania* pertenecientes a los complejos *tropica* y *major*, a casos crónicos más graves típicos del Nuevo Mundo propias de los complejos *mexicana* y de algunas especies del complejo *braziliensis* (*Leishmania braziliensis peruviana*). Algunos zimodemas de *Leishmania infantum* pueden causar leishmaniasis cutáneas (Gradoni y Gramiccia, 1994).

c) **Leishmaniasis mucocutánea.**- Provoca mutilaciones extensas por pérdida del tejido cartilaginoso en la cavidad orofaríngea y tabique nasal en las infecciones por leishmanias del complejo *braziliensis*.

1.1.1. TAXONOMÍA

Dentro del Reino *Protista*, *Leishmania* se encuentra en la Clase *Zoomastigophorea* correspondiente a los protozoos flagelados que carecen de actividad fotosintética. La presencia de una mitocondria única, que contiene una estructura especial rica en DNA llamada kinetoplasto, le sitúa en el Orden *Kinetoplastida*; al cual también pertenecen los tripanosomas, tanto de África como de América (Levine et al., 1980), que dan nombre a la familia (Familia *Trypanosomatidae*) y hace referencia al aspecto retorcido observado al microscopio óptico.

La sistemática del Género *Leishmania* comprendía un elevado número de subespecies. En 1990 el comité de expertos de la O.M.S. recomendó la eliminación de las subespecies dándoles rango de especies y la división del género en dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, dentro de los cuales se han establecido complejos que agrupan a las especies basándose en las similitudes existentes entre las mismas (Anónimo, 1990).

En el presente trabajo se han utilizado las especies *Leishmania pifanoi*, del complejo *mexicana*, *Leishmania donovani* del complejo *donovani* y *Leishmania tropica* del complejo *major*.

1.1.2. CARACTERÍSTICAS DE *LEISHMANIA*

Sus características diferenciales, muchas de ellas compartidas con otras especies de la familia, han sido descritas por Molyneux y Killick-Kendrick en 1987:

a) Presencia de kinetoplasto.- Estructura muy rica en DNA incluida dentro de la única mitocondria, situada por detrás de la bolsa flagelar. EL DNA se encuentra estructurado en círculos concatenados que constituyen los maxi- y minicírculos. El número de copias es de aproximadamente 25-50 para los maxicírculos y de 5000-10000 para los minicírculos (Shlomai, 1994). Los maxicírculos codifican ciertas proteínas mitocondriales y los RNA ribosomales, mientras que los minicírculos codifican los transcritos guía para la edición del mRNA mitocondrial (Stuart, 1995).

b) Reproducción asexual.- Las dos formas de *Leishmania* se dividen por fisión longitudinal simple. Durante la división celular no desaparece la membrana nuclear, es por tanto una mitosis cerrada. En algunos tripanosomas se han observado fenómenos de diploidía (Kooy et al., 1989), así como intercambio de material genético entre promastigotes en infecciones mixtas con *Leishmania major* en *Phlebotomus papatasi* (Panton et al., 1991), y fusión de núcleos de amastigotes intracelulares en varias especies de *Leishmania* (Kreutzer et al., 1994).

c) Microtúbulos subpeliculares.- Una característica de la Familia *Trypanosomatidae* es la presencia de un sistema de microtúbulos paralelos entre sí y subyacentes a la membrana plasmática que discurren de forma helicoidal con respecto al eje longitudinal de la célula, destinados a proporcionar rigidez a la misma (Angelopoulos, 1970), que implica el confinamiento de los procesos de exo- y endocitosis a la bolsa flagelar.

d) Presencia de glucosoma.- Los kinetoplastida son los únicos eucariotas conocidos donde la mayor parte de las enzimas glucolíticas se encuentran contenidas en un orgánulo denominado glucosoma, con ciertas similitudes con los peroxisomas (Michels y Opperdoes, 1991).

1.1.3. CICLO VITAL DE *LEISHMANIA*

Para completar su ciclo vital las especies del género *Leishmania* precisan un hospedador vertebrado de sangre caliente y un hospedador invertebrado que es un díptero de la subfamilia *Phlebotominae* (Familia *Psychodidae*). En el Viejo Mundo las especies principales implicadas en la transmisión de la leishmaniasis se encuentran englobadas en el Género *Phlebotomus*, mientras que en el Nuevo Mundo pertenecen principalmente al Género *Lutzomyia*. Los adultos tienen un tamaño aproximado de 2 mm y están recubiertos por numerosas cerdas; son de hábitos crepusculares y habitan en pequeñas madrigueras y oquedades. Pasan por cuatro estados larvarios y solamente las hembras adultas son hematófagas (Killick-Kendrick, 1978). Cuando éstas pican a un mamífero infectado con *Leishmania* adquieren con la ingesta de sangre macrófagos infectados con amastigotes intracelulares o amastigotes circulantes en sangre periférica. Los macrófagos son lisados en el interior del tubo digestivo del mosquito, dejando libres a los amastigotes que rápidamente se transforman en promastigotes. Existe tanto un cambio de pH en su hábitat, del pH ácido de la vacuola parasitófora (Rivas y Chang, 1983) al alcalino-neutro del tubo digestivo, como un cambio de temperatura, de los 37°C del hospedador vertebrado a los aproximadamente 25°C del flebotomo.

Los promastigotes son liberados en el tubo digestivo por destrucción de la membrana peritrófica, originada a partir del epitelio del tubo digestivo del flebotomo, y encargada de confinar la ingesta de sangre en su interior. El parásito juega una parte activa en su liberación por secreción de quitinasas (Schlein et al., 1991). Posteriormente se fijan al epitelio del tracto digestivo del mosquito, introduciendo sus flagelos entre los microvilli de las células epiteliales y formando estructuras de anclaje semejantes a hemidesmosomas (Killick-Kendrick, 1990). Existe una migración de los promastigotes hacia la faringe provocada por la ingesta de azúcares en la alimentación de la hembra, sin embargo promastigotes de *Leishmania infantum* son capaces de terminar su desarrollo en el interior de *Phlebotomus perniciosus* alimentados únicamente con sangre (Schlein, 1993). En esta nueva localización los promastigotes sufren el proceso de metacicloogénesis por el que adquieren infectividad (Sacks, 1989), pasando a la probóscide y permaneciendo en ella hasta su inoculación en otro hospedador vertebrado en una nueva ingesta de sangre. En la figura 1 se muestra un esquema del ciclo biológico de *Leishmania*.

La infectividad de los promastigotes es incrementada por la saliva del flebotomo (Lerner y Shoemaker, 1992) que posee propiedades vasodilatadoras y de permeabilización vascular, debidas a componentes como el maxadilano, aislado de *Lutzomyia longipalpis* (Ribeiro et al., 1989), un péptido vasodilatador más potente incluso que el CGRP (calcitonin gene related peptide) que era el vasodilatador más potente conocido (Lerner et al., 1991); o como las apirasas que impiden la agregación plaquetaria mediada por hidrólisis de ADP y ATP (Ribeiro et al., 1989).

Dentro del hospedador vertebrado los promastigotes metacíclicos son fagocitados por los macrófagos del sistema reticuloendotelial, incluidos en una vacuola fagocítica que se fusiona con lisosomas formando la vacuola fagolisosomal, dentro de la cual el promastigote se transforma en amastigote donde posteriormente se multiplica hasta lisis la célula hospedadora; los amastigotes liberados infectan nuevos macrófagos (Chang et al., 1985).

1.1.4. CAMBIOS INTERESTADIO

En su ciclo vital *Leishmania* pasa por dos ambientes muy diferentes, el tubo digestivo del vector y la sangre del hospedador vertebrado, que requieren adaptaciones profundas y específicas en la biología de cada estado del parásito, reflejadas en la tabla 1.

1.2. MEMBRANA PLASMÁTICA DE *LEISHMANIA*

La membrana plasmática de *Leishmania* es la estructura que relaciona al parásito con el medio exterior. De ella depende el transporte de metabolitos, el mantenimiento de gradientes iónicos a través de ella y los componentes estructurales que preservan a la célula de las fuerzas físicas del exterior.

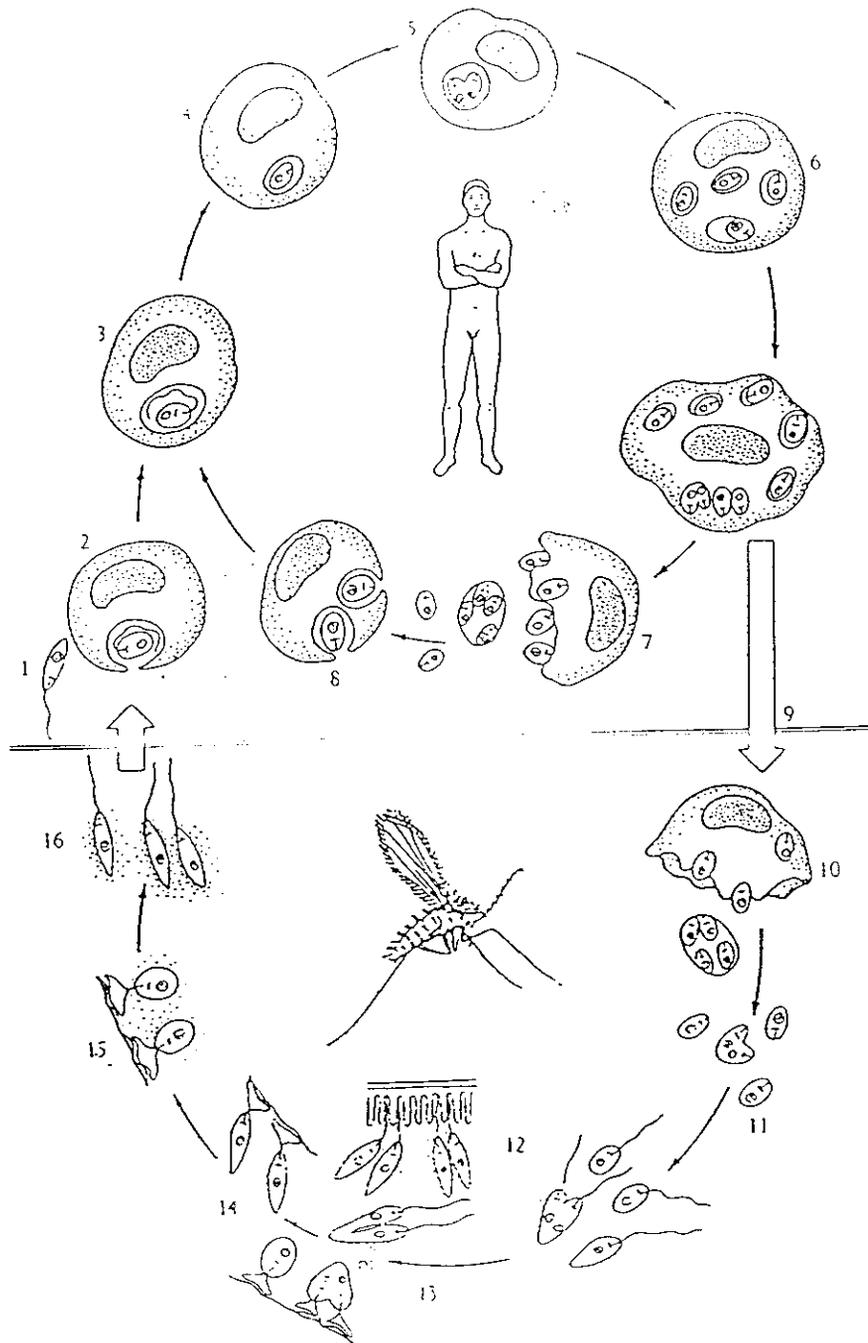


FIGURA 1.- Ciclo biológico de *Leishmania*.

1) inoculación de promastigotes, por picadura del flebotomo, en el mamífero hospedador; 2) entrada del promastigote en las células macrofágicas; 3-4) diferenciación de promastigote a amastigote en el fagolisosoma de la célula infectada; 5-6) multiplicación de los amastigotes; 7) rotura del macrófago altamente parasitado y liberación de amastigotes; 8) fagocitosis de los amastigotes liberados por parte de nuevos macrófagos, diseminación de la infección; 9) ingestión de macrófagos parasitados durante la alimentación hematófaga del flebotomo; 10-11) lisis de los macrófagos y liberación de los amastigotes; 12) transformación en promastigotes; 13-14) unión de los promastigotes a las células del epitelio digestivo del flebotomo; 15-16) migración hacia la probóscide y transformación en promastigotes infectivos.

**TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS DISTINTOS ESTADOS DE
LEISHMANIA**

	PROMASTIGOTES PROCÍCLICOS	PROMASTIGOTES METACÍCLICOS	AMASTIGOTES
MORFOLOGÍA	15x3-6 µm, bolsillo flagelar pequeño, abundante retículo endoplasmático.	Flagelo más largo, bolsillo flagelar distendido.	Ovoides 3-6 µm. Flagelo muy corto sin varilla paraxial. Megasoma en complejo <i>mexicana</i> .
METABOLISMO	Dependiente de glucolisis y oxidación de aminoácidos.	Metabolismo intermedio entre promastigotes y amastigotes.	Dependiente de la oxidación de ácidos grasos.
HÁBITAT	Interior del tubo digestivo del flebotomo, pH > 7, Temperatura ambiente.	En la probóscide del vector. Temperatura ambiente.	En el fagolisosoma de las células del hospedador vertebrado, pH ácido. Temperatura 37°C
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	Metaloproteinasa gp63 abundante.		Cisteín-proteasa en el complejo <i>mexicana</i> .
MEMBRANA PLASMÁTICA	gp63 (superficie): +++; gp46: ++; LPG promedio de unidades de repetición 16 (<i>L. donovani</i> y <i>L. major</i>); GIPLs: ++.	gp63 (superficie): ++++; gp46: ++ LPG unidades de repetición 32; GIPLs: ++.	gp63 (lisosomal): +; gp46: -; LPG menos abundante y cambia los azúcares; GIPLs: ++++.

La presente exposición se centra en aquellas estructuras que pueden intervenir en la interacción *Leishmania*-péptido, sin hacer referencia a otros componentes mayoritarios como gp46; una glicoproteína mayoritaria de los promastigotes de *Leishmania*, a excepción de las del complejo *braziliensis* (McMahon-Pratt et al., 1992), anclada a la membrana por una estructura de glicosilfosfatidilinositol, que es extremadamente resistente a la degradación proteolítica (Rivas et al., 1991) y ha sido empleada, en diferentes ensayos, como antígeno protector (Champsi y McMahon-Pratt, 1988; McMahon-Pratt et al., 1993).

1.2.1. COMPONENTES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

1.2.1.1. COMPOSICIÓN LIPÍDICA

De los lípidos totales de la membrana de los tripanosomátidos, el 30% aproximadamente son esteroides, que ayudan a mantener la fluidez de la membrana (Wassef et al., 1985). El principal esteroide es el 5,7-dien-esteroide, identificado como ergosterol (Hunt y Ellar, 1974). Los fosfolípidos mayoritarios en promastigotes de *Leishmania donovani* son fosfatidilcolina (47% de los fosfolípidos totales), fosfatidiletanolamina (37%) y fosfatidilinositol (14%). Este último, además de ser un elemento estructural de la membrana, sirve para el anclaje de glicoproteínas y otros antígenos de la membrana de *Leishmania* por estructuras de glicosilfosfatidilinositol. Comparando con otras células eucarióticas en los tripanosomátidos la relación ergosterol/fosfolípido es muy alta (1.54 µg/mg de peso seco) (Voorheis et al., 1979). La composición de lípidos varía en distintos tipos de membrana; en el flagelo hay principalmente fosfatidiletanolamina y esfingolípidos, en la membrana plasmática hay mayor variedad de fosfolípidos, mientras que en la membrana del kinetoplasto los componentes mayoritarios son fosfatidilcolina y difosfatidildiglicerol (Beach et al., 1979).

1.2.1.2. GP63

Gp63 es la proteína mayoritaria de la membrana de los promastigotes de *Leishmania*. Es una glicoproteína con actividad metaloproteínasa (Etges et al., 1986a) y con un peso molecular de 63

kDa. Se encuentra unida a la membrana por una estructura de glicosilfosfatidilinositol (Bordier et al., 1986; Etges et al., 1986b). En cada promastigote hay aproximadamente unas 500.000 copias (Bordier, 1987) distribuidas homogéneamente por toda la superficie del promastigote incluyendo el bolsillo flagelar (Russell y Wilhelm, 1986).

Es una proteína muy conservada en todas las especies de *Leishmania*; identificándose en todas las leishmanias patógenas para el hombre (Bouvier et al., 1987) y en otros tripanosomátidos como *Herpetomonas* y *Crithidia* (Etges, 1992).

1.2.1.2.1. Estructura de gp63

La similitud en la secuencia de aminoácidos de gp63 entre las distintas especies de *Leishmania* es superior al 80% (Webb et al., 1991). Las secuencias más conservadas se corresponden con el sitio de unión de Zn^{2+} del centro activo (Bouvier et al., 1989).

En la secuencia de gp63 se distinguen cuatro regiones: 1) el péptido señal, 2) la región de proenzima, 3) la secuencia de la proteína madura y 4) la región del carboxilo terminal, como señal para la adición del GPI. El tamaño de las diferentes regiones es muy semejante entre las distintas especies de *Leishmania*, a excepción de la proenzima. La estructura secundaria, muy diferente de otras metaloproteinasas, esta formada por un 50% de hoja β antiparalela y un 20% de α -hélice (Jähning y Etges, 1988; Bouvier et al., 1989).

1.2.1.2.2. Actividad enzimática

La actividad enzimática se inhibe por inhibidores típicos de metaloproteinasas como 1,10 fenantrolina y otros quelantes (Etges et al., 1986a), siendo recuperada por incubación con Zn^{2+} (Chaudhuri y Chang, 1988).

Gp63 actúa como una endopeptidasa de amplio espectro de especificidad; puede hidrolizar sustratos tales como azocaseína, seroalbúmina, hemoglobina, inmunoglobulinas del tipo IgG, el factor C3 del complemento y péptidos de bajo peso molecular (Chaudhuri et al., 1989; Ip et al., 1990; Bouvier et al., 1990). La secuencia de corte viene determinada por la existencia de un residuo hidrofóbico en la posición P_1' y aminoácidos básicos en los sitios P_2' y P_3' ; es frecuente que en el sitio P_1 se encuentren residuos de tirosina (Bouvier et al., 1990). Un pH alcalino-neutro es

el óptimo para la hidrólisis de azocaseína (Tzinia y Soteriadou, 1991), mientras que con BSA el pH óptimo se sitúa alrededor de 4 (Chaudhuri y Chang, 1988).

1.2.1.2.3. Regulación génica

Gp63 está codificada por varios genes dispuestos en tándem en un único locus. En *Leishmania major* este locus tiene un tamaño de 3.1 kb y se encuentra en un único cromosoma. Este tipo de estructura génica se conserva entre las diferentes especies de *Leishmania*, aunque el número de copias varía de una especie a otra (Button et al., 1989).

La expresión de gp63 aumenta de 6 a 11 veces en promastigotes metacíclicos respecto a los procíclicos (Ramamoorthy et al., 1992), por lo cual ha sido considerada un factor de virulencia (Chang y Chaudhuri, 1990). Gp63 está implicada en la supervivencia de *Leishmania* en el fagolisosoma, ya que los macrófagos son incapaces de degradar proteínas encapsuladas en liposomas cuando estos están recubiertos con gp63 (Chaudhuri et al., 1989).

1.2.1.2.4. Gp63 en amastigotes

En amastigotes de *Leishmania mexicana* se ha demostrado la existencia de gp63 tanto por estudios de RNA como a nivel de proteína. En amastigotes de *Leishmania major* la expresión y la actividad proteolítica de gp63 se reduce por debajo del 0.3% respecto a los promastigotes (Ilg et al., 1993). Gp63 se expresa rápidamente entre las 4-12 primeras horas de la transformación de amastigote a promastigote, alcanzando un nivel máximo antes de adquirir la típica morfología de promastigote (Schneider et al., 1992).

En promastigotes de *Leishmania mexicana* la heterogeneidad de gp63 se debe a la transcripción de tres familias distintas de genes. En cambio en amastigotes la expresión de gp63 es el resultado de la transcripción de los genes de una sola familia, diferenciada del resto por la secuencia del extremo carboxi-terminal que determina la carencia de asociación de gp63 a la membrana (Medina-Acosta et al., 1993). Estudios con amastigotes de *Leishmania mexicana*, sugieren que la proteína en amastigotes no presenta anclaje a la membrana por una estructura de glicodilfosfatidilinositol y se encuentra localizada en el lisosoma (Ilg et al., 1993).

1.2.1.3. LIPIDOFOSFOGLICANO (LPG)

Los promastigotes de todas las especies de *Leishmania* sintetizan LPG, que es el principal glicoconjugado de la membrana plasmática; se encuentra uniformemente distribuido incluyendo el flagelo (McConville y Bacic, 1989). Cada célula contiene aproximadamente 1.25×10^6 moléculas de LPG, de las cuales el 80% se encuentran en la membrana (Orlandi y Turcò, 1987). En promastigotes metacíclicos el LPG aumenta su longitud formando un glucocáliz alrededor del parásito (Pimenta et al., 1989).

1.2.1.3.1. Estructura del LPG

En la estructura de la molécula del LPG se pueden diferenciar cuatro dominios:

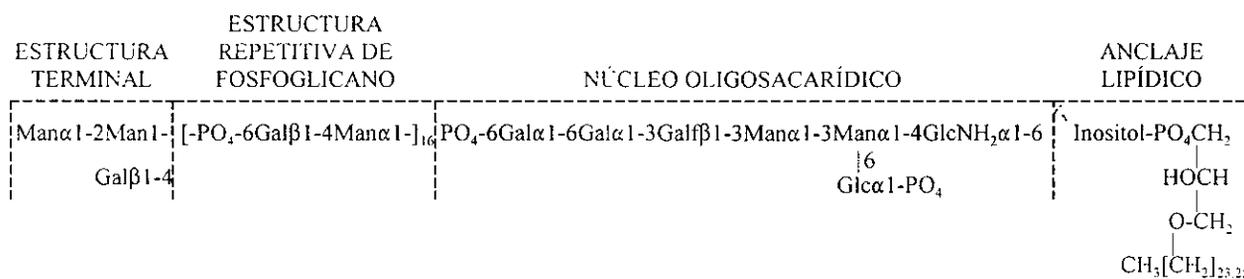
Anclaje lipídico.- El LPG se une a la membrana plasmática por medio de una estructura de glicosilfosfatidilinositol del tipo 1-*O*-alquil-2-liso-fosfatidil(mio)inositol (Orlandi y Turco, 1987).

Núcleo oligosacárido.- Consta de un residuo de glucosamina no acetilada, dos de D-manosa, uno de galactosa-6-fosfato, una galactopiranososa y una galactofuranosa, muy infrecuente entre los glicoconjugados eucarióticos (Turco et al., 1989).

Estructura de fosfoglicano.- Formado por la repetición de unidades de disacárido fosforiladas ($\text{PO}_4\text{-6Gal}[\beta 1,4]\text{Man}[1\alpha]$). El residuo de manosa está sustituido en posición 4-*O*, enlace no descrito en ningún otro glicoconjugado eucariótico. Esta estructura puede tener cadenas laterales, en el grupo hidroxilo del carbono 3 de la D-galactosa, formadas por residuos de D-galactosa, D-glucosa y L-arabinosa. En el caso de *Leishmania donovani* no hay cadenas laterales y el número de repeticiones en promastigotes procíclicos es de 16 (Turco et al., 1987).

Estructuras terminales.- En la parte final del LPG se encuentran varios oligosacáridos que pueden contener tanto galactosa como manosa. En *Leishmania donovani* dicha estructura está formada por un trisacárido ramificado $\text{Gal}(\beta 1,4)[\text{Man}(\alpha 1,2)]\text{Man}(\alpha 1)$ (Thomas et al., 1992).

FIGURA 2.- Estructura mayoritaria del LPG de *Leishmania donovani*



El análisis estructural del LPG de diversas especies de *Leishmania* indican que la región responsable de la unión a la membrana es idéntico en todas. El núcleo oligosacarídico también se encuentra muy conservado, mientras que la mayor variabilidad entre especies se encuentra en la estructura de fosfoglicano y en las estructuras terminales (Ilg et al., 1992; McConville et al., 1990).

El LPG migra en geles de poliacrilamida en presencia de SDS con un peso molecular aparente comprendido entre los 20 y los 67 kDa (Handman et al., 1984). Esta heterogeneidad se debe tanto al diferente número de unidades fosforiladas en diferentes moléculas de LPG (Turco y Descoteaux, 1992), como a la migración anómala que sufren los polisacáridos en presencia de SDS. En filtración en gel eluye en un rango de masa molecular comprendido entre los 20-30 kDa. En el proceso de purificación el LPG copurifica con diversas proteínas, lo que explica el marcaje metabólico con ³⁵SO₄²⁻ y los cambios en la movilidad electroforética tras tratamiento con pronasa (Handman et al., 1984).

La estructura de glicosilfosfatidilinositol de unión a la membrana dota a la molécula de características anfipáticas, responsables de la formación de agregados micelares de alto peso molecular de LPG (Handman et al., 1984).

La estructura secundaria del LPG es una hélice con un paso de 6 unidades por vuelta en el caso de *Leishmania donovani* (Homans et al., 1992) en equilibrio dinámico con otras conformaciones de pasos de hélice muy superiores, cuyo intercambio no está restringido por

barreras energéticas elevadas debido a la facilidad de giro del enlace $\text{Man}\alpha 1\text{-PO}_4\text{-6Gal}$ de las unidades repetitivas del fosfoglicano, que origina cambios en la longitud de la molécula comprendidos entre 90 Å a 160 Å, admitiendo una media de 16 unidades repetitivas (Homans et al., 1992). Los residuos de D-galactosa se sitúan hacia el exterior de la hélice y los de D-manosa y los grupos fosfato se orientan hacia el interior. Estos últimos son capaces de quelar Ca^{2+} sin que la conformación del LPG se vea afectada. El núcleo oligosacárido se orienta paralelo al plano de la membrana plasmática. El porcentaje de la superficie del parásito cubierta por el LPG puede alcanzar el 60% (Homans et al., 1992).

La inmunogenicidad del LPG abarca tanto al núcleo oligosacárido, donde aparecen epitopos comunes a las diferentes especies de *Leishmania*, como a las unidades repetitivas, con anticuerpos monoclonales específicos de especie (Tolson et al., 1989).

1.2.1.3.2. Modificaciones del LPG durante la metacicloogénesis

Como ya fue mencionado anteriormente, los promastigotes metacíclicos de las especies pertenecientes a los complejos *donovani* y *major* expresan un LPG con una longitud que aproximadamente dobla la de los promastigotes en fase logarítmica de crecimiento (Sacks et al., 1990; Turco y Descoteaux, 1992), debido al incremento en el número de unidades sacarídicas fosforiladas del fosfoglicano. En *Leishmania major* el último residuo de la región terminal del LPG de los promastigotes logarítmicos es β -galactosa, mientras que en los metacíclicos es α -arabinosa y en menor proporción β -glucosa. Tal diferencia permite aglutinar con lectina de cacahuete los promastigotes procíclicos (Sacks et al., 1985; Da Silva y Sacks, 1987).

1.2.1.3.3. LPG de amastigotes

Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales contra el LPG de promastigotes se han detectado epitopos en la superficie de macrófagos infectados (Handman y Hocking, 1982; De Ibarra et al., 1982; Handman, 1990); estos mismos anticuerpos reconocen componentes de amastigotes (Handman et al., 1987).

En 1991 Turco y Sacks purificaron un lipoglicoconjugado de amastigotes de *Leishmania major* que presentaba una serie de similitudes con el LPG de promastigotes (Turco y Sacks, 1991):

a) El glicoconjugado de amastigotes fue extraído por el mismo método y solventes descritos para el LPG de promastigotes (Orlandi y Turco, 1987).

b) La obtención de la porción hidrofílica del LPG de amastigotes y liberación del mismo de la membrana puede ser lograda por tratamiento con ácido nitroso, indicando la presencia de un residuo de hexosamina semejante al de promastigotes (Moody et al., 1993) o por hidrólisis por fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, que demuestra la existencia de estructuras de anclaje a la membrana por glicosilfosfatidilinositol; el fragmento hidrofílico obtenido por este último procedimiento presenta un tamaño intermedio entre el obtenido de promastigotes logarítmicos y el de los metacíclicos.

c) El fosfoglicano de amastigotes es, al igual que el de promastigotes, susceptible a la hidrólisis ácida, demostrando la existencia de uniones fosfodiéster.

Por otro lado también existen peculiaridades propias del LPG de amastigotes; en *Leishmania major* la estructura terminal es principalmente el disacárido Gal(β 1-4)Man(α 1), mientras que dicha estructura es muy minoritaria en los promastigotes, donde la estructura terminal predominante es Man(α 1-2)Man(α 1), no detectada en amastigotes (Moody et al., 1993). Dichas diferencias han permitido obtener cinéticas de expresión de las mismas en transformaciones interestadio; durante la diferenciación de amastigote a promastigote la forma de LPG específica de amastigote desaparece después de 48 horas de cultivo; en la transformación inversa, promastigote a amastigote, el LPG de amastigotes se detecta 12 horas después de la infección (Glaser et al., 1991).

El número de copias de LPG en amastigotes es dependiente de especie; en amastigotes de *Leishmania mexicana* y de *Leishmania donovani* el número de moléculas de LPG por célula es muy bajo, ($<10^3$ moléculas/célula), mientras que en *Leishmania major* el número de moléculas es algo superior, alcanzando 2×10^3 moléculas/célula (Bahr et al., 1993).

La relativa carencia de LPG en amastigotes es suplida por glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), cuyo número de copias es muy semejante a la encontrada en promastigotes, y cubren una considerable fracción de la superficie del amastigote (McConville y Blackwell, 1991). La

estructura de muchos de los GIPLs es similar a secuencias truncadas del núcleo oligosacárido del LPG (McConville y Bacic, 1989).

1.2.1.3.4. Factor de excreción

En el medio de cultivo de *Leishmania* se han aislado componentes semejantes al LPG, agrupados bajo el nombre genérico de Factor de Excreción (El-On et al., 1979), diferenciados en tres grupos principales:

- 1.- LPG de membrana celular asociado a la albúmina del medio. Su posible origen es la liberación de la superficie del promastigote y su posterior unión hidrofóbica a la albúmina (King et al., 1987).
- 2.- Polímeros de fosfatasa ácida secretada por el parásito, cuyos carbohidratos presentan epitopos comunes con la unidad repetitiva del LPG (Ilg et al., 1990; Jaffe et al., 1990).
- 3.- Un derivado soluble del LPG formado únicamente por unidades repetitivas cuyo número es menor que en el LPG (Greis et al., 1992), procedente de la degradación del LPG por un proceso no suficientemente establecido.

1.2.1.3.5. Funciones del LPG

La función del LPG es pleiotrópica, actuando en diverso puntos del ciclo biológico de *Leishmania*; en algunos casos ha sido posible la asignación de funciones a las diferentes partes que lo constituyen.

Funciones en el vector

Durante la metacicloogénesis de los promastigotes en el interior del mosquito existe un cambio estructural del LPG, relacionado en *Leishmania donovani* y en *Leishmania major* con procesos de unión del parásito a las células del epitelio del tracto digestivo del vector, y de su migración posterior hacia la probóscide (Turco, 1990). La unión del parásito al epitelio se debe en gran parte al LPG de los promastigotes procíclicos (Pimenta et al., 1994a) a través de los residuos de β Gal

de las cadenas laterales (McConville et al., 1992). Los niveles de LPG metacíclico obtenido en el interior del sistema digestivo del flebotomo aumentan con el tiempo, a la vez que libera a los promastigotes de la pared del tubo digestivo (Sacks et al., 1995).

El LPG protege al parásito de las enzimas hidrolíticas del tubo digestivo del mosquito; la supervivencia en *Phlebotomus papatasi* de una cepa de *Leishmania major* deficiente en LPG, se incrementa cuando la ingesta de sangre se suplementa con LPG (Schlein et al., 1990).

Funciones en el hospedador vertebrado

En la picadura la inoculación de los parásitos con la saliva del mosquito provoca una inflamación local; los monocitos y los neutrófilos que se acumulan en el foco tienen un tactismo locomotriz disminuido por acción del LPG y del PG, que contribuye al establecimiento de la infección (Frankenburg et al., 1990).

Entre la inoculación de los parásitos y la infección de los macrófagos transcurre un tiempo en el cual los promastigotes están expuestos a los efectos líticos del suero del hospedador. En los promastigotes metacíclicos el LPG evita la inserción del complejo de ataque C5b-9 del complemento, que ha sido activado por la vía alterna (Puentes et al., 1990). La activación de la vía alterna fija sobre la superficie del parásito el componente C3b que posteriormente será reconocido por los receptores CR3 y CR1 del macrófago. El LPG puede interactuar directamente con las integrinas linfocitarias de la familia LFA-1 (Puentes et al., 1989; Puentes et al., 1988). La unión del LPG al receptor CR3 se realiza en la cadena α de CR3, en el mismo lugar de unión del lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana (Talamàs-Rohana et al., 1990).

En macrófagos infectados tanto la expresión de moléculas de clase II del complejo de histocompatibilidad como la producción de interleucina 1 (IL-1) son defectivas (Reiner, 1987a y 1987b). Monocitos incubados con LPG purificado tienen inhibida la secreción de IL-1 inducida por LPS (Frankenburg et al., 1990). Asimismo, el LPG reduce la capacidad de los macrófagos de unir TNF α (Descoteaux et al., 1991) a pesar de la estimulación de la secreción de esta citoquina por infección con *Leishmania* (Green et al., 1990).

El LPG también colabora en la supervivencia del parásito dentro de la célula hospedadora; la infección de macrófagos con promastigotes deficientes en la producción de LPG termina con la muerte del parásito, y la transferencia pasiva de LPG a estos mismos promastigotes aumenta su supervivencia (McNeely y Turco, 1990).

La protección del parásito frente al macrófago mediada por LPG se realiza a diversos niveles:

a) Inhibición de enzimas lisosomales.- La cubierta a manera de glucocálix formada por el LPG dificulta la acción de las hidrolasas lisosomales sobre la membrana del parásito. Al ser el LPG una molécula con muy alto contenido en grupos fosfato puede unir el Ca^{2+} que esté presente en el lisosoma, afectando al correcto funcionamiento de las diferentes enzimas (Eilam et ál., 1985). La actividad de β -galactosidasa disminuye tras tres horas post-infección de los macrófagos, se ha postulado que el disacárido Gal(β 1-4) Man(1 α), muy abundante en el LPG, puede actuar como inhibidor competitivo (El-On et al., 1980).

b) Inhibición de la respuesta oxidativa.- Se ha demostrado que el LPS de otros organismos patógenos como *Mycobacterium leprae* pueden neutralizar los productos de la respuesta oxidativa de los macrófagos por oxidación a cetona de los hidroxilos presentes en los azúcares del LPS (Chan et al., 1989). Este mismo papel neutralizador parece ser realizado por LPG. Monocitos incubados con LPG muestran una disminución de la respuesta oxidativa cuando ésta es activada por fagocitosis (Frankenburg et al., 1990). Asimismo, la fagocitosis de partículas recubiertas de LPG también disminuyen la respuesta oxidativa de macrófagos humanos (McNeely y Turco, 1990 y Liew et al., 1990b). Recientemente se ha demostrado que el LPG de promastigotes no es capaz de inducir la expresión de iNOS aunque presenta sinergia con el IFN γ , y la incubación previa de los macrófagos con LPG inhibe la producción de NO aún estimulándolos con la citoquina (Proudfoot et al., 1996).

c) Inhibición de la proteína kinasa C.- En los fagocitos uno de los acontecimientos mediados por proteína kinasa C (PKC) es la iniciación de la respuesta oxidativa y la inducción de NO sintetasa. El LPG es un potente inhibidor *in vitro* de PKC purificada de cerebro de rata (McNeely y Turco, 1987). El LPG no se une al dominio catalítico de PKC, sino que interacciona con el dominio regulador donde hay sitios de unión para diacilglicerol, Ca^{2+} y fosfolípidos. La estructura de anclaje a la membrana del LPG, 1-*O*-alquilglicerol, posee una potente actividad inhibitoria de PKC, mientras que la porción de fosfoglicano sólo inhibe ligeramente (McNeely et al., 1989).

d) Inhibición en la transducción de señal.- La activación de PKC también produce la expresión de determinados protooncogenes como el gen *c-fos*. En macrófagos este gen se induce por PKC y por cAMP. Macrófagos infectados con *Leishmania donovani* tienen disminuida la capacidad de expresar el gen *c-fos* en respuesta a LPS o a diacilglicerol, lo que sugiere una interferencia del parásito en la vía de activación de PKC (Descoteaux y Matlashewski, 1989), ya que el LPG no disminuye la capacidad de los macrófagos de expresar *c-fos* activado por cAMP (Descoteaux et al., 1991). Esta inhibición de la transducción de señales dentro del macrófago podría atenuar el impacto de señales activadoras externas y por lo tanto beneficiar la supervivencia del parásito dentro de la célula hospedadora.

1.2.2. TRANSPORTE DE NUTRIENTES E IONES A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

El éxito de supervivencia de *Leishmania* depende de su capacidad de adaptación a los ambientes hostiles tanto dentro del vector como del hospedador vertebrado y por lo tanto de su habilidad para mantener la homeostasis intracelular controlando el transporte de nutrientes y de iones.

1.2.2.1. TRANSPORTE DE PROTONES

Durante el ciclo biológico de *Leishmania* el pH del medio que la rodea varía desde el ligeramente alcalino del sistema digestivo del mosquito vector, al pH ácido de la vacuola parasitófora del macrófago del hospedador vertebrado (Rivas y Chang, 1983), donde por otro lado hay un incremento considerable de la temperatura; en ambas condiciones debe el parásito mantener un pH constante y una homeostasis intracelular.

En promastigotes de *Leishmania donovani* se ha identificado una H⁺-ATPasa. Por técnicas de inmunofluorescencia indirecta y por criofractura se ha visto que se encuentra distribuida por toda la membrana plasmática incluido el bolsillo flagelar (Liveanu et al., 1991), es dependiente

de Mg^{2+} y su pH óptimo es 6.5. La utilización de vesículas obtenidas a partir de la membrana plasmática de promastigotes ha demostrado que esta ATPasa actúa como una bomba de protones, responsable de la existencia de un gradiente electroquímico a través de la membrana del parásito (Zilberstein et al., 1987; Zilberstein y Dwyer, 1988). Los promastigotes de *Leishmania donovani* son capaces de mantener su pH intracelular entre 6.4 y 6.7 aunque el pH del medio extracelular varíe entre 5 y 7.5 (Zilberstein et al., 1989), valores representativos de los ambientes donde vive el parásito, y que invierten la diferencia entre el pH intracelular y el del medio.

1.2.2.2. TRANSPORTE DE Ca^{2+}

El Ca^{2+} tiene un importante papel en el metabolismo celular y es uno de los mecanismos de transducción de señal activando proteínas tales como calmodulina, fosfolipasa C y PKC. Dentro de las células eucarióticas superiores existen estructuras que ayudan a mantener los niveles de Ca^{2+} citosólico alrededor de 100 nM (Carafoli, 1987). La concentración citosólica de Ca^{2+} en promastigotes de *Leishmania donovani* se mantiene entre 73 y 95 nM cuando el calcio extracelular es 0.1 mM (Philosoph y Zilberstein, 1989). En promastigotes de *Leishmania braziliensis* el Ca^{2+} citosólico es de 50 nM cuando los parásitos son mantenidos en un medio libre de calcio (Benaim et al., 1990).

Los sistemas de transporte de Ca^{2+} existentes en promastigotes son los siguientes: uno localizado en la mitocondria y asociado a la respiración, depende del potencial de membrana y es sensible a KCN (Vercesi y Docampo, 1992). En vesículas mitocondriales de *Leishmania braziliensis* aparece un sistema de baja afinidad pero con alta capacidad, por lo que la mitocondria de los promastigotes es capaz de almacenar grandes cantidades de Ca^{2+} como ocurre con otros eucariotas (Benaim et al., 1990).

Un segundo sistema de transporte de Ca^{2+} es el que presenta características semejantes al descrito en el retículo endoplasmático de células de mamífero, ya que es dependiente de ATP, tiene un pH óptimo de 7.1 y alta afinidad (Vercesi y Docampo, 1992).

El tercer sistema se ha localizado en la membrana plasmática. En promastigotes de *Leishmania donovani* existe una ATPasa dependiente de Ca^{2+} con una masa molecular de 215 kDa, formada por dos subunidades de 55 y 57 kDa e inhibida por ortovanadato (Mazumder et al., 1992;

Benaim y Romero, 1990). En consecuencia la homeostasis de calcio citosólico se basa en mecanismos semejantes a los que se encuentran en células eucarióticas superiores.

Aunque la transducción de señales en tripanosomátidos es un campo incipiente, existen evidencias de la participación del Ca^{2+} en la activación de la fosfolipasa C implicada en el ciclo del inositol fosfato en *Trypanosoma cruzi* (Docampo y Pignataro, 1991) y en promastigotes de *Leishmania donovani*; en éstos últimos la adición de inositol-trifosfato, previa permeabilización por digitonina, produce la liberación de Ca^{2+} procedente del retículo endoplasmático (Zilberstein, 1993). Por otro lado, en *Leishmania donovani* se han caracterizado proteínas que por su estructura y función recuerdan a las proteínas G de células de mamífero (Cassel et al., 1991). En *Trypanosoma cruzi* el Ca^{2+} también activa la conversión de la L-arginina a citrulina mediada por la óxido nítrico sintetasa (Paveto et al., 1995).

1.2.2.3. TRANSPORTE DE GLUCOSA

El catabolismo de la glucosa en *Leishmania* tiene lugar dentro de unos orgánulos llamados glucosomas (Oppendoes, 1987). Estos orgánulos contienen la mayoría de las enzimas de la glucolisis, por lo que las moléculas de glucosa deben atravesar dos membranas antes de poder ser metabolizadas. Los estudios del transporte de glucosa en los tripanosomátidos se han centrado principalmente en el transporte a través de la membrana plasmática. Este transporte es un simporte azúcar/ H^+ (Mukkada, 1985). *Leishmania* puede preservar constante el gradiente electroquímico de protones, lo que significa que el parásito es capaz de mantener la energía quimiosmótica necesaria para el transporte de glucosa tanto a pH alcalino como a pH ácido (Zilberstein et al., 1986; Ter Kuile y Oppendoes, 1993).

En promastigotes de *Leishmania donovani* han sido descritas proteínas que muestran una similitud del 42% con proteínas transportadoras de glucosa presentes en eritrocitos humanos (Cairns et al., 1989; Langford et al., 1992). Sin embargo en otros kinetoplastidos, como *Crithidia luciliae*, el transporte de glucosa ocurre vía difusión facilitada, lo que sugiere que este sistema sería el mecanismo primario de obtención de glucosa del medio para este grupo (Knodler et al., 1992).

1.2.2.4. TRANSPORTE DE PROLINA

La prolina es uno de los principales aminoácidos que se encuentran en la hemolinfa de los insectos; en la hemolinfa de la mosca tse-tse se ha estimado una concentración de prolina de 60 mM (Konji et al., 1988).

Los promastigotes de *Leishmania* están adaptados a un ambiente rico en prolina y utilizan este aminoácido como principal fuente de energía; promastigotes de *Leishmania donovani* pueden crecer en un medio con prolina como única fuente de carbono (Ter Kuile y Opperdoes, 1992). Más del 50% de la prolina acumulada por el promastigote es catabolizada a CO₂, otra parte de la prolina es convertida en alanina vía piruvato. Ambos procesos son inhibidos en presencia de glucosa (Krassner y Flory, 1977).

La prolina es acumulada en contra de gradiente de concentración por un sistema de simporte con translocación de protones tanto en promastigotes como en amastigotes (Glaser y Mukkada, 1992), aunque en estos últimos los niveles de acumulación de prolina son inferiores y el pH óptimo de transporte es de 5.5, mientras que en los promastigotes es 7-7.5 (Zilberstein et al., 1989). Promastigotes cultivados a pH ácido disminuyen el transporte de prolina a niveles semejantes a los descritos en amastigotes, recuperando los niveles típicos del promastigotes cuando se cultivan en un medio con pH 6.8-7; consecuentemente, y al contrario del transporte de glucosa, el de prolina es dependiente del pH (Zilberstein y Gepstein, 1993).

La adaptación de promastigotes a crecer en medios ácidos, induce cambios en la expresión de sus genes (Zilberstein y Shapira, 1994); se ha postulado que el transportador de prolina en promastigotes sería distinto al del amastigotes, y su expresión estaría regulada por los cambios de pH del medio. Otra alternativa es la existencia de cambios conformacionales mediados por pH de un mismo transportador que afecte su capacidad de transporte (Zilberstein, 1993).

1.3. SUPERVIVENCIA EN EL INTERIOR DEL HOSPEDADOR

1.3.1. MECANISMOS DE ENTRADA EN LA CÉLULA HOSPEDADORA

Dentro del hospedador vertebrado *Leishmania* es un parásito intracelular obligado de los fagocitos mononucleares, en consecuencia *Leishmania* debe poder entrar en el macrófago y sobrevivir a sus mecanismos microbicidas.

La opsonización del parásito influye tanto en el mecanismo de invasión celular como en la supervivencia de la *Leishmania*. La deposición de componentes específicos del sistema de complemento, reconocidos por los receptores correspondientes de la superficie del macrófago, facilitan la entrada del parásito. Los promastigotes son internalizados en el macrófago mediante varios sistemas de receptores, tales como el receptor CR3 para el componente C3bi del complemento (Talamàs-Rohana et al., 1990), el receptor para la región constante de las inmunoglobulinas, el receptor para productos avanzados de la glicosilación (Mosser et al., 1987), el receptor de la fibronectina (Wyler et al., 1985) y el receptor de manosa-fucosa (Talamàs-Rohana et al., 1990).

Los receptores utilizados por el amastigote no están bien definidos, aunque parece ser que son principalmente el receptor CR3 y el receptor para Fc (Guy y Belosevic, 1993). Los amastigotes son capaces de unirse con alta afinidad a los proteoglicanos de heparan-sulfato de la superficie celular del macrófago (Love et al., 1993).

1.3.2. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Los protozoos parásitos utilizan diversas técnicas para evadirse de la respuesta inmune del hospedador:

a) Reclusión anatómica.- *Leishmania*, como parásito intracelular, está protegido de la respuesta

humoral del hospedador debido a su localización en el interior de la célula; sin embargo es susceptible a la inmunidad celular

b) Evasión de los componentes citotóxicos del suero.- Los parásitos intracelulares son capaces de evitar su destrucción por los componentes del complemento. Esta resistencia está regulada por su diferenciación celular; los promastigotes en fase logarítmica de crecimiento son lisados por los componentes del complemento, mientras que los de fases estacionaria son resistentes a pesar de que activan complemento y unen C3; el proceso y el tipo de unión depende de la especie de *Leishmania* (Puentes et al., 1988).

La supervivencia de *Leishmania* tras la activación de la vía alterna del complemento requiere el bloqueo de las reacciones en cascada; en promastigotes de *Leishmania donovani* ocurre una inhibición rápida de C3b a C3bi, que es liberado por rotura proteolítica posiblemente mediada por gp63 (Etges et al., 1986a). Otro mecanismo de defensa es la formación del complejo C5b-9 no lítico; en promastigotes infectivos la unión de C9 es muy efímera, ya que es liberado rápidamente como C5b-9, mientras que en los no infectivos unen mayor cantidad de C9 que produce la muerte del parásito tras la inserción del complejo de ataque en la membrana (Puentes et al., 1988). Aproximadamente la mitad del componente C3 unido es liberado de la superficie celular del promastigote por rotura proteolítica, posiblemente realizada por la glicoproteína gp 63 (Russell, 1987a).

c) Inhibición de la presentación de antígeno.- Los macrófagos infectados con *Leishmania* tienen reducida su capacidad de presentar antígenos a las células T (Prina et al., 1993). Moléculas del sistema de histocompatibilidad de clase II han sido detectadas en la vacuola parasitófora (Russell et al., 1992) sin embargo, no se ha demostrado la presencia de moléculas de clase I en la vacuola como sucede en infecciones con virus (López et al., 1993).

d) Evasión de los sistemas microbicidas.- El vector juega un papel importante en el establecimiento de la infección primaria ya que la respuesta oxidativa y la presentación de antígeno, inducidas por fagocitosis de parásitos, son inhibidas en presencia de extractos procedentes de glándulas salivares (Theodos et al., 1991).

La invasión de los microorganismos en los fagocitos origina la producción de productos

tóxicos de oxígeno. Una estrategia para evadir este mecanismo defensivo es utilizar receptores silentes no asociados a la activación de la explosión respiratoria oxidativa, tales como CR3 para la entrada del parásito (Mosser y Edelson, 1987).

Otro mecanismo es el bloqueo de la explosión respiratoria por inhibición de la proteína quinasa C por LPG, ya tratado en el punto 1.2.1.3.5. (McNeely y Turco, 1990), así como una fosfatasa ácida que inhibe la explosión respiratoria (Remaley et al., 1985). *Leishmania* también posee una superóxido dismutasa que disminuye los niveles de ion superóxido (Murray, 1981 y 1982). Los GILPs presentes en los amastigotes de *Leishmania major* también disminuyen la respuesta oxidativa del macrófago (Frankenburg et al., 1990) de igual manera que el LPG, aunque las estructuras responsables de dicho efecto sean diferentes, ya que los GILPs carecen de fosfoglicano y el anclaje lipídico a la membrana del LPG responsable *in vitro* de la inhibición de la PKC es distinto en los amastigotes (Frankenburg et al., 1990). Por otro lado, existe una proteína asociada al LPG, llamada proteína-11 de la membrana de los kinetoplastos que presenta en la posición 45 una molécula de N^G-monometilarginina, análogo estructural de la L-arginina e inhibidor de la iNOS (Jardim et al., 1995).

La leishmania puede infectar células deficientes en mecanismos tóxicos, como las células de Langerhans, donde al no haber expresión de la iNOS permite una diseminación más fácil de la infección (Blank et al., 1996).

1.3.2.1. ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

La fagocitosis induce en el macrófago la producción de factores activadores (TNF- α , IL-12 e IL-1), factores estimulantes de fase aguda (IL-6), factores moduladores (IL-10) y factores estimulantes de la hematopoyesis (M-CSF y GM-CSF) (Sher y Coffman, 1992).

De forma resumida, el desarrollo de la enfermedad en ratones se encuentra asociado con la activación del macrófago y su capacidad de producción de NO por la isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa; inhibidores de esta enzima (Li et al., 1992 ; Cunha et al., 1993a; 1993b; Assreuy et al., 1994) o la eliminación de su gen provocan que la infección no pueda ser controlada (Wei et al., 1995). La inducción de iNOS en el macrófago se logra mediante sinergismo de IFN- γ con TNF- α o LPS (O'Donnell y Liew, 1994). macrófagos con la expresión del interferón- γ o de

su receptor inhibida no generan NO aunque se estimule con LPS o con INF- γ (Kamijo et al., 1994; Wang et al., 1994).

La expresión de iNOS viene controlada a nivel transcripcional y de una manera compleja por diversas citoquinas, cuya fuente principal son los linfocitos CD4⁺, sin embargo otras células, como linfocitos CD8 (INF- γ), células NK (INF- γ) o el mismo macrófago también participan. Los subconjuntos de CD4⁺ son antagónicos en relación a la inducción de iNOS; si el ratón desarrolla preferentemente linfocitos Th1, que secretan IL-2 e INF- γ , se produce activación del macrófago y la infección se aborta. En cambio, si el subconjunto dominante es Th2, la infección progresa ya que secretan IL-4 e IL-10, capaces de provocar, respectivamente, inhibición del crecimiento de Th1 y anergia del macrófago frente a citoquinas activadoras (Locksley et al., 1991). La citoquina IL-12 actúa activando las células NK con la consiguiente secreción de INF- γ (Trinchieri, 1995) y favoreciendo el desarrollo temprano de Th1; en las cepas de ratón susceptibles (Balb/c) no se detecta la presencia de IL-12 a las pocas horas de la infección, como ocurre con otros organismos patógenos como *Toxoplasma gondii* y *Listeria monocytogenes* (Reiner et al., 1994). IL-12 y TNF- α aparecen a los 7-10 días post-infección; este retraso en la producción de linfocinas puede ser importante para permitir la transformación de promastigote a amastigote y la supervivencia de este último, ya que la inducción de un subconjunto u otro es establecida en los primeros días de la infección (Reed y Scott, 1993). Sólo después de 48 horas de infección, tanto con promastigotes como con amastigotes, se detecta en linfocitos de bazo, la presencia de IL-1. La producción de TGF- β está aumentada en las lesiones de ratones de cepas susceptibles y se correlaciona con una baja expresión de iNOS (Stenger et al., 1994). La administración de TNF- α recombinante a ratones susceptibles infectados con *Leishmania major* impide el desarrollo de la infección (Titus et al., 1989), y anticuerpos anti-TNF- α exacerban la enfermedad en la cepa de ratones resistentes (De Kossodo et al., 1994).

1.4. CONTROL DE LA LEISHMANIASIS

De acuerdo con el ciclo complejo de la leishmaniasis las medidas para la profilaxis de la misma pueden establecerse a tres niveles: reservorio, vector y paciente

1.4.1. CONTROL DEL RESERVORIO

La mayoría de las especies de *Leishmania* debido a su distribución geográfica tienen como reservorios a animales salvajes. Los reservorios selváticos no son susceptibles de control, a excepción de la destrucción de sus madrigueras. Se ha comprobado que en leishmaniasis zoonóticas, como en el caso de *Leishmania major*, actúan como reservorios los gerbiles (*Rhombomys* sp y *Merines* sp), y en América del Sur los perezosos (*Bradypus* sp y *Choleopus* sp) y tamandúas (*Tamandua* sp). Entre los animales domésticos el perro es el reservorio principal de *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. En las zonas endémicas los perros vagabundos e incontrolados deberían ser eliminados, y los perros domésticos deberían ser examinados y sacrificados los casos positivos, medida que no suele ser aceptada socialmente. El tratamiento de los perros permite la curación clínica, pero no la curación parasitaria por lo que los perros recaen al cabo de los meses de haber finalizado el tratamiento (Alvar, 1988). En la cuenca Mediterránea, además del perro, también actúan como reservorios accidentales el zorro (*Vulpes vulpes*) y el lobo (*Canis lupus*) (Anónimo, 1984).

1.4.2. CONTROL DEL VECTOR

Se han establecido tres modos principales de actuación contra el vector (Vioukov, 1987):

1.4.2.1. CONTROL QUÍMICO

Se basa en la utilización de insecticidas residuales (piretroides), pero en zonas tropicales y subtropicales este sistema no es aplicable, ya que se trata de grandes extensiones y los flebotomos habitan en madrigueras y oquedades que son difícilmente accesibles a los insecticidas. El uso de telas mosquiteras es útil para el periodo nocturno de actividad. El uso de insecticidas conlleva dos graves problemas: aparición de estirpes resistentes a los insecticidas y daños ecológicos incontrolados.

1.4.2.2. CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico de los flebotomos se ha realizado mediante la utilización de parásitos y el empleo de ácaros depredadores de las larvas del flebotomo. Los principales problemas en este tipo de controles son: 1) Baja prevalencia de parasitismo en los flebotomos, que no llega al 2%. 2) Obtención de un cultivo masivo de parásitos o depredadores, así como el desarrollo de métodos para lograr la infección masiva o la introducción de depredadores en las zonas de alimentación y cría del flebotomo. 3) Selección de poblaciones resistentes por el empleo de parásitos. 4) Efectos negativos sobre otros individuos que no sean de la población a controlar.

1.4.2.3. CONTROL GENÉTICO

Se utilizan machos del vector que han sido alterados genéticamente en el laboratorio. El resultado es la obtención de individuos estériles o cuya progenie sea inviable. Un nuevo método en estudio es la introducción de flebotomos incapaces de ser parasitados por *Leishmania* (Wu y Tesh, 1990).

1.4.3. CONTROL A NIVEL DE PACIENTE

Las dos formas de prevención en el hombre se basan en el tratamiento quimioterapéutico o en el desarrollo de una vacuna.

1.4.3.1. VACUNACIÓN

En la antigüedad, la utilización de parásitos vivos para la vacunación fue empleada en el Oriente Próximo; variantes de este método como el empleo de parásitos irradiados, de bajas dosis de parásitos virulentos (en Irak e Irán) o de formas avirulentas han sido utilizadas hasta nuestros días. Este tipo de vacunación sólo produce efectos significativos en los casos producidos por *Leishmania tropica*, la más benigna de las leishmaniasis, con elevada proporción de autocuración (Gunders, 1987).

La utilización de antígenos purificados para vacunación se ha restringido a componentes mayoritarios del promastigote, tales como el lipídofosfoglicano (LPG) y las glicoproteínas gp63 y gp46, aunque otros antígenos del amastigote están siendo ensayados actualmente (Mougneau et al., 1995; Campos-Neto et al., 1995). En la vacunación contra la leishmaniasis es preciso considerar otros parámetros además del antígeno, como el adyuvante y la vía de inoculación empleada, ya que se pueden producir efectos adversos. En determinados casos y empleando gp63, la vía subcutánea cursa con exacerbación de la enfermedad, mientras que la vía intravenosa o intraperitoneal producen efectos protectores (Russell, 1987b). Las nuevas generaciones de vacunas se basan en la producción sintética de determinados fragmentos de la secuencia de gp63 (Jardim et al., 1990; Yang et al., 1991), y en la expresión del gen del antígeno protector en patógenos atenuados. Esta técnica ha sido aplicada con gp63 en *Salmonella typhimurium* (Yang et al., 1990; Xu et al., 1995) y gp46 en el virus *Vaccinia* atenuado (McMahon-Pratt et al., 1993). También ha sido posible la obtención de protección parcial en ratones frente a *Leishmania major*, mediante la inyección intramuscular de plásmidos que contienen el gen de gp63 (Xu y Liew, 1995).

1.4.3.2. TRATAMIENTO

1.4.3.2.1. Antimoniales

Los medicamentos más empleados actualmente en el tratamiento contra la leishmaniasis son complejos orgánicos de antimoniales pentavalentes. Las dos formas principales de los mismos son el Glucantime® (antimoniato de meglumina) y Pentostam® (estibogluconato de sodio). El blanco terapéutico de los mismos no es aún conocido aunque en experimentos realizados *in vitro* con *Leishmania mexicana*, se produce una inhibición de la glucólisis y de la oxidación de ácidos grasos (Berman et al., 1989), y por microscopía electrónica en promastigotes tratados se observa alteración de la membrana mitocondrial (Langreth et al., 1983).

Son especialmente efectivos en la leishmaniasis visceral (Olliaro y Bryceson, 1993). No presentan una seguridad de curación total, con un porcentaje significativo de recidivas (Sáenz et al., 1991).

Los antimoniales pentavalentes presentan una serie de efectos secundarios que, dependiendo del estado general del paciente y de las dosis del fármaco, pueden llegar a ser realmente graves. Se han descrito daño renal por acumulación de metabolitos antimoniales, anorexia (Herwaldt y Berman, 1992), dolores de cabeza y de articulaciones, daño hepático por alteración de la funcionalidad de las enzimas hepáticas (Sáenz et al., 1991); arritmias (Chulay et al., 1985) y otras graves lesiones cardíacas que en algunos casos han ocasionado la muerte del paciente (Thakur, 1986).

Además de los efectos secundarios de estos fármacos en los pacientes hay otro motivo para la búsqueda continua de nuevas drogas y es la aparición de cepas resistentes. Datos experimentales sugieren que los parásitos resistentes a los compuestos antimoniales surgen como resultado de una exposición discontinua a la droga o por una dosificación inadecuada. Estas situaciones suceden en países pobres y con baja infraestructura sanitaria, como India y Sudán, donde la transmisión es muy rápida favoreciendo la dispersión de las cepas resistentes (Grogl et al., 1989). En los últimos años la resistencia al fármaco se está acentuando en los casos de leishmaniasis visceral y mucocutánea (Thakur et al., 1991).

1.4.3.2.2. Pentamidina

Se ha usado como tratamiento alternativo en aquellos casos resistentes a los antimoniales pentavalentes; además de no ser sinérgico con éstos (Bryceson, 1987), provoca más efectos secundarios y de mayor gravedad como hipotensión, hipoglucemia, diabetes, nefrotoxicidad etc. (Olliaro y Bryceson, 1993). El modo de acción no se conoce aunque al microscopio electrónico se observa un hinchamiento de la mitocondria y fragmentación del DNA del kinetoplasto (Langreth et al., 1983).

1.4.3.2.3. Ketoconazol

El ergosterol constituye el esteroles más importante de los tripanosomátidos. Uno de los inhibidores de la síntesis del ergosterol más conocido es el ketoconazol, un derivado del imidazol que es utilizado como una droga antifúngica. El ketoconazol actúa sobre *Leishmania* inhibiendo al citocromo P-450 dependiente de la desmetilación del lanosterol (Berman et al., 1984). La citotoxicidad se atribuye a alteraciones de las propiedades de la membrana como consecuencia de los cambios en la composición de esteroides y de la acumulación de intermediarios tóxicos (Vanden-Bossche, 1985).

El tratamiento *in vitro* de macrófagos infectados muestra una condensación del citoplasma del parásito, así como un aumento en número y tamaño de vacuolas lisosomales del macrófago (Langreth et al., 1983).

1.4.3.2.4. Anfotericina

Es un antibiótico poliélico utilizado como antifúngico, que actúa sobre la membrana plasmática formando poros por los que se produce pérdida de iones y metabolitos. Presenta mayor afinidad por el ergosterol, presente en la membrana de *Leishmania* y de hongos, que por el colesterol, principal componente de la membrana de las células de mamífero (Ramos et al., 1994). Promastigotes transformados por choque térmico en formas semejantes a amastigotes son más sensibles al efecto de la anfotericina, aunque la relación ergosterol/fosfolípidos disminuye cuatro veces después del calentamiento (Ramos et al., 1990).

Para evitar los posibles efectos secundarios y disminuir la cantidad administrada en cada dosis se esta empleando la anfotericina encapsulada en liposomas (Davidson et al., 1991).

1.4.3.2.5. Alopurinol

Las células de mamífero, levaduras y bacterias presentan una ruta "de novo" para la síntesis de nucleótidos de purina. Sin embargo, endoparásitos como *Leishmania* carecen de la capacidad de síntesis de bases púricas (Hammonod y Gutteridge, 1984), por lo que han desarrollado una serie de enzimas específicas implicadas en las rutas de recuperación de las bases púricas que difieren considerablemente de los correspondientes sistemas en humanos, principalmente en especificidad de sustrato y susceptibilidad frente a determinados inhibidores.

El alopurinol es un fármaco selectivo, análogo de la hipoxantina que actúa como inhibidor de la xantina oxidasa, con una alta capacidad leishmanicida (Martínez y Marr, 1992).

1.4.3.2.6. DFMO (difluormetilornitina)

Diaminas como putrescina y espermidina se sintetizan en mayor nivel en promastigotes de fase exponencial, y los niveles de estas poliaminas se encuentran incrementados en el hígado y bazo de hámster infectados con *Leishmania donovani*. El tratamiento de estos hámster con DFMO disminuye la carga parasitaria y los niveles de poliaminas. DFMO actúa inhibiendo la ornitina descarboxilasa, enzima implicada en las primeras fases de la ruta biosintética de las poliaminas, lo que produce alteraciones en las concentraciones intracelulares de estas diaminas, con el consiguiente efecto citotóxico e inhibitorio del crecimiento celular (Mukhopadhyay y Madhubala, 1993). Por otro lado, los *Trypanosomatidae* tienen una coenzima, la tripanotona, formada por la condensación de glutatión y espermidina, que actúa como cofactor en el mecanismo de acción de determinadas enzimas como la glutatión reductasa, que interviene en el mecanismo redox del parásito (Walsh et al., 1991).

1.4.3.2.7. Inhibidores de la formación y función de los microtúbulos

Los microtúbulos están formados por subunidades α y β de tubulina, la proteína más abundante

de *Leishmania*, siendo la unidad α muy variable de unos organismos a otros. Además de la tubulina existen una serie de proteínas asociadas a los microtúbulos que lo estabilizan y los unen a la membrana plasmática, formando la disposición típica de los microtúbulos subpeliculares (Seebeck et al., 1990).

Se han examinado una serie de fármacos antimicrotubulares de eucariotas superiores que no han dado resultados satisfactorios en *Leishmania*, como la colchicina, maitansina, vinblastina o vincristina (Quinlan et al., 1981), ya por ser inactivos, como colchicina, o porque las dosis requeridas no pueden ser aplicadas en tratamientos clínicos por su citotoxicidad.

Por comparación de secuencias, el gen de la tubulina de *Leishmania* presenta una homología mayor con plantas que con los animales, y en efecto, herbicidas que inhiben selectivamente microtúbulos de plantas también son activos frente a *Leishmania* sin afectar a las células de mamífero (Chan y Fong, 1994).

1.4.3.2.8. Inmunoterapia

La inmunoterapia se está utilizando conjuntamente con la quimioterapia en un intento de obtener mejores índices de curación. La combinación de IFN- γ con compuestos antimoniales, en leishmaniasis visceral, ha permitido tratamientos más leves y de menor duración (Sundar et al., 1995). En pacientes tratados con este método se observó un incremento en el número de CD4+ y CD8+, así como de los niveles de TNF- α (Reiner et al., 1990). Para paliar los posibles efectos secundarios debidos a las altas dosis de IFN- γ requeridas, se ha ensayado su administración en liposomas (Hockertz et al., 1991). Por otra parte, la reversión de Th1 a Th2, por IL-12 se logra sólo tras la reducción de la carga parasitaria por tratamiento con antimoniales (Nabors et al., 1995).

1.4.3.2.9. Otros posibles agentes terapéuticos

Las drogas mencionadas anteriormente presentan problemas a la hora de su utilización por diferentes razones; en primer lugar la carencia en muchos casos de un diagnóstico precoz, con el consiguiente aumento de la carga parasitaria y extensión de la enfermedad dificultan la curación de la misma. Segundo, la tolerancia a los fármacos por el estado físico del paciente, tales como la desnutrición, disminuyen la eficacia del tratamiento. Tercero, los efectos secundarios inherentes

a muchos de los anteriores fármacos, especialmente de los antimoniales pentavalentes y, finalmente, la aparición de poblaciones de *Leishmania* resistentes a los medicamentos.

La falta de un fármaco realmente efectivo contra la leishmaniasis ha hecho que haya un replanteamiento sobre los pasos a seguir para la búsqueda de nuevos compuestos. Dentro de esta nueva estrategia la O.M.S recomienda el desarrollo de nuevos medicamentos en los siguientes sistemas: la biosíntesis de esteroides, la timidilato sintetasa/dihidrofolato reductasa, los inhibidores de las DNA polimerasas y los microtúbulos (Anónimo, 1990). Otra línea de investigación seguida últimamente es el estudio de la medicina tradicional usada en zonas endémicas de leishmaniasis. Esta medicina está basada en el empleo de plantas; actualmente se han aislado y caracterizado una serie de principios activos leishmanicidas a partir de estas plantas (Iwu et al., 1994).

1.4.3.3. RESISTENCIA A FÁRMACOS

Uno de los graves problemas a los que se enfrenta el tratamiento de las enfermedades parasitarias es la aparición de patógenos resistentes al tratamiento por una selección natural de individuos que han desarrollado resistencia frente a los mismos (Borst y Ouellette, 1995).

Los parásitos pueden presentar uno o varios de los siguientes sistemas de resistencia:

a) Amplificación génica.- Se produce una amplificación de los genes implicados en la síntesis de proteínas blanco de acción del fármaco. El simple incremento en la producción de una enzima, que es la diana de una droga antiparasitaria, es suficiente para conferir resistencia al fármaco (Beverley, 1991).

b) Cambios estructurales y/o funcionales en proteínas.- En cepas de *Leishmania donovani* y *Leishmania mexicana amazonensis* resistentes a compuestos antimoniales, que actúan sobre las enzimas glucolíticas, se han observado cambios estructurales de la fosfofructoquinasa que impiden la unión del fármaco y por tanto su acción (Berman et al., 1989).

c) Alteración del transporte de fármacos.- Clones de *Leishmania major* resistentes a metotrexato presentan diferencias en el transporte del fármaco y menor acúmulo del mismo en el

citoplasma que las cepas sensibles, posiblemente por alteración de la proteína implicada en el transporte o por el número de transportadores (Kaur et al., 1988).

d) Multirresistencia a fármacos.- Es un mecanismo de resistencia similar al descrito en células tumorales multirresistentes, donde existe un gen de multirresistencia a fármacos (o gen MDR) (Van der Bliek y Borst, 1989). En *Leishmania* se produce una amplificación de un gen homólogo al MDR. Este gen codifica una glicoproteína de membrana de alto peso molecular (150-180 kDa) denominada glicoproteína P (Endicott y Ling, 1989), implicada en el eflujo de fármacos en un proceso dependiente de energía por hidrólisis de ATP (Sánchez et al., 1994). Esta proteína también confiere resistencia cruzada a fármacos estructural y funcionalmente diferentes al fármaco frente al cual se ha obtenido la resistencia .

1.5. PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS

Los insectos han tenido un gran éxito evolutivo; aproximadamente el 85% de las especies conocidas del Reino animal pertenecen a la Clase de los insectos, entre otras razones los insectos han sido capaces de desarrollar un sistema defensivo efectivo contra un amplio espectro de patógenos y lo suficientemente flexible para adaptarse a cambios en el nicho ecológico (Ratcliffe et al., 1985; Dunn, 1986; Boman y Hultmark, 1987).

El sistema inmune de los insectos consta de respuesta celular y respuesta humoral. La respuesta celular está representada por los hemocitos que poseen capacidad fagocítica (Gupta, 1979; Ratcliffe, 1985). En la respuesta inmune, además de los sistemas de profenoloxidasa y de coagulación de la hemolinfa, se producen una serie de moléculas con efectos bactericidas y bacteriostáticos con baja especificidad de reconocimiento de patógenos, y que comprenden la lisozima y los péptidos antibacterianos. Aunque su funcionalidad es desconocida recientemente se ha aislado de la hemolinfa de los insectos una proteína, la hemolina, con homología a la superfamilia de las inmunoglobulinas, pero carente del repertorio que las caracteriza en animales superiores (Sun et al., 1990).

En 1981 se caracterizó, a partir de la hemolinfa de la pupa de una polilla gigante (*Hyalophora cecropia*), un péptido que producía lisis de bacterias en cultivo (Steiner et al., 1981). Al principio se consideró a los péptidos antibacterianos como exclusivos de insectos, pero se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal. Dos años después en 1983, se identificaron las defensinas en macrófagos alveolares de conejo (Selsted et al., 1983). En 1985 se aisló el péptido PGLa de la secreción mucosa de la piel de *Xenopus* aunque su actividad bactericida no fue totalmente probada (Andreu et al., 1985b). Zasloff (1987) encontró un grupo de péptidos antibacterianos, las magaininas, en las secreciones cutáneas de las ranas. Poco tiempo después se encontró la bactenecina en neutrófilos bovinos (Romeo et al., 1988). Péptidos con una cierta similitud a las defensinas de mamífero se encontraron en dos géneros de insectos, en *Sarcophaga* y en *Phormia* (Matsuyama y Natori, 1988; Lambert et al., 1989); y la cecropina P1

aislada del intestino del cerdo semejante a la cecropina de insectos (Lee et al., 1989). Al mismo tiempo se halló, en las abejas, los primeros péptidos antibacterianos ricos en prolina (Casteels et al., 1989; 1990), péptidos de este tipo se han aislado posteriormente en neutrófilos bovinos (Frank et al., 1990) y en el intestino delgado del cerdo (Agerberth et al., 1991). Los péptidos antibacterianos están distribuidos por toda la escala evolutiva, habiéndose aislado también en moluscos (Hubert et al., 1996), crustáceos (Shiff, 1994) y peces (Lazarovici et al., 1986). Todas las moléculas antibacterianas caracterizadas han resultado ser péptidos o polipéptidos, excepto la escualamina, aislada de tiburón, que tiene una estructura esteroidea (Moore et al., 1993).

Los péptidos antibacterianos se han clasificado atendiendo a su similitud de secuencia de aminoácidos y de estructura (tabla 2).

TABLA 2.- CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS

Nombre	kD	Diana y modo de acción	Estructura	Refs.
Cecropinas				
Cecropinas de insecto y de mamífero (PI)	4	Gram- >> Gram+. Forman canales voltaje-dependientes selectivos para aniones en membranas artificiales	Extremo C-terminal amidado 2 α -hélices separadas por una secuencia bisagra o forman una hélice continua	Boman, 1994
Defensinas				
Defensinas de insecto	4-5	Gram+. Forman canales dependientes de voltaje en membrana plasmática de <i>Micrococcus luteus</i>	3 puentes disulfuro intramoleculares. Presenta una α -hélice en la zona central y el extremo C-terminal forma una hoja β	Hoffmann y Hetru, 1992
Defensinas de mamífero	4	Gram+, Gram- y virus. Citotóxico, antifúngico. Forma canales en bicapas lipídicas planas	Láminas β estabilizadas por 3 puentes disulfuro intramoleculares	Lehrer et al., 1993

Péptidos ricos en prolina				
Apidaecinas	2	Gram-. Bacteriostáticos		Casteels et al., 1989
Abaecinas	4	Gram+, Gram-. Bactericidas		Casteels et al., 1990
Drosocinas	25	Gram-. Bactericidas	O-glicosilado	Bulet et al., 1993
Bactenecinas	15	Gram+, Gram-. Bactericidas, activos en membranas citoplasmáticas	1 puente disulfuro, estructura extendida formando un giro γ	Romeo et al., 1988
Bac5 y Bac7	5-7	Gram- y virus. Permeabilizan tanto la membrana interna como la externa e inhiben la cadena respiratoria	Estructura extendida	Frank et al., 1990
PR 39	47	Gram+ y Gram-	Ricos en arginina y prolina	Agerberth et al., 1991
Péptidos ricos en glicina				
Atacinas	20	Gram-. Bacteriostático, activo en membrana externa		Hultmark et al., 1983
Sarcotoxinas II	24	Gram-. Bactericida	Extremo C-terminal amidado	Ando et al., 1987
Coleopterinas	8	Gram-. Bactericida		Bulet et al., 1992
Diptericinas	9	Gram-. Bactericida	C-terminal amidado y O-glicosilado	Dimarcq et al., 1988
Himenopterina	10	Gram+, Gram-. Bactericida		Casteels et al., 1993
Péptidos de anfibios				
Magainina 1 y 2	2	Hongos, protozoos y células tumorales. Gram+ y Gram-	α -hélice anfipática	Zasloff, 1994
PGLa	2	Hongos y protozoos. Gram+ y Gram-	Extremo carboxilo amidado. α -hélice anfipática	Maloy y Kari, 1995
XPF	25	Gram+ y Gram-		Maloy y Kari, 1995

Bombinina y bombinina H	2-3	Hemolítico. Gram+ y Gram-	Poseen D-aloisoleucina	Barra y Simmaco, 1995
Dermaseptina Adenorregulina	35	Hongos, levaduras y protozoos. Gram+ y Gram- Bacteriostático y bactericida	Catiónico. α -hélice anfipática	Mor y Nicolas, 1994
Caerina Caeridina	1- 2.5	Bactericida y antiviral		Barra y Simmaco, 1995
Brevininas Ranalexina Gaugerina 2, 4 y 6 Esculentinas	2- 3.5	Gram+ y Gram-	Puente disulfuro en el extremo carboxilo formando un anillo de 7 aminoácidos	Barra y Simmaco, 1995. Clark et al., 1994

1.5.1. CECROPINAS

En 1981 Boman y colaboradores (Steiner et al., 1981) aislaban y caracterizaban el primer péptido antibacteriano de la hemolinfa de la larva del lepidóptero *Hyalophora cecropia*. Este péptido se inducía por inyección de bacterias o por la producción de una lesión en el tegumento; y se caracteriza por:

- a) Los niveles basales de péptido eran prácticamente inexistentes en la larva antes de la inducción.
- b) La actividad antibacteriana aparece a las pocas horas de la infección o de la producción de la herida, alcanzando su valor máximo a las 24 horas y se mantiene durante 48 horas para posteriormente ir decreciendo.

Se han encontrado péptidos semejantes a la cecropina en seis géneros distintos de los órdenes *Lepidoptera* y *Diptera*. En *Drosophila* la cecropina A se sintetiza en el cuerpo graso de

la larva y del adulto y en menor proporción en hemocitos y células tegumentarias, mientras que durante la metamorfosis de la pupa se expresa principalmente cecropina B y C en los hemocitos y en el tracto digestivo anterior (Samakovlis et al., 1990; Tryselius et al., 1992).

1.5.1.1. ESTRUCTURA DE LAS CECROPINAS

Todas las cecropinas presentan una alta similitud en su secuencia de aminoácidos y se caracterizan por ser péptidos catiónicos (pI= 8.2-9.6) de 35-39 residuos y porque su extremo carboxilo terminal se encuentra amidado.

Las cecropinas en solución acuosa no aparecen estructuradas (Steiner, 1982). Estudios de resonancia magnética nuclear en hexafluoroisopropanol al 15% muestran que el péptido adopta una estructura de hélice-bisagra-hélice, semejante a la descrita en melitina (Terwilliger et al., 1982), las dos hélices forman un ángulo de 70°-100°. La primera hélice está formada por los residuos del 5 al 21 y es una α -hélice anfipática con una carga neta positiva (+6 en la cecropina A), mientras que la segunda hélice esta formada por los residuos del 24 al 37, es hidrofóbica y está menos cargada (+1 en la cecropina A y D, y neutra en la cecropina B) (Holak et al., 1988; Durell et al., 1992).

Las cecropinas son sintetizadas como prepropéptidos de 62-64 residuos de los cuales los 24-26 aminoácidos del extremo N-terminal no se encuentran en el péptido maduro. El péptido señal esta formado por los 22 primeros aminoácidos del prepropéptido. Una vez eliminado el péptido señal queda un dipéptido de prolina-alanina que es eliminado por una dipeptidilaminopeptidasa; esta aminopeptidasa ha sido aislada en la hemolinfa de *H. cecropia* (Boman et al., 1989a). En el último paso para la obtención del péptido maduro se produce a partir de la formación del grupo amida en el extremo C-terminal por descarboxilación oxidativa de un residuo de glicina contiguo (Boman et al., 1991).

Basándose en los estudios de la estructura secundaria de la cecropina se han sintetizado una serie de análogos de cecropina en los que se han introducido modificaciones para establecer qué residuos son importantes para la actividad. La delección de 1-3 aminoácidos del extremo amino produce una disminución de la actividad. Asimismo, la presencia de un aminoácido aromático

como el triptófano, en posición 2 es importante (Andreu et al., 1985a). La anfipaticidad de la α -hélice del extremo amino es esencial para la acción lítica (Steiner et al., 1988).

1.5.1.2. REGULACIÓN GÉNICA DE LAS CECROPINAS

El máximo nivel de síntesis de las cecropinas se produce en las 24 horas posteriores de la producción de una herida o de la inyección de bacterias (vivas o muertas por calor) en la larva de *Hyalophora* o de *Phormia* (Lambert et al., 1989). La administración de inhibidores de la síntesis de RNA y de proteínas han demostrado que la regulación génica de estos péptidos se produce a nivel transcripcional.

El gen de la cecropina B fue el primero en ser secuenciado (Xanthopoulos et al., 1988). Este gen tiene un tamaño de 514 pb conteniendo dos exones y un intrón. Por delante del extremo 5' hay dos cajas de lectura CAAT y TATA así como un motivo para "capping" específico de insectos. El extremo 3' contiene dos señales de poliadenilación.

1.5.1.2.1. Motivos κ B en el promotor de genes de cecropina

Actualmente se han clonado los genes que codifican las distintas cecropinas de *Hyalophora*, *Sarcophaga* y *Drosophila* (Xanthopoulos et al., 1988; Kanai y Natori, 1989; Kylsten et al., 1990; Gudmundsson et al., 1991; Tryselius et al., 1992). En los promotores de estos genes se han encontrado unos elementos reguladores de 10-11 pb cuya secuencia presenta una alta similitud con la secuencia del sitio de unión del factor de transcripción de mamíferos (NF- κ B) (Sun et al., 1991a). El motivo κ B de las regiones promotoras de los genes de las cecropinas y de las dipterocinas es parte de una gran región de transcripción no constitutiva e inducible por LPS y ésteres de forbol, situación semejante a los genes de attacina y de lisozima en *H. cecropia* (Sun et al., 1991b). Un fragmento de 200 pb del promotor del gen de la lisozima que contienen el sitio de unión κ B, une un factor nuclear aislado de pupas de *H. cecropia* inmunizadas, ausente en las pupas controles. Sun y Faye en 1992 purificaron una proteína (CIF) cuya expresión es inducible por infecciones bacterianas, por LPS y por ésteres de forbol y que se une a DNA por la secuencia GGGAN TYYCY, específica de *H. cecropia*, y es muy similar a la secuencia del sitio de unión

κ B. Tanto NF- κ B como CIF compiten por los mismos motivos y presentan reacción cruzada con anticuerpos. En *Drosophila* y en *Sarcophaga* la inducción de proteínas inmunes está controlada por factores de transcripción semejantes a los encontrados en *Hyalophora* y que son específicos de motivos κ B (Kappler et al., 1993).

1.5.2. MODELOS DE PERMEABILIDAD POR PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN MEMBRANAS

Las cecropinas son agentes que provocan permeabilización tanto de membranas modelo como biológicas; las cecropinas son capaces de permeabilizar liposomas (Steiner et al., 1988) y formar canales transitorios selectivos para aniones en bicapas lipídicas (Christensen et al., 1988). Estudios basados en la relación estructura-actividad y en efectividad antibiótica-capacidad de permeabilización muestran que la mayoría de los péptidos antibacterianos actúan de forma similar (Steiner et al., 1988; Wade et al., 1990; Mor et al., 1991; Cociancich et al., 1993; Matsuzaki et al., 1995a; 1995b); si bien existen otros péptidos, como la atacina, PR39 y apiadecinas que no actúan en alterando la permeabilidad de la membrana, sino que interfieren en la transcripción de los genes que codifican las proteínas de la membrana externa de *E. coli* (Carlsson et al., 1991), la síntesis de proteínas (Boman et al., 1993) y un mecanismo no determinado (Casteels y Tempst, 1994).

La primera interacción entre el péptido y la membrana es de naturaleza electrostática entre las cargas positivas del péptido y los componentes ácidos de la membrana (Saberwal y Nagaraj, 1994). Tanto las cecropinas como derivados de cecropina-melitina presentan una estructura no organizada cuando se encuentran en una solución acuosa, pero en contacto con la membrana adoptan una estructura en α -hélice (Sipos et al., 1992; Holak et al., 1988). El péptido en la membrana puede adoptar distintas orientaciones en relación al plano de la membrana que favorezcan una energía libre mínima, así la parte polar se situará en un ambiente lo más hidrofílico posible, ya sea interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana, con el solvente que le rodee o con otras moléculas de péptido formando una estructura macromolecular. La parte hidrofóbica puede, a su vez, interaccionar con la de otra molécula de

péptido o penetrar en la matriz hidrofóbica de la bicapa (Durell et al., 1992; Wimley et al., 1994), lo que dependerá de la fluidez de la membrana y por tanto de la temperatura (Nakajima et al., 1987; Matsuzaki et al., 1991), de la longitud y del grado de insaturación de las cadenas alquilo (Subbarao y MacDonald, 1994), y del potencial de membrana (Christensen et al., 1988).

La cecropina debe penetrar a través de la membrana externa de las bacterias Gram -, donde la difusión de compuestos está muy restringida al carecer de glicerolfosfolípidos impidiendo el paso de moléculas hidrofóbicas, y las hidrofílicas únicamente pueden realizarlo por las porinas existentes (Nikaido y Vaara, 1985). La capa de la membrana externa que está en contacto con el exterior está constituida prácticamente por lipopolisacárido; la acción del péptido requeriría la desagregación de la membrana externa por unión al LPS catiónico en el denominado “paso autopromovido”, alcanzando la membrana interna, donde actuaría como un detergente catiónico (Vaara y Vaara, 1994).

El enantiómero D de la cecropina, que presenta el mismo comportamiento y estructura que la L-cecropina, ha permitido establecer que la acción de la cecropina actúa sin la mediación de ningún tipo de receptor quiral o enzimático (Wade et al., 1990) a semejanza de las magaininas (Besalle et al., 1990).

Una vez unido el péptido a la membrana se han propuestos varios mecanismos para explicar el aumento de permeabilidad, la mayoría de estos estudios se han realizado sobre membranas modelo, sin que pueda establecerse una buena correlación con los mecanismos que ocurren en una célula (Higashijima et al., 1988, 1990; Díaz-Achirica et al., 1994; Tisch et al., 1995).

1.5.2.1. MODELO DE PORO TIPO DUELAS DE BARRIL

Este modelo se ha propuesto para explicar la permeabilidad producida en membranas planas, por la cecropina (Christesen et al., 1988) y péptidos tipo magainina (Duchlohier et al., 1989). Las moléculas de péptido se dispondrían perpendicularmente al plano de la membrana, insertándose en ella y formando un poro que abarcaría toda la anchura de la membrana. Una longitud aproximada de 20 residuos es necesaria para formar una α -hélice capaz de atravesar la bicapa y

por lo tanto formar el poro (Lear et al., 1988). Cuando el péptido no tiene una longitud suficiente, como ocurre con ciertos análogos de cecropina-melitina, activos con tan sólo 15 residuos (Andreu et al., 1992), se puede producir la unión de varias moléculas entre el extremo carboxilo de una y el extremo amino de otra para alcanzar la longitud necesaria (Steiner et al., 1988; Anzai et al., 1991). Otra solución sería la adopción de una estructura en hélice alargada o hélice 3_{10} (Andreu et al., 1992).

Sea como fuere que se dispongan las moléculas de péptido en la luz del poro quedarían los residuos cargados positivamente, lo que permite el paso de iones. Existe una variación sobre este modelo en la cual los monómeros de péptido se agregarían formando un complejo previo a su unión a la membrana (Urrutia et al., 1989). La relación de conductividad $\text{Cl}^-:\text{Na}^+$ en los canales es de 2 a 1 (Christensen et al., 1988).

En péptidos como la cecropina que tienen una secuencia bisagra Gly-Pro se necesita un potencial de membrana para ayudar a la translocación de la región polar de péptido en la zona hidrofóbica de la bicapa (Christensen et al., 1988). Los cambios conformacionales necesarios para la formación del poro vienen favorecidos por la rotación de las dos hélices alfa anfipáticas alrededor de la zona bisagra, pero están influenciados por la carga de la bicapa lipídica así como por su fluidez (Gazit et al., 1994). En cambio en la cecropina P1 o híbridos cecropina-melitina que carecen de secuencia bisagra (Wade et al., 1990) la formación de canales es independiente de la existencia o no de un potencial de membrana (Gazit et al., 1994).

La acción lítica de la cecropina sobre las bacterias se realiza en la membrana plasmática, con pérdida de K^+ y disminución drástica de los niveles de ATP intracelular (Okada y Natori, 1984).

1.5.2.2. MODELO DE ALFOMBRA

Este modelo se ha propuesto para explicar una serie de datos experimentales que no podían responder a la formación de poros discretos. Estos hechos eran:

- a) La alta estequiometría de unión de péptido necesaria para que se produzca permeabilidad (Steiner et al., 1988; Gazit et al., 1995).

- b) Con numerosos péptidos no es necesario que exista potencial de membrana para que se produzca permeabilidad (Steiner et al., 1988; Díaz-Achirica et al., 1994; Mancheño et al., 1996).
- c) En determinados casos se produce permeabilidad a solutos de alto peso molecular (Mancheño et al., 1996), y moléculas no cargadas (Díaz-Achirica et al., 1994).
- d) Como fue mencionado en el modelo anterior hay péptidos cuya longitud no permite formar una α -hélice para atravesar la bicapa (Andreu et al., 1992; Mor et al., 1994).
- e) Datos físico-químicos sobre orientación de péptido (Shai, 1995).

En este modelo los péptidos adoptarían una disposición horizontal respecto a la membrana, cubriendo la máxima superficie. La interacción con los fosfolípidos originaría la desorganización de los mismos permitiendo la salida de solutos internos a través de la membrana.

1.5.2.3. FORMACIÓN DE POROS A ALTA CONCENTRACIÓN DEL PÉPTIDO

Este mecanismo sería una solución intermedia entre los dos modelos propuestos anteriormente. Después de la saturación toda la superficie de la membrana la moléculas de péptido se dispondrían en un plano perpendicular a la membrana, de esta manera se disminuye la tensión provocada por los péptidos unidos y se formarían poros discretos responsables de la permeabilidad de la membrana y de los cambios en la intensidad de corriente observados. Es muy posible que ambos mecanismos, la formación de poros y la alteración de membrana por la disposición normal del péptido en la cara externa coexistan tanto en modelos de membranas o liposomas como en modelos con distintos tipos de células. Estudios con melitina han mostrado que a baja concentración se forman poros dependientes de potencial; según se aumenta la concentración aparecen discontinuidades en la membrana hasta llegar a la destrucción total de la misma (Dempsey, 1991).

1.5.3. MELITINA

Melitina es el componente mayoritario del veneno de la abeja melífera europea (*Apis mellifera*). Es un péptido de 26 aminoácidos, cuya carga neta es de +6, con una alta actividad citotóxica inespecífica que no requiere receptor (DeGrado et al., 1982). Comparando la estructura de la melitina con la molécula de la cecropina se observa que la polaridad de la secuencia de aminoácidos es opuesta a la de la cecropina, con una región N-terminal hidrofóbica y un extremo carboxiterminal básico, donde reside la actividad citolítica (Habermann, 1972; Blondelle et al., 1993).

La melitina en solución acuosa y a baja concentración se encuentra en forma de monómero con poca estructuración. A alta concentración de péptido y alta fuerza iónica la melitina agrega formando tetrámeros, donde la molécula de melitina adopta la estructura de hélice-bisagra-hélice. La bisagra comprende los aminoácidos 11-15 (con una prolina en posición 14) y los ejes de ambas hélices forman un ángulo de 120° (Dempsey, 1990). La hélice es anfipática y en el tetrámero las hélices están situadas de manera antiparalela con los residuos hidrofóbicos en contacto (Bazzo et al., 1988).

La melitina se une rápidamente a la membrana de los eritrocitos; una concentración de 1 µg/ml es suficiente para producir la lisis del glóbulo rojo. La unión a la membrana se realiza en forma de monómeros (Hermetter y Lakowicz, 1986) y la formación de tetrámeros en solución acuosa, por ejemplo inducida por fosfato 0.5 M, inhibe la hemólisis (Dempsey, 1990). La interacción de la melitina con la membrana depende de la composición de lípidos de la bicapa, de la concentración de péptido, del pH de la solución, de la presencia de potencial de membrana y del grado de hidratación de la membrana (Dempsey, 1990).

En modelos de membranas planas la melitina induce cambios en la conductancia de la bicapa con un aumento de la permeabilidad a aniones, superior a permeabilidad a cationes (Na⁺ y K⁺), posiblemente debido a la atracción electrostática del segmento catiónico del extremo C terminal sobre los mismos (Tosteson y Tosteson, 1981).

En interacción de la melitina con la membrana el mecanismo de acción propuesto sería dependiente de la concentración; en un primer paso se formarían canales dependientes de voltaje, a continuación se produciría la liberación de moléculas de alto peso molecular, para terminar con

una solubilización de la membrana con la formación de micelas mixtas melitina-membrana similar a un detergente (Dempsey, 1990).

Además de su acción hemolítica la melitina tiene otros efectos biológicos sobre otros tipos celulares: es mitogénica en hipocotiledones de calabacín (*Cucurbita pepo*) (Scherer, 1992), induce la liberación de insulina de células pancreáticas (Morgan y Montague, 1984), inhibe la ATPasa dependiente de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Baker et al., 1995) e inhibe a la calmodulina uniéndose a ella en presencia de calcio (Kataoka et al., 1989).

1.5.4. ACCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN PROTOZOOS Y HELMINTOS

La hipótesis inicial, sobre una actividad casi exclusiva sobre bacterias, se ha ampliado a otros organismos.

Magaininas.- Fue uno de los primeros péptidos antibacterianos estudiados en protozoos de vida libre como *Paramecium caudatum*, *Euglena gracilis* y *Amoeba proteus*. La magainina 2 produce en estos organismos una dilatación de las vacuolas contráctiles, y a concentraciones superiores del péptido, lisis de la célula (Zaslhoff, 1987). La magainina 2 también impide el desarrollo de los ooquistes de *Plasmodium cynomolgy* dentro del vector *Anopheles gambiae* (Gwadz et al., 1989). Sobre *Acanthamoeba polyphaga* induce una morfología irregular con una inhibición del crecimiento, formación de pseudópodos y de nuevas vacuolas (Schuster y Jacobs, 1992).

Análogos sintéticos de las magaininas se han ensayado en *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*, donde se observa pérdida de la movilidad o ausencia de pseudópodos; y en éstos y en *Trypanosoma cruzi* hay un incremento de la vesiculación del citoplasma, destrucción de la membrana plasmática y por último muerte celular (Huang et al., 1990).

Dermaseptina.- Péptido antibacteriano catiónico de 34 aminoácidos aislado de la piel de la *Phyllomedusa sauvagii* inhibe el crecimiento *in vitro* de promastigotes de *Leishmania mexicana* con pérdida de la motilidad y la aparición de formas redondeadas. A una concentración de 3 μ M inhibe el 50% del crecimiento y el 100% se obtiene a concentraciones de 10 μ M. Al microscopio

electrónico se observa la aparición de unos orgánulos citoplasmáticos transparentes a los electrones y evaginaciones en la membrana plasmática. Los microtúbulos subpeliculares no se alteran (Hernández et al., 1992).

Defensinas de mamífero.- Tanto criptidinas (aisladas del intestino delgado) como NP-2 aislado de neutrófilo murino han sido ensayados en *Giardia lamblia*, donde a una concentración de 20 µg/ml inducen *in vitro* la agregación de los trofozoitos y su muerte posterior. Reducen también la viabilidad de los quistes; la defensina humana HNP-1, precisa concentraciones superiores en tres unidades logarítmicas para tener efecto (Aley et al., 1994).

Defensinas de insectos.- Impiden la colonización de *Aedes aegypti* por *Brugia malayi* cuando el mosquito es infectado previamente por bacterias (Lowenberger et al., 1996).

Cecropina A.- Inhibe la reinvasión de los glóbulos rojos por merozoítos de *Plasmodium falciparum* (Wade et al., 1990) y mata a *Leishmania aethiopica* a concentraciones superiores a 100µM (Kimbell, 1991).

Cecropina B.- Al igual que ocurre con la magainina 2 inhibe el desarrollo de los oocistes de *Plasmodium cynomolgi* (Gwadz et al., 1989), y disminuye la movilidad de microfilarias de *Brugia pahangi* y su infectividad en *Aedes aegypti* (Chalk et al., 1995). Análogos estructurales presentan actividad lítica frente a amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi* “*in vitro*” y en ratones infectados (Barr et al., 1995).

Híbridos cecropina A-melitina.- Péptidos sintéticos con un tamaño que varía desde 26 a 16 aminoácidos son capaces de inhibir tanto el crecimiento de los trofozoitos como la capacidad de reinvasión de glóbulos rojos de *Plasmodium falciparum* (Boman et al., 1989b; Andreu et al., 1992).

Hecate-1, Shiva-1, Shiva 3 y SB-37.- Son cuatro péptidos sintéticos. Excepto Hecate-1 los demás son análogos de la cecropina B. SB-37 se diferencia de la cecropina B por una secuencia adicional Met-Pro en el extremo amino y el cambio de la metionina en posición 11 por una valina. Shiva-1

presenta un 60% de homología con la cecropina y Shiva-3 se diferencia de Shiva-1 por el cambio del Trp-4 por Tyr-4.

Tanto Shiva-1 como Hecate-1 reducen la viabilidad de los esporozoítos de *Cryptosporidium parvum* (Arrowood et al., 1991). Shiva-1 tiene efecto tripanocida contra *Trypanosoma cruzi* y reduce la parasitemia en glóbulos rojos producida por *Plasmodium falciparum*; el mismo efecto es producido por SB-37 pero a una concentración diez veces superior (Jaynes et al., 1988).

Shiva-3 inhibe totalmente el desarrollo del ooquineto y la formación de los gametocitos de *Plasmodium berghei* (Rodríguez et al., 1995). La ingestión de Shiva-3 por *Anopheles albimanus* inhibe el desarrollo de la infección por *Plasmodium* (Rodríguez et al., 1995).

1.5.5. PÉPTIDOS HÍBRIDOS SINTÉTICOS CECROPINA A-MELITINA

El número reducido de residuos, y carencia de puentes disulfuro de la cecropina, facilita su síntesis química y la obtención de análogos sintéticos que permiten definir la naturaleza de aminoácidos que ocupan posiciones clave para su función, con mejora de la actividad antibiótica, reduciendo la concentración letal mínima y ampliando su espectro de acción. Se han realizado estudios de estructura-función de cecropina A mediante deleciones y sustituciones (Andreu et al., 1985a), combinando distintas regiones de diferentes cecropinas (Fink et al., 1989) y sintetizando péptidos híbridos de cecropina A-melitina (Boman et al., 1989; Wade et al., 1990; Andreu et al., 1992; Ubach, 1996). En estos híbridos el extremo N-terminal está formado por la región catiónica amino terminal de la cecropina A, seguida de la secuencia amino terminal de la melitina, conservando el motivo de α -hélices anfipáticas presentes en los péptidos parentales. Estos péptidos híbridos cecropina A-melitina han mostrado una mayor actividad microbicida así como un más amplio espectro de acción que la cecropina A y al mismo tiempo carecen de actividad hemolítica (Boman et al., 1989b).

En el presente trabajo se ha empleado principalmente el péptido (L)-CA(1-8)M(1-18) formado por los primeros ocho aminoácidos de la cecropina A seguidos de los primeros dieciocho residuos de la molécula de la melitina, y se ha comparado con otros análogos más cortos que

también poseen actividad microbicida (Andreu et al., 1992), cuyas secuencias se muestran en la tabla 3.

TABLA 3.- Comparación de las características físicas y antibióticas de los péptidos usados en el presente trabajo.

PÉPTIDO	SECUENCIA	EO (1)	<i>E. coli</i> (2)	<i>S.aureus</i> (2)	α -hélice (3)	$\langle\mu\rangle$ (4)
CA(1-8)M(1-18)	KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS-NH ₂	>600	0.3	1	35	0.197
Ac-CA(1-8)M(1-18)	Ac-KWKLFKKIGIGAVLKVLTTGLPALIS-NH ₂		n.d.	n.d.	n.d.	n.d
D-CA(1-8)M(1-18)	kwklfkkigigavlkvlttglpalis-NH ₂	>400	1	0.3	43	n.d
CA(1-7)M(2-9)	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	>300	8	2	91	0.461
CA(1-7)M(4-11)	KWKLFKKAVLKVLTT-NH ₂	>600	0.6	8	75	0.482
CA(1-7)M(5-12)	KWKLFKKVLKVLTTG-NH ₂	>500	0.5	8	78	0.603
CA(1-8)	KWKLFKKI-NH ₂	n.d	n.a.	n.d.	n.d.	n.d
Cecropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGGQATQJAK-NH ₂	>200	0.3	>300	25	0.316
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	4	0.8	0.2	75	0.342

(1).- EO.- Eritrocito de oveja, tomado de Boman et al., 1989b; Andreu et al., 1992. (2).- Concentración letal (μ M), tomado de Boman et al., 1989b; Andreu et al., 1992. (3).- Porcentaje de α -hélice en hexafluoroisopropanol al 12%, tomado de Wade et al., 1989. Andreu et al., 1992. (4).- Momento hidrofóbico, tomado de Ubach, (1996). n.a.- No activo. n.d.- No determinado.

2. OBJETIVOS

Los péptidos antibióticos catiónicos, además de su efecto antibacteriano, han mostrado su actividad lítica en otros patógenos eucariotas. La síntesis química de estos péptidos así como la de diferentes análogos con mayor espectro de acción y eficacia, posibilita el desarrollo de nuevos péptidos con fines terapéuticos, con un menor coste e inmunogenicidad evitando la aparición de fenómenos de resistencia.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de interacción de péptidos sintéticos híbridos de cecropina A-melitina, y más concretamente del péptido CA(1-8)M(1-18), con el protozoo parásito *Leishmania*, analizando el mecanismo de muerte del parásito y los factores que actúan sobre el mismo como una primera etapa hacia la aplicación terapéutica de este péptido como agente leishmanicida.

Los objetivos concretos son:

- 1.- Establecer un método de estimación de la viabilidad de *Leishmania* que sea repetitivo, rápido y de fácil cuantificación.
- 2.- Determinar qué parámetros intervienen en la interacción del péptido con el parásito.
- 3.- Análisis de los efectos producidos por CA(1-8)M(1-18) en la fisiología de *Leishmania* y los posibles mecanismos de defensa del parásito frente a la acción del péptido.
- 4.- Estudio del efecto de CA(1-8)M(1-18) en los diferentes estados del ciclo biológico del parásito.
- 5.- Proposición de un modelo de acción del péptido.
- 6.- Aplicación de CA(1-8)M(1-18) como agente terapéutico en leishmaniasis murina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVO DE CÉLULAS

3.1.1. CULTIVO DE PARÁSITOS

3.1.1.1. PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA DONOVANI*

La cepa salvaje 1S2D (Ryan et al., 1993) se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementarizado por calor, glutamina 2 mM, gentamicina (30 µg/ml) y unicilina (100 unidades/ml). La cepa mutante R2D2, deficiente en lípidofosfoglicano, se mantuvo en el mismo medio en presencia de 5 µg/ml de aglutinina de ricino 120 (*Ricinus communis*) (Sigma) (King y Turco, 1988). La temperatura de cultivo fue de 25°C. Ambas cepas fueron proporcionadas por el Profesor Salvatore Turco (Universidad de Kentucky).

Los parásitos transfectados con luciferasa fueron obtenidos por el Dr. Octavio Rivero mediante el vector pX63NeoLuc; el gen de la luciferasa fue cortado con BamHI, obteniéndose un fragmento de 1892 pb; el vector pX63Neo fue desarrollado por el Dr. Steve Bervely (Harvard University) y amablemente cedido por el Dr. Luis Miguel Ruiz Pérez (Centro de Parasitología y Biomedicina, C.S.I.C., Granada). Tras ligación, replicación y purificación fue introducido mediante electroporación en promastigotes de *Leishmania donovani*, los parásitos transfectados fueron seleccionados en presencia de una concentración de 30 µg/ml de geneticina y mantenidos en cultivo en medio RPMI con 10% de SFBI en presencia del antibiótico.

3.1.1.2. PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA TROPICA* LRC-L39(C1)

Tanto la cepa salvaje como la cepa R150 fueron cedidos por el Dr. Francisco Gamarro del Instituto de Parasitología y Biomedicina (C.S.I.C., Granada). La cepa salvaje fue crecida en medio RPMI modificado (Jackson, et al., 1984) suplementado con 20% de suero. La cepa R150 resistente a

daunomicina (Gamarro et al., 1994) se creció en presencia de la misma a una concentración de 150 μ M (Sigma, U.S.A.). En ambos casos la temperatura de cultivo fue de 25°C.

3.1.1.3. PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA PIFANOI*

Promastigotes *Leishmania pifanoi* se obtuvieron por transformación de amastigotes crecidos a 25°C y cultivados en medio RPMI suplementado con 10% de SFBI.

3.1.1.4. AMASTIGOTES DE *LEISHMANIA PIFANOI*

Los amastigotes se crecieron, a 32°C, en cultivo axénico (Pan, 1984) en medio M199 (Gibco BRL) a pH 7.2, suplementado con 20% de suero fetal bovino, 5% de tripticasa (BBL, Becton and Dickinson) y 50 μ g/ml de hemina (Sigma).

3.1.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS

La línea macrofágica J774A.1 de ratón Balb/c se cultivó en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y en presencia de antibióticos, a 37°C y 5% de CO₂.

3.2 PÉPTIDOS EMPLEADOS

Además de péptidos híbridos sintéticos se emplearon dos péptidos comerciales; la cecropina A (Laboratorios Europa) y la melitina (Sigma), ésta última desprovista de actividad fosfolipasa A₂.

3.2.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA A-MELITINA

Los péptidos fueron sintetizados por el Dr. David Andreu en el Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona, mientras que la cabeza polar CA(1-8) fue sintetizada por nuestro grupo; en ambos casos los péptidos fueron sintetizados por el método de fase sólida sobre una resina de *p*-metilbenzilhidrilamina (Novabiochem) en un sintetizador automático ABÍMED AMS 222. La desprotección fue hecha con 20% de piperidina en dimetilformamida y la liberación de la resina se realizó usando ácido trifluoroacético al 95%. Los péptidos fueron precipitados con éter frío y su pureza fue testada mediante cromatografía de fase reversa en HPLC utilizando una columna C₁₈ eluida con gradientes de acetonitrilo en 0.1% de TFA. Los péptidos resultantes presentan los extremos carboxílicos amidados.

3.3. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *LEISHMANIA* EN PRESENCIA DE PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS

Los parásitos son recolectados del medio de cultivo a una densidad aproximada de 10^7 leishmanias/ml, lavados dos veces con PBS y resuspendidos a la densidad correspondiente especificada en los siguientes puntos. En el ensayo estándar los parásitos, tanto promastigotes como amastigotes, son resuspendidos a una densidad de 2×10^7 parásitos/ml en solución salina de Hanks sin rojo fenol. Los promastigotes son incubados a temperatura ambiente y los amastigotes a 32°C por 15 minutos. La actividad del péptido se detiene mediante separación de los parásitos del medio de reacción por centrifugación en microfuga (Sigma 201 m) a 13000 xg tras adición de 10 volúmenes de reacción de medio de Hanks a 4°C. El proceso de lavado para eliminar el péptido no unido es repetido dos veces.

3.3.1. INCORPORACIÓN DE ³H-METIL-TIMIDINA

Tras el tratamiento con el péptido correspondiente, los promastigotes son resuspendidos en medio RPMI completo al cual se añade 1 μ Ci de ³H-metil-timidina (75 Ci/mmol) (Amersham) por punto. Los parásitos son incubados a temperatura ambiente durante 24 horas y colectados sobre filtros de nitrocelulosa en un sistema MultiScreen (Millipore). Para eliminar la radiactividad no libre el filtro fue lavado tres veces con 200 μ l de PBS. La timidina tritiada incorporada se valoró en un contador Rack-Beta (Beckman, U.S.A.) en presencia de 1 ml de líquido de centelleo Ready-Protein (Beckman, U.S.A.).

3.3.2. INCORPORACIÓN DE ³⁵S-AMINOÁCIDOS

Previamente a la adición del péptido los parásitos son deplecionados de metionina y cisteína internas por incubación en medio DMEM carente de ambos aminoácidos por espacio de 1 hora, tras la cual se adicionó el péptido según el ensayo estándar. Tras el tratamiento con el péptido los promastigotes, a una densidad de 2×10^7 /ml, se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM suplementado con 20 μ Ci/ml de Pro-mix [³⁵S-Met][³⁵S-Cys] (40-500 mCi/mmol) (Amersham), e incubados por dos horas a temperatura ambiente. Tras lavar los parásitos tres veces con 1 ml de PBS fueron precipitados por TCA al 5%, por centrifugación se separó el precipitado valorándose en el la radiactividad incorporada a proteínas en presencia de 1 ml de líquido de centelleo Ready-Protein (Beckman) en un contador Rack-Beta (Beckman).

3.3.3. REDUCCIÓN DE MTT

Tras el tratamiento con el péptido los parásitos se resuspendieron en 100 μ l de solución salina Hanks sin rojo fenol con 0.5 mg/ml de MTT (Sigma). Las muestras fueron pasadas a una placa de 96 pocillos donde fueron incubadas a temperatura ambiente durante dos horas. El formazan procedente de la reducción del MTT fue solubilizado por adición de un volumen idéntico al de

la muestra de SDS al 10% e incubación durante dos horas a 37°C (Kinderlen y Kaye, 1990). El formazan solubilizado fue valorado por absorción a 600 nm en un lector de placas de ELISA (modelo 450, BioRad).

3.4. CONDICIONES DE INTERACCIÓN *LEISHMANIA*-CA(1-8)M(1-18)

En el estudio de los diferentes parámetros de interacción los ensayos fueron realizados conforme a las condiciones descritas en el punto anterior, con variación del correspondiente parámetro de estudio, utilizando como método de valoración la reducción de MTT.

3.4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

El efecto de la temperatura fue evaluado en promastigotes de la cepa silvestre de *Leishmania donovani* en un rango de temperaturas de 4°C a 25°C en presencia de una concentración constante del péptido CA(1-8)M(1-18) de 2.5 µM .

3.4.2. EFECTO DE SEROALBÚMINA BOVINA

La interacción de BSA con CA(1-8)M(1-18) y su efecto sobre la viabilidad de *Leishmania* fue establecido por tres métodos mediante la variación en la adición de los diferentes componentes: en el primero se incubaron conjuntamente el péptido CA(1-8)M(1-18) a 2.5 µM con diferentes concentraciones de BSA, durante 15 minutos previa a la adición de la mezcla a los promastigotes de *Leishmania donovani*. En un segundo experimento se incubaron promastigotes con las diferentes concentraciones de BSA durante el mismo lapso de tiempo y posteriormente se adicionó el péptido; y en un tercer experimento se efectuó una adición simultánea de BSA y el péptido a los promastigotes.

3.4.3. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES

El efecto de cationes divalentes sobre la interacción de CA(1-8)M(1-18)-promastigote de *L. donovani* fue establecido mediante curvas dosis respuesta en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} o secuestro por EDTA 2 mM.

3.4.4. EFECTO DEL pH

Los promastigotes fueron resuspendidos en solución salina Hanks llevada a diferente pHs mediante la adición de HCl o de NaOH, e incubados con distintas concentraciones del péptido CA(1-8)M(1-18) según las condiciones del ensayo estándar. Tras la incubación, los parásitos fueron lavados dos veces con 1.5 ml de medio de Hank's ajustado a un pH de 7.5 y la reducción de MTT fue realizada conforme al método descrito anteriormente (punto 3.3.3.). El efecto del pH sobre la viabilidad de los parásitos fue corregido mediante controles de parásitos incubados en ausencia de péptido a los diferentes pHs.

3.4.5. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA

Los promastigotes se incubaron con distintas concentraciones de NaCl en solución salina Hanks y en presencia de CA(1-8)M(1-18) a una concentración de 2 μM . El balance osmótico del experimento se mantuvo constante por corrección con diferentes concentraciones de sorbitol. Tras la incubación con el péptido se prosiguió según lo descrito en el punto 3.3.3. Como control se incubaron parásitos en las mismas relaciones NaCl/sorbitol pero en ausencia de péptido.

3.5. EFECTO DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE *LEISHMANIA*

3.5.1. INCORPORACIÓN DE PROLINA

Promastigotes de *Leishmania donovani* (2×10^7 /ml) fueron resuspendidos en medio Hanks con L-prolina a una concentración de 0.1 mM más 10 μ Ci (100 μ Ci/ μ mol) de 3 H-prolina (60 Ci/mmol) (Amersham), adicionando inmediatamente el péptido a una concentración final cercana a la LD₅₀ (2.5 μ M); la incorporación de prolina fue medida mediante retirada, a distintos tiempos, de alícuotas de 200 μ l que son filtradas a través de nitrocelulosa (sistema MultiScreen, Millipore) y la radiactividad incorporado en los parásitos medida conforme al punto 3.3.1. Como control negativo se consideró la incorporación de prolina en presencia de 2 μ M de valinomicina (Sigma).

3.5.2. MEDICIÓN DE NIVELES DE Ca²⁺ INTRACELULAR

La valoración del Ca²⁺ intracelular se realizó conforme al método descrito por Moreno et al., (1992). Los promastigotes de *Leishmania donovani* se lavaron dos veces con tampón A: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 0.8 mM, D-glucosa 5.5 mM y HEPES 50 mM, a pH 7.4. Las células se resuspendieron a una densidad de 10⁹ parásitos/ml en tampón de carga, compuesto por tampón A más 1.5% de sacarosa y 6 μ M de FURA 2/AM (Molecular Probes). Los parásitos fueron incubados en este tampón durante 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se lavaron con tampón A a 25°C, y los promastigotes se mantuvieron 4°C en este mismo tampón. La densidad final de promastigotes utilizados en el ensayo fue de 5×10^7 /ml. Como control se utilizó el ionóforo A21387 (Sigma) a una concentración de 5 μ M. Las medidas de fluorescencia se realizaron en cubetas de 1 cm de paso óptico, a una temperatura de 25°C, en un fluorímetro

Perkin-Elmer LS-5. La longitud de onda de excitación fue de 350 nm y la de emisión de 510 nm, en ambos casos la rendija fue de 2.5 nm.

3.5.3. MEDIDAS DE pH INTRACELULAR

Las medidas de pH se hicieron de acuerdo al método descrito por Zilberstein et al., (1989). Brevemente, promastigotes de *Leishmania donovani* fueron colectados en fase exponencial de crecimiento, lavados dos veces con tampón B: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 0.8 mM, D-glucosa 5.5 mM y MOPS 50 mM a pH 7.40. Las células fueron resuspendidas a una densidad de 10⁹ parásitos/ml en tampón de carga: compuesto por tampón B más sacarosa al 1.5% y 6 μM de BCECF (Molecular Probes), e incubadas a 25°C en agitación suave durante 30 minutos, tras lo cual fueron lavados con tampón B a 4°C y resuspendidos a una densidad de 2x10⁹ promastigotes/ml en tampón C: NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 0.8 mM, D-glucosa 5.5 mM y Tris-succinato 10 mM a pH 7.0 Una alícuota de esta suspensión fue diluida a una densidad de 2x10⁷ promastigotes/ml en tampón C previamente ajustado al correspondiente pH; el rango de pH utilizado fue de 5.5 a 8.0 con variación de 0.5 unidades de pH. La relación fluorescencia-pH fue determinada con promastigotes permeabilizados con Triton X-100.

Las medidas de fluorescencia se realizaron de forma idéntica a la descrita en el punto anterior, a una longitud de onda de excitación de 500 nm y 525 nm de emisión y con una rendija de 2.5 nm.

3.5.4. VALORACIÓN DE ATP

La extracción de ATP se hizo según el método descrito por Del Campo y colaboradores (1975). Promastigotes de *Leishmania donovani* a una densidad de 2x10⁷ promastigotes/ml se incubaron en solución salina Hanks en presencia de 0.1 y 5 μM del péptido. A distintos tiempos se retiran alícuotas de 1 ml, los parásitos son sedimentados en una microfuga (Hettich, mikro 12-24) a 14000

xg durante 3 minutos. El ATP fue extraído del sedimento celular por adición de 100 μ l de HCl 0.9 M e incubación a 4°C durante 10 minutos, y recuperado del sobrenadante tras centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 27000 xg. El sobrenadante (100 μ l) fue neutralizado con 40 μ l de tampón AsO_4^{3-} 0.8 M y 24 μ l de NaOH 4 N a un pH final de 7.4. El contenido de ATP fue valorado mediante la reacción de la luciferina-luciferasa mediante un extracto crudo de luciérnagas (*Photinus pyralis*) liofilizadas (Sigma), preparado mediante resuspensión del extracto en arsenato sódico 0.05 M (1mg/ml), centrifugación a 34000 xg durante 10 minutos y recuperación de luciferina-luciferasa en el sobrenadante. El sobrenadante fue diluido 6 veces con tampón AsO_4^{3-} 0.4 M pH 7.3, MgCl_2 50 mM. Para las medidas de ATP se utilizó 200 μ l de la mezcla de luciferina-luciferasa en 750 μ l de agua y 50 μ l de la muestra. Cada muestra se hizo por triplicado. La luz emitida en la reacción se cuantificó en un luminómetro LKB (modelo BioOrbit 1250). De cada muestra se realizaron 10 medidas a intervalos de 10 segundos de las que se obtuvo las medias.

3.5.4.1. VALORACIÓN DE ATP EN LEISHMANIAS TRANSFECTADAS CON LUCIFERASA

Los promastigotes se resuspendieron a una densidad de 10^7 parásitos/ml en solución salina Hanks. A 1 ml de la suspensión de promastigotes se le añadió éster de luciferina (DMNPE-luciferina disuelta en DMSO) (Molecular Probes) a una concentración final de 25 μ M. El curso de luminiscencia fue seguido durante 15 minutos, y una vez estabilizado se añadieron distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18); la luminiscencia fue registrada en un luminómetro LKB (modelo BioOrbit 1250), tomando medidas cada 10 segundos.

3.5.4.2. ESPECTROS DE ^{31}P RMN DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA

Para los espectros de los parásitos “in situ” se emplearon 5.5×10^9 promastigotes de *Leishmania donovani*, lavados con solución salina Hanks y resuspendidos en 2 ml del mismo tampón. El mismo número de promastigotes fue empleado para la extracción de ATP, para ello se añadió HClO_4 a una concentración final del 6%, e incubadas a 4°C durante 10 minutos. La muestra se centrifugó a 13000 xg y el sobrenadante resultante fue guardado. Se realizó una nueva extracción

con 0.6 ml de HClO₄, los sobrenadantes fueron combinados, neutralizados con KOH y llevados a un volumen final de 2 ml con solución salina Hanks.

Los espectros de ³¹P RMN se adquirieron a 8.4T (145.2 Mhz) utilizando un espectrómetro Brüker AM-360, obtenidos por el Dr. Sebastián Cerdán del Instituto de Investigaciones Biomédicas (C.S.I.C.). Las condiciones de adquisición fueron: pulsos de 45°, 60 ppm_z de anchura espectral, 8192 puntos en el dominio del tiempo, 0.933 s de tiempo de adquisición, 3.933 s de tiempo total de ciclo y 1024 barridos por espectro. Se aplicó una multiplicación exponencial antes de la transformación de Fourier que produjo un ensanchamiento artificial de las resonancias de 10 Hz.

3.5.5. CONSUMO DE OXIGENO EN *LEISHMANIA*

Promastigotes de *Leishmania donovani* en fase exponencial de crecimiento fueron centrifugados y lavados con tampón fosfato salino, y resuspendidos en tampón de respiración: sacarosa 125 mM, KCl 65 mM, Tris-HCl pH 7.2 10 mM, MgCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 2.5 mM y EGTA 0.33 mM, pH 7.2 (Vercesi et al., 1991) a una densidad de 2.5x10⁹ promastigotes/ml. La concentración final de promastigotes utilizadas en cada medida fue de 75-100x10⁶/ml y normalizadas en relación a la misma.

Las medidas de consumo de oxígeno se realizaron en un electrodo de oxígeno tipo Clark (Hansa Tech), termostatzado a 25°C y conectado a un registrador LKB 2210.

3.5.5.1. MEDIDAS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE MITOCONDRIA

Promastigotes de *Leishmania* en fase exponencial de crecimiento fueron lavados dos veces en solución de Hanks, y resuspendidos en solución salina a una densidad de 2x10⁶ promastigotes/ml. Las células fueron incubadas durante cinco minutos a 37°C en presencia de 0.3 µg/ml de rodamina 123 (Molecular Probes), en un volumen final de 500 µl. Tras la incubación se añadió 1 ml de HBSS frío y las células fueron centrifugadas durante 2 minutos a 13000 xg.

Los promastigotes fueron incubados con CA(1-8)M(1-18) en las condiciones del ensayo

estándar descritas anteriormente y los parásitos se resuspendieron en 1 ml de HBSS a una densidad de 10^6 /ml. La fluorescencia de rodamina asociada a las células fue medida en un citómetro de flujo modelo EPICS-XL. La excitación fue a 488 nm y la emisión de fluorescencia a 525 nm.

3.5.6. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-*LEISHMANIA*

Promastigotes a una densidad de 2×10^7 /ml en medio Hanks, se incubaron en presencia de distintas concentraciones de valinomicina a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras tres lavados con 1 ml de Hanks a 4°C los promastigotes fueron incubados con el péptido según el método estándar descrito anteriormente y valorados por el método de la reducción del MTT (ver punto 3.3.3.).

3.6. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

3.6.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los promastigotes de *Leishmania donovani* tratados con el péptido CA(1-8)M(1-18) a diferentes concentraciones se lavaron con PBS y fijados con glutaldehído al 5%. A continuación se realizó una post-fijación con tetróxido de osmio al 2.5% durante una hora y deshidratación por incubaciones sucesivas de 30 minutos en etanol a concentraciones crecientes al 30-50-70-90% y absoluto. El proceso de deshidratación finaliza con una incubación durante una hora en óxido de propileno. Las muestras así procesadas se incluyeron en resina EPON 812 y se montaron en las cápsulas polimerizando la resina a 60°C durante 48 horas. Las muestras se cortaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung y se observaron en un microscopio electrónico Philips E-200.

3.7. OTRAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA A-MELITINA

3.7.1. INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE "STRESS"

La preincubación de promastigotes en medio carente de metionina fue realizada conforme a las condiciones descritas en el apartado 3.3.2. Para el control de proteínas de "stress", los promastigotes fueron incubados a 42°C durante 30 minutos, de tal forma que se indujera la expresión de los correspondientes mensajeros; los promastigotes fueron cambiados por centrifugación a 1 ml de medio nuevo; a cada punto se adicionaron 10 μ Ci de Pro-mix [³⁵S-Met][³⁵S-Cys] (40-500 mCi/mmol) (Amersham) y la concentración correspondiente del péptido CA(1-8)M(1-18), incubándose a temperatura ambiente por 1 hora, a excepción del control de proteínas de stress que lo fue a 42°C. La cuantificación de la radiactividad se realizó tras lavado con PBS 3 veces y precipitación con ácido tricloroacético a una concentración final del 5% conforme al método descrito en el apartado 3.3.2.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (15x18x0.15 cm) al 10% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%), en condiciones reductoras según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras fueron normalizadas con respecto a la radiactividad incorporada, cargándose en cada calle 250,000 cpm. El gel fue tratado con PPO al 22% en DMSO durante 1 hora, secado y expuesto a una placa autorradiográfica (X-Omat S, Kodak).

3.8. INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO CA(1-8)M(1-18) CON SUSTANCIAS POLIANIÓNICAS

3.8.1. SU EFECTO EN LA INTERACCIÓN PÉPTIDO-*LEISHMANIA*

3.8.1.1. OBTENCIÓN DE LPG

El LPG fue obtenido a partir de 10^{10} promastigotes de *Leishmania donovani* por extracciones sucesivas a 4°C, con 15 ml de cada solvente de la manera siguiente: dos veces con cloroformo/metanol/agua (3:2:1), cuatro veces con $MgCl_2$ 4 mM y tres veces con cloroformo/metanol/agua (1:1:0.3). Se obtuvo una fracción deslipidada de la cual se extrae el LPG mediante cuatro extracciones con solvente E: agua/etanol/dietiléter/piridina/ NH_4OH (15:15:5:1:0.017). El LPG es obtenido por evaporación del solvente con corriente de N_2 (Turco et al., 1984).

3.8.1.2. HIDRÓLISIS DE PG

La destrucción de los enlaces fosfodiéster presentes en la unidad repetitiva del PG, se realizó mediante incubación en HCl 0.02 N durante 10 minutos a 100°C. Las muestras hidrolizadas fueron liofilizadas y resuspendidas en tampón fosfato 10 mM a pH 7.0.

3.8.1.3. INHIBICIÓN DE LA INTERACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18) POR HEPARINA, PG Y LPG.

La inhibición de la interacción péptido-*Leishmania* fue determinada mediante tres experimentos, en cada uno de ellos se varió el orden de adición del péptido y del compuesto polianiónico.

Promastigotes de *Leishmania donovani*, a una densidad de 2×10^6 promastigotes/ml, tanto de la cepa salvaje como de la cepa mutante R2D2, se incubaron con 300 $\mu g/ml$ de PG (amablemente cedido por el Prof. S. Turco, Universidad de Kentucky, U.S.A.) durante una hora a temperatura ambiente tanto hidrolizado como sin hidrolizar, o con 300 $\mu g/ml$ de LPG durante

una hora a temperatura ambiente, lavados e incubados con distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18), valorándose de la viabilidad del parásito por reducción con MTT. En el caso de la heparina (200 µg/ml) (Laboratorios Rovi) el tiempo de incubación fue de 15 minutos.

En otro tipo de experimentos se incubó el péptido con heparina, LPG y PG a las mismas concentraciones anteriormente citadas, durante 15 minutos a temperatura ambiente, esta mezcla fue añadida a los promastigotes, y la actividad ensayada de forma estándar. Por último, se ensayó el efecto del péptido con adición simultánea de cada uno de los compuestos polianiónicos

3.8.2. VARIACIONES DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE CA(1-8)M(1-18) EN PRESENCIA DE COMPUESTOS POLIANIÓNICOS

La fluorescencia del residuo de triptófano en posición 2 fue medida en un fluorímetro Perkin-Elmer LS-5 con una cubeta de 1 cm de paso óptico. Las condiciones del ensayo fueron: 25°C, excitación a 292 nm, rango de emisión de 300 a 440 nm y tanto la rendija de excitación como la de emisión fue de 2.5 nm.

El péptido fue diluido en tampón fosfato 10 mM fue ensayado con distintas concentraciones de PG de *Leishmania donovani*, de heparina porcina (rango de peso molecular aparente 4000-6000, Fluka), y con diferentes concentraciones de acrilamida (BioRad) en experimentos de desactivación de fluorescencia.

3.9. ENSAYOS SOBRE LEISHMANIAS MULTIRRESISTENTES

Promastigotes de *Leishmania tropica* tanto de la cepa salvaje como de la resistente a daunomicina se incubaron en presencia de distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18) durante 15 minutos a temperatura ambiente, valorándose a continuación la viabilidad según el método descrito en el punto 3.3.3.

3.9.1. EFECTO DEL VERAPAMIL

Promastigotes de *Leishmania tropica* de ambas cepas se incubaron con una concentración de 60 μM de verapamil (Sigma) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante, tras lo cual se añadieron diferentes concentraciones de CA(1-8)M(1-18), siguiéndose el experimento de igual forma que en el punto 3.3.3.

3.10. ENSAYOS EN EL HOSPEDADOR

3.10.1. ENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS EN LIPOSOMAS

La encapsulación fue realizada por Lipotec, S. A. (Hospitalet, España). Brevemente el proceso fue el siguiente: el péptido CA(1-8)M(1-18) fue acomplejado con dimiristoilfosfatidilglicérol, a continuación se añadió dimiristoilfosfatidilcolina. La relación molar de dimiristoilfosfatidilcolina respecto al dimiristoilfosfatidilglicérol fue de 9:1. Por evaporación del solvente se obtuvo una película de lípido que fue hidratada con una solución de sacarosa 0.25 M en un tampón de succinato sódico 10 mM. Los liposomas fueron formados por dos ciclos de sonicación de 1.5 minutos. La concentración final del péptido encapsulado fue de 178 μM .

3.10.2. INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

Para inhibir la división celular los macrófagos J774 (10^6 células/ml) fueron sometidos a radiación con rayos X en un aparato Philips MG 102 por 8 minutos a una potencia de 100kV y a una distancia de 20 cm de la fuente de emisión (Lámpara MCN 101), y sembrados en placas de 96 pocillos a una densidad de 10^5 /pocillo. Los macrófagos fueron infectados con amastigotes de *Leishmania pifanoi* (relación amastigotes:macrófago 10:1) y mantenidos a 32°C en medio RPMI

suplementado con 10% SFBI durante 4 horas; los amastigotes no fagocitados fueron eliminados por 3 lavados con 200 µl de solución salina Hank's. Los macrófagos infectados fueron mantenidos en cultivo durante 2 días. El péptido libre o encapsulado en liposomas fue añadido y mantenido por 48 horas. La evaluación de la proliferación de los amastigotes intracelulares se realizó mediante ELISA, por medida de la incorporación de 5-bromo-2' desoxiuridina en el DNA en células permeabilizadas por un fragmento Fab dirigido contra tal nucleósido utilizando el kit comercial (Kit III de Boehringer Mannheim).

3.10.3. TRATAMIENTO DE RATONES INFECTADOS CON *LEISHMANIA MAJOR*

La eficacia del péptido *in vivo* fue evaluado mediante la progresión de la enfermedad en ratones Balb/c hembras infectadas con *Leishmania major*. En un primer ensayo, los ratones fueron infectados subcutáneamente con 10^6 promastigotes de *Leishmania major* (LRC-137) y una vez que la úlcera era evidente (aproximadamente entre 4-6 semanas) fueron tratadas con crema con liposomas, fabricada por Lipotec S. A. (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). A tres de ellas se les suministró crema con péptido encapsulado en los liposomas a una concentración de 71 µM, la relación péptido:fosfolípido fue de 0.003 mientras al control se les administró crema con liposomas vacíos. El excipiente de la crema se encuentra bajo patente. La evolución de la enfermedad fue seguido por medición semanal del diámetro de la úlcera con un calibre.

En un segundo ensayo el inóculo fue de 10^7 promastigotes de la cepa RCO1 de *Leishmania major*. Se hicieron 4 grupos de 5 ratones, dos de los grupos se consideraron como controles del desarrollo de la enfermedad, mientras que a uno se le administró crema con liposomas vacíos, el otro no fue tratado. Los otros dos grupos de ratones fueron tratados con péptido, a uno de ellos se les aplicó crema conteniendo liposomas con CA(1-8)M(1-18) y al otro el péptido libre en la crema, en ambos casos la concentración de péptido fue de 71 µM. Al igual que en el ensayo anterior el tratamiento fue diario y el diámetro de la lesión medido semanalmente.

3.11. ENSAYOS DE VIABILIDAD DE PROMASTIGOTES EN EL INTERIOR DEL VECTOR

Estos ensayos se realizaron en el Departamento de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología Carlos III (Majadahonda, Madrid).

Se alimentaron 142 hembras de *Phlebotomus perniciosus* de 11 días de edad con una suspensión en PBS de 1×10^7 promastigotes/ml de *Leishmania infantum* (cepa LEM-75, ZM-1). La estimación del grado de parasitación a los distintos días se realiza por disección de diversos individuos en PBS con trazas de un tensioactivo neutro. Díez días después se realimentan sobre una solución de CA(1-8)M(1-18) $10 \mu\text{M}$ en PBS, o sobre PBS para los mosquitos control. Tras dos días se sacrifican y se cuantifica el grado de parasitación y la mortalidad entre los promastigotes en relación al control.

4. RESULTADOS

4.1. INHIBICIÓN DE VIABILIDAD DE *LEISHMANIA* POR PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA-MELITINA

4.1.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD DE PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA DONOVANI*

De los diferentes péptidos híbridos cecropina A-melitina utilizados en el presente trabajo, CA(1-8)M(1-18) es el péptido más activo sobre bacterias y en la inhibición de la invasión de merozoítos de *Plasmodium* sobre eritrocitos (Andreu et al, 1992); consecuentemente fue el empleado para evaluar la actividad sobre *Leishmania* medida por tres diferentes métodos de medida, y su relación dosis-respuesta. En dos de los métodos la viabilidad del parásito fue evaluada mediante la incorporación de precursores radiactivos a macromoléculas; ^3H -metil-Thy, a DNA, mediante ciclos de replicación celular, o de aminoácidos marcados con ^{35}S a proteínas; el tercer método es un ensayo colorimétrico basado la capacidad de los parásitos para la reducción de MTT, fundamentalmente por reductasas mitocondriales, que ya había sido empleado en la estimación del número de promastigotes de *Leishmania* (Kinderlen y Kaye, 1990).

En la figura 3 se muestran los datos obtenidos con los tres métodos; a concentraciones de péptido superiores a $2\ \mu\text{M}$, los tres métodos son altamente coincidentes; a bajas concentraciones es donde se observan las mayores diferencias entre los tres sistemas de medida. En la incorporación de ^3H -metil-Thy a concentraciones menores de $0.5\ \mu\text{M}$ de péptido existe una ligera estimulación de la proliferación de parásitos en relación al control, es decir, el péptido mostraría un efecto mitogénico sobre los parásitos. A $5\ \mu\text{M}$ la proliferación es inhibida en un 95% respecto al control. La LD_{50} estimada se encuentra en un intervalo de concentración de $1\text{-}2.5\ \mu\text{M}$.

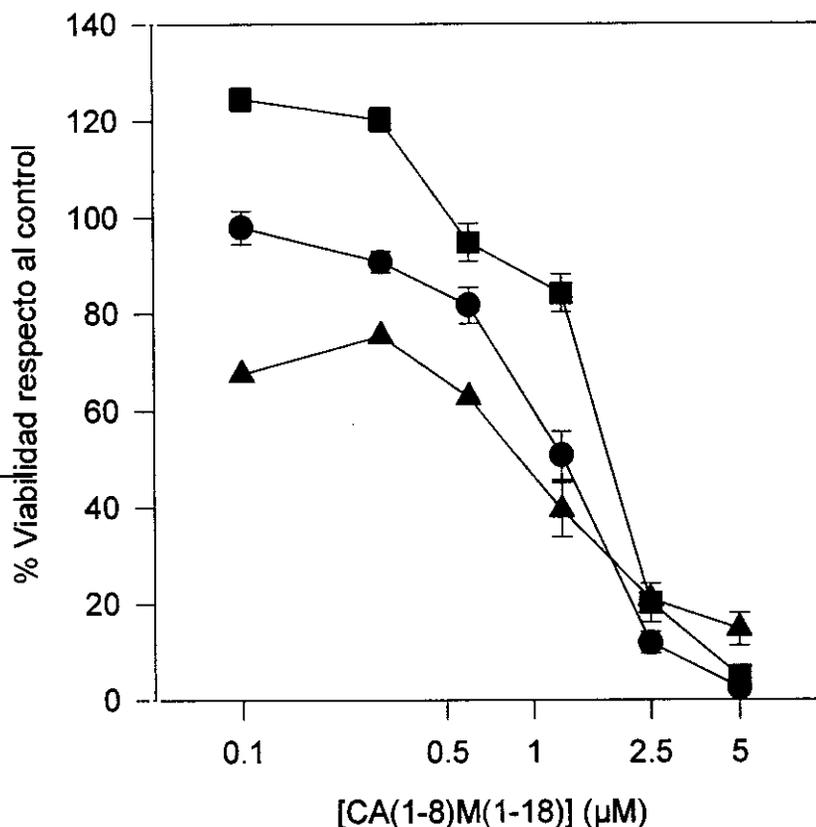


FIGURA 3.- Efecto de distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18) en la viabilidad de promastigotes de *Leishmania donovani* medido por tres métodos diferentes; ■ Incorporación de ^3H -metil-Timidina, ● Reducción de MTT, ▲ Incorporación de ^{35}S -Metionina.

La incorporación de metionina ^{35}S -Met como marcador de la biosíntesis de proteínas, es el método más sensible; en presencia de concentraciones péptido inferiores a $0.1 \mu\text{M}$, los promastigotes incorporan sustancialmente menos metionina que los controles (40% de inhibición). La inhibición lograda a $5 \mu\text{M}$ de péptidos es de un 85-90% del valor control.

La reducción de MTT por parte de los promastigotes disminuye a concentraciones de péptido superiores a $0.5 \mu\text{M}$; a $2.5 \mu\text{M}$ la formación de formazan se reduce alrededor de un 20% y, a $5 \mu\text{M}$ es menor del 5%, valores semejantes a los obtenidos con la incorporación de timidina. Por este método la LD_{50} estimada es de $1.5\text{-}2 \mu\text{M}$.

El método colorimétrico fue adoptado como el de rutina para los ensayos sucesivos, debido a una serie de ventajas sobre los otros dos métodos: la ausencia de manipulación de sustancias radiactivas, el precio, una mayor facilidad y rapidez en la cuantificación en un lector de ELISA y permitir el uso de pequeños volúmenes con el consiguiente ahorro en péptido.

4.1.2. ACTIVIDAD DE DIFERENTES PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS FRENTE A *LEISHMANIA*

Un conjunto restringido de los diferentes péptidos híbridos cecropina A-melitina desarrollados anteriormente (Andreu et al., 1992; Boman et al., 1989b; Fink et al., 1989) fueron ensayados sobre promastigotes de *Leishmania donovani*.

En la figura 4 se muestra la relación concentración de péptido-viabilidad de promastigotes evaluada por reducción de MTT. En la gráfica A se observa que el péptido (L)-CA(1-8)M(1-18) inhibe el 50% de la viabilidad de los promastigotes una concentración de 1 μM . Los péptidos parentales de este péptido híbrido, es decir, cecropina-A y melitina muestran una eficacia totalmente diferente; mientras que la melitina muestra un efecto leishmanicida superior al péptido híbrido, la cecropina A en el mismo intervalo de concentraciones, no afecta la viabilidad de *Leishmania*; es preciso una concentración superior a 50 μM para obtener una mortalidad del 50% (dato no mostrado). El análogo enantiomérico (D)-CA(1-8)M(1-18) es más efectivo que el péptido híbrido sintetizado con aminoácidos L, especialmente a bajas concentraciones, con un 50% de inhibición de la viabilidad a una concentración de 0.5 μM . La acetilación del $\alpha\text{-NH}_2$ de la Lys 1 reduce la efectividad del péptido; a concentraciones de 1 y 2.5 μM la viabilidad de los promastigotes aumenta en un 20% respecto al no acetilado.

En la gráfica B se comparan el péptido (L)-CA(1-8)M(1-18) con análogos de menor longitud, tres de ellos tienen 16 residuos. El otro, CA(1-8), compuesto por los ocho primeros residuos de CA(1-8)M(1-18) corresponde al extremo amino de la cecropina A, donde se localiza la mayor densidad de cargas positivas. La secuencia polar CA(1-8) no afecta a la viabilidad de los promastigotes. De los análogos de menor longitud, el péptido CA(1-7)M(2-9) es el que produce el

mayor efecto, con una LD_{50} cercana a 5 μM , mientras que la de los otros dos análogos es próxima a 20 μM .

4.2. FACTORES DE LA INTERACCIÓN *LEISHMANIA-CA(1-8)M(1-18)*

Una vez determinado que el péptido CA(1-8)M(1-18) es el de mayor actividad leishmanicida comparado con los análogos más cortos, se procedió al estudio de diversos parámetros de su interacción con los promastigotes de *Leishmania donovani*.

La acción del péptido en *Leishmania* es muy rápida, a una concentración de 2.5 μM el 90% del efecto final se alcanza en los primeros 5 minutos (figura 5); no se ha encontrado diferencias apreciables incubando 5 o 15 minutos, este último tiempo fue escogido como incubación estándar.

4.2.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

La temperatura es uno de los principales factores que influyen en la fluidez de membrana, especialmente en cortos espacios de tiempo, cuando la variación de la composición de membrana no ha podido ser modificada por la propia célula; por otro lado la actividad metabólica y consecuentemente el potencial de membrana también son afectados por la misma.

El efecto de la temperatura en la acción del péptido sobre *Leishmania* fue estudiada en el intervalo de temperaturas comprendida entre 4° C y 37° C y a una concentración de 2.5 μM de péptido. En la figura 6 se puede observar que el máximo de inhibición de la viabilidad celular se alcanza a partir de los 20°C. A 4°C la viabilidad celular es de aproximadamente un 90% respecto al control, a 15°C la viabilidad disminuye a un 70%.

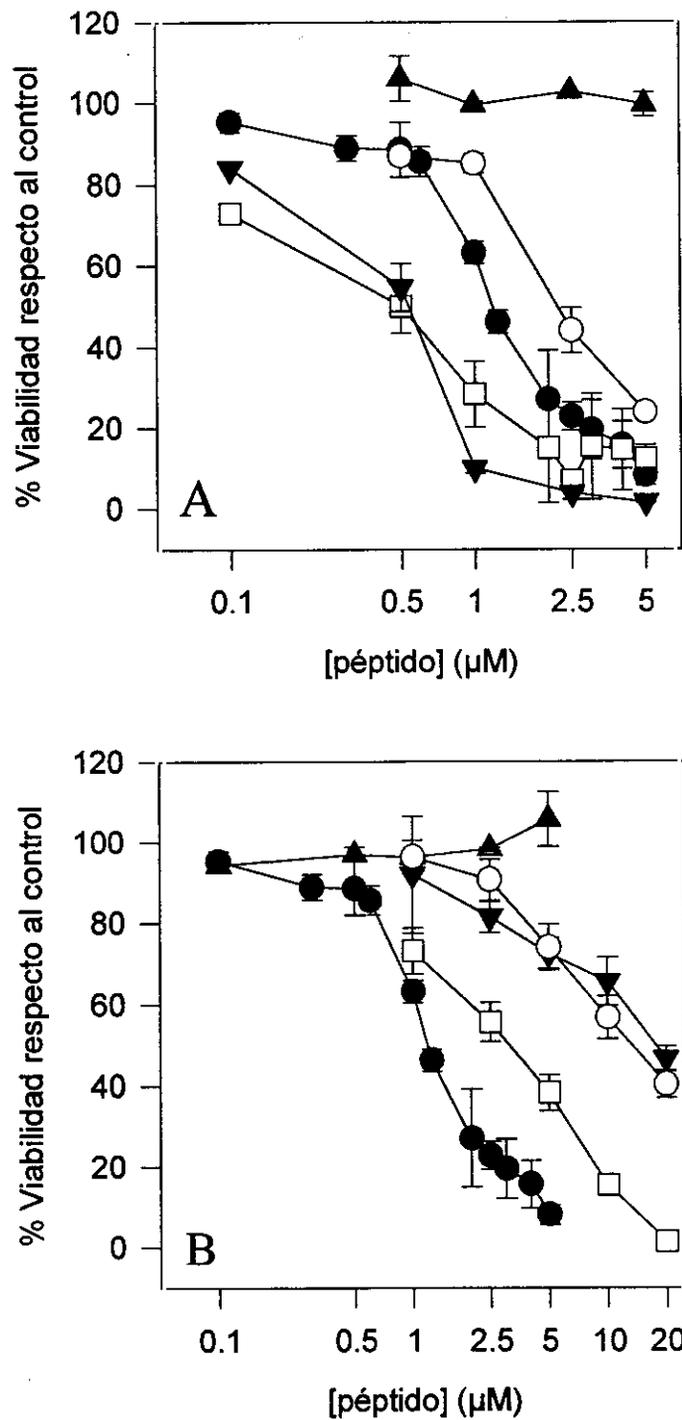


FIGURA 4.- Efecto de distintos péptidos antibióticos en promastigotes de *Leishmania donovani*. Gráfica A: ● (L)-CA(1-8)M(1-18), ○ Acetil-CA(1-8)M(1-18); ▲ Cecropina, ▼ Melitina, □ (D)-CA(1-8)M(1-18). Gráfica B: ● (L)-CA(1-8)M(1-18), ▲ CA(1-8), ■ CA(1-7)M(2-9), ▼ CA(1-7)M(4-11), ○ CA(1-7)M(5-12).

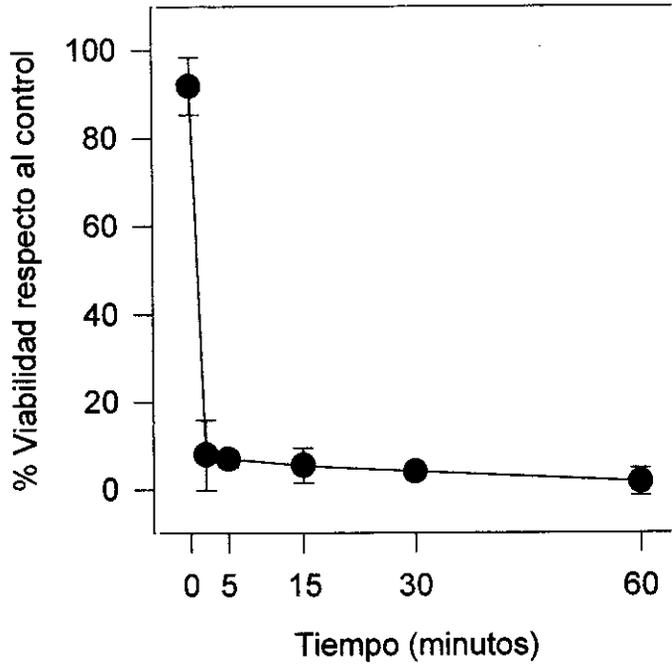


FIGURA 5.- Cinética del efecto de CA(1-8)M(1-18) 2.5 μ M sobre promastigotes de *Leishmania donovani*.

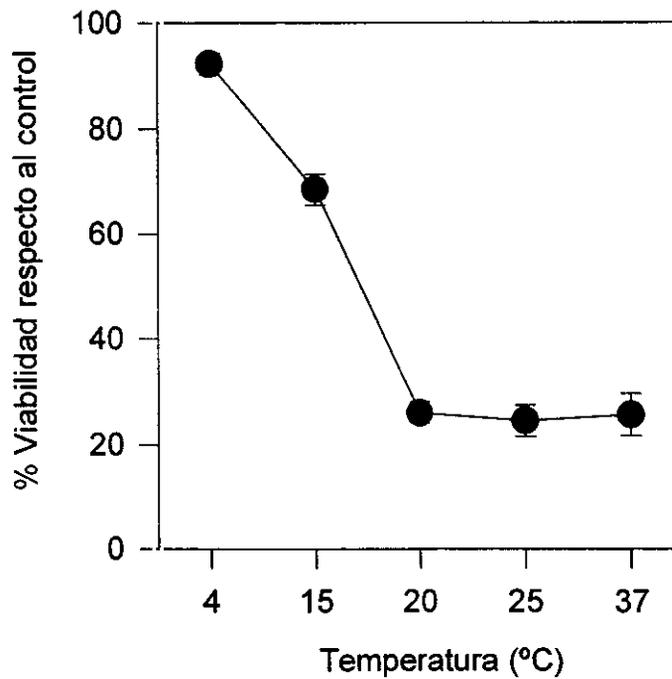


Figura 6.- Efecto de la temperatura en la acción de CA(1-8)M(1-18) 2.5 μ M sobre promastigotes de *Leishmania donovani*

4.2.2. EFECTO DE BSA (seroalbúmina bovina)

La albúmina es un componente mayoritario del suero, y presenta una alta capacidad de unión de moléculas hidrofóbicas, tales como ácidos grasos; BSA es capaz de inhibir el efecto de otros péptidos anfipáticos como defensinas (Lehrer et al., 1985).

La figura 7 representa la variación de la actividad de CA(1-8)M(1-18) a 2.5 μ M con concentraciones crecientes de BSA; BSA incrementa la viabilidad del parásito de forma dosis dependiente respecto del control en ausencia de BSA. Cuando existe incubación previa de BSA con el péptido el efecto protector es mayor que cuando la adición es conjunta. Si el parásito se incuba previamente con BSA y luego se adiciona el péptido, el efecto protector es muy inferior al logrado por las otras dos estrategias.

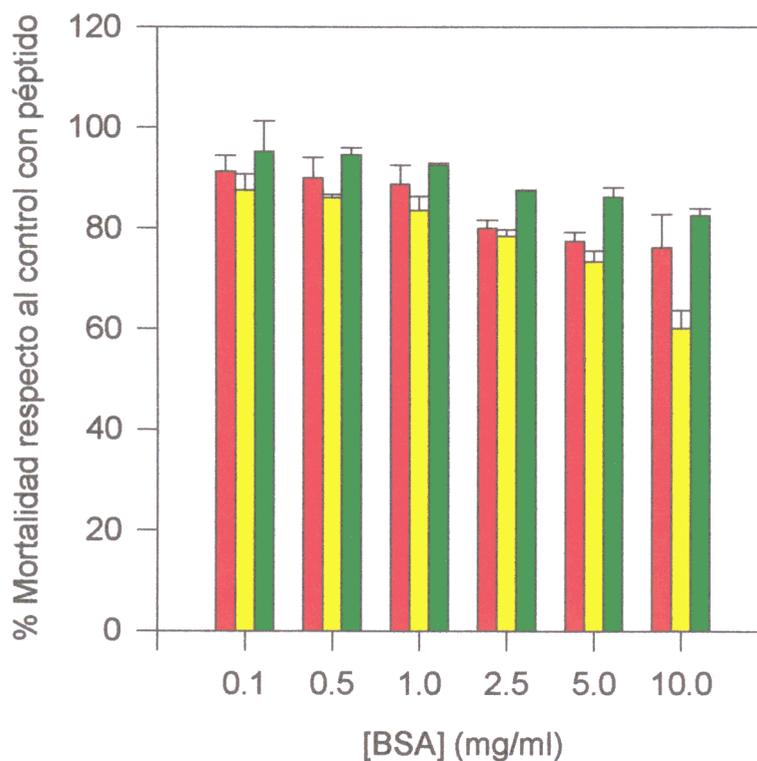


FIGURA 7.- Efecto de 2.5 μ M de CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de distintas concentraciones de BSA. ■ Adición simultánea de péptido y BSA, ■ Incubación previa péptido-BSA, ■ Incubación previa promastigotes-BSA.

4.2.3. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE CA(1-8)M(1-18)

Cationes divalentes son capaces de modificar propiedades estructurales de membrana, especialmente por su interacción con fosfolípidos ácidos. Concentraciones de Ca^{2+} inferiores a las fisiológicas en el suero humano son capaces de inhibir la actividad microbicida de las defensinas; por otro lado, el lípidofosfoglicano (LPG), uno de los componentes mayoritarios de la membrana plasmática del promastigote de *Leishmania*, une Ca^{2+} (Homans et al., 1992) reduciendo el número de cargas negativas disponibles para su interacción con el péptido.

Se estudiaron los efectos de diversas concentraciones de Ca^{2+} , y el secuestro del mismo por EDTA, sobre la actividad leishmanicida de CA(1-8)M(1-18). La presencia de EDTA a una concentración de 2 mM durante el tratamiento con el péptido induce una significativa sensibilización de los promastigotes al péptido, especialmente notable a concentraciones de péptido entre 0.5-1 μM , con una reducción de la viabilidad de los parásitos de un 20% en relación a aquellos que no han sido tratados con EDTA; las diferencias disminuyen considerablemente a concentraciones superiores a 2.5 μM (figura 8).

La adición de diferentes concentraciones de Ca^{2+} no influye en la acción del péptido a bajas concentraciones; sólo a una concentración de 5 μM de péptido la presencia de 2 mM de Ca^{2+} aumenta un 5% la viabilidad de los promastigotes respecto al control sin péptido. Este aumento es superior si se considera el ligero efecto tóxico del Ca^{2+} sobre promastigotes de *Leishmania donovani* (figura 9).

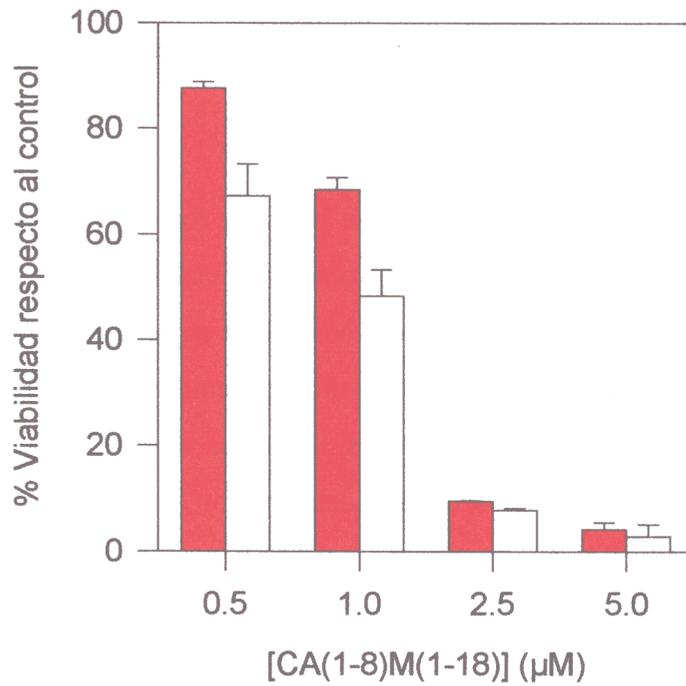


FIGURA 8.- Efecto de EDTA 2 mM (□) sobre la acción de CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes de *Leishmania donovani*. Control sin EDTA (■).

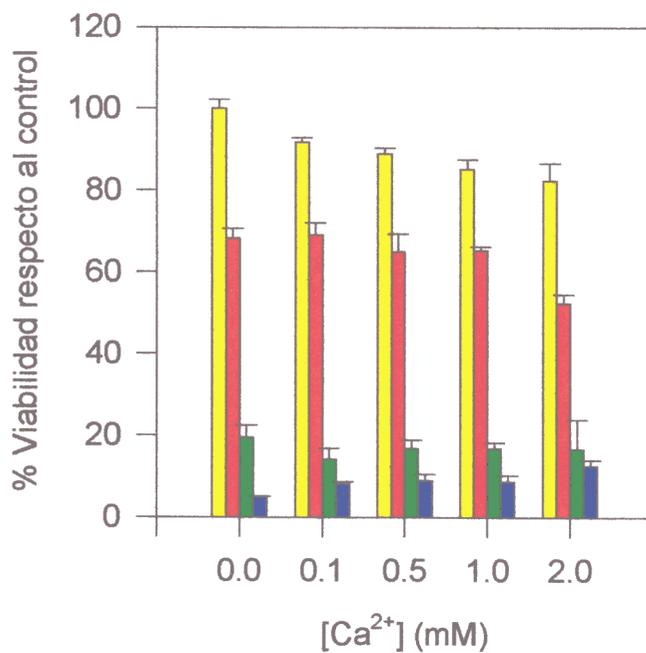


FIGURA 9.- Efecto del calcio en la acción de CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes de *Leishmania donovani*.

CA(1-8)M(1-18) ■ 0 μM, ■ 1 μM, ■ 2.5 μM, ■ 5 μM.

4.2.4. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE CA(1-8)M(1-18) CON EL pH DEL MEDIO

La viabilidad de los promastigotes de *Leishmania* se afecta de forma significativa (<15%) a pHs ácidos, mientras que los pHs superiores no comprometen la viabilidad del parásito (figura 10), consecuentemente los datos son normalizados en cada punto en relación a la supervivencia del promastigote. La influencia del pH es más patente a una concentración de péptido de 2.5 μ M. El péptido es ligeramente más activo a los pHs extremos. La escasa variación del efecto correlaciona con la ausencia de grupos titulables en la secuencia del péptido.

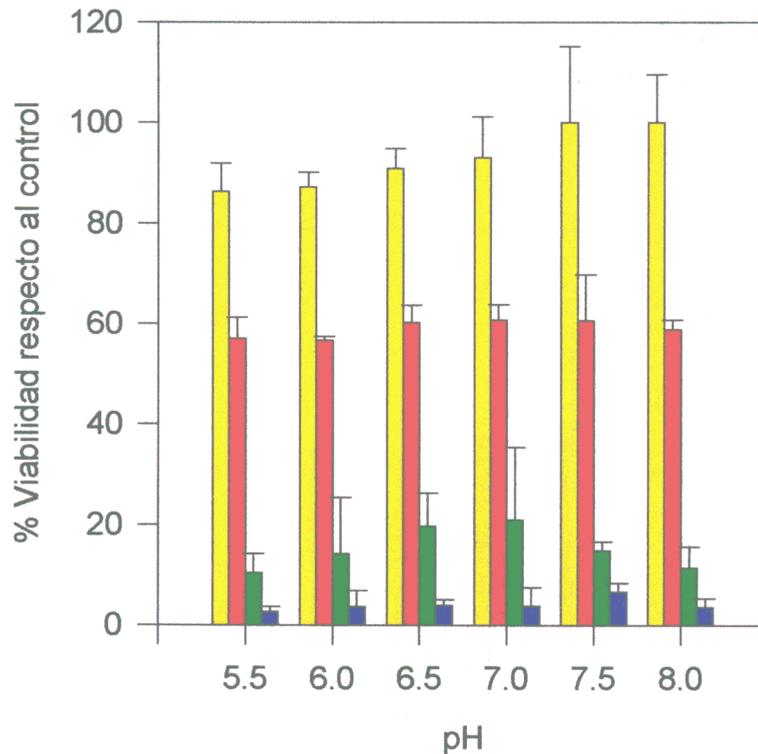


FIGURA 10.- Efecto del pH extracelular en la acción de CA(1-8)M(1-18) con promastigotes de *Leishmania donovani*. CA(1-8)M(1-18) ■ 0 μ M, ■ 1 μ M, ■ 2.5 μ M y ■ 5 μ M.

4.2.5. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA

La primera interacción entre el péptido catiónico y la membrana es de naturaleza electrostática (Christensen et al., 1988). Cuando en el tampón de incubación se minimiza la fuerza iónica por disminución de la concentración de NaCl, se produce un incremento de la efectividad del péptido; a una concentración de 2 μM de CA(1-8)M(1-18) y en ausencia de NaCl la viabilidad de los promastigotes es de un 10%, mientras que a concentraciones cercanas a las presentes en el medio Hanks la viabilidad aumenta hasta un 55% (figura 11). La osmolaridad se mantuvo mediante concentraciones de sorbitol.

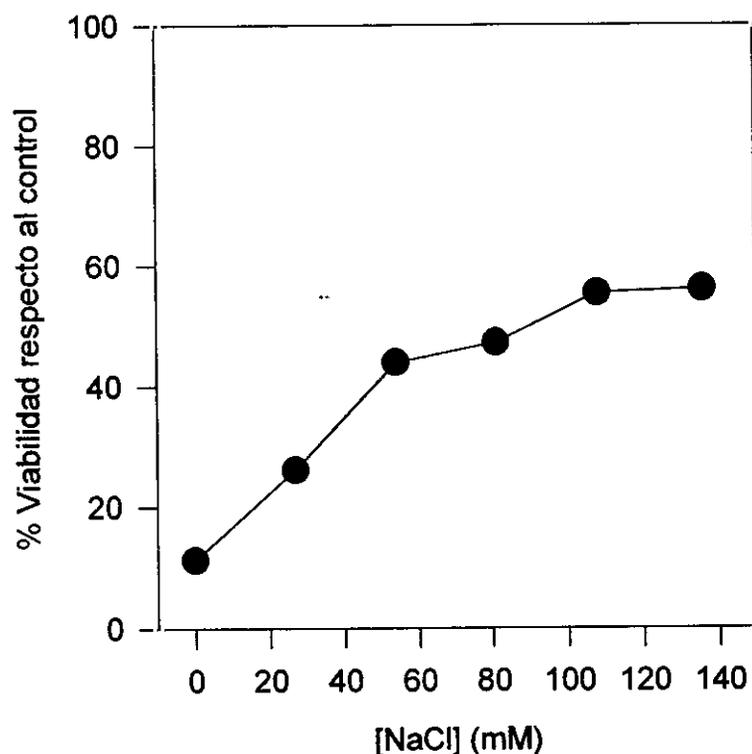


FIGURA 11.- Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de CA(1-8)M(1-18) a 2 μM sobre promastigotes de *Leishmania donovani*.

4.3. ALTERACIONES DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA DE LEISHMANIA.

Uno de los principales efectos de los péptidos híbridos cecropina A-melitina es el incremento de la permeabilidad de membrana tanto en organismos vivos (Steiner et al., 1982), en orgánulos aislados como mitocondrias (Hugosson et al., 1994; Díaz-Achirica et al., 1994) o en membranas modelo (Christensen et al., 1987; Fink et al., 1988; Mancheño et al., 1996).

4.3.1. INCORPORACIÓN DE PROLINA

Los promastigotes acumulan prolina en contra de gradiente de concentración por un sistema de simporte con translocación de protones (revisado por Zilberstein, 1993); cualquier alteración de la permeabilidad de membrana puede afectar tanto al gradiente de pH a través de la membrana como al potencial de membrana (Ψ), los dos componentes implicados en el mantenimiento de capacidad energética por translocación de protones.

El transporte de prolina se estimó mediante acumulación de prolina en el interior de los promastigote de *Leishmania donovani* a lo largo del tiempo. Los promastigotes incorporan el 50% de la prolina transportada por los promastigotes control en presencia de una concentración de péptido de 2.5 μ M, dicha diferencia se incrementa incluso a tiempos más largos (figura 12). Como control negativo se incubaron promastigotes con valinomicina a una concentración de 2 μ M, que actúa colapsando el potencial de membrana al permeabilizarla para K^+ . En este caso los niveles de transporte de prolina fueron de 3-5 veces menos respecto a los promastigotes no tratados y de 2.5 veces menos con respecto a los incubados con el péptido; consecuentemente el colapso de potencial de membrana producido por el péptido no es total.

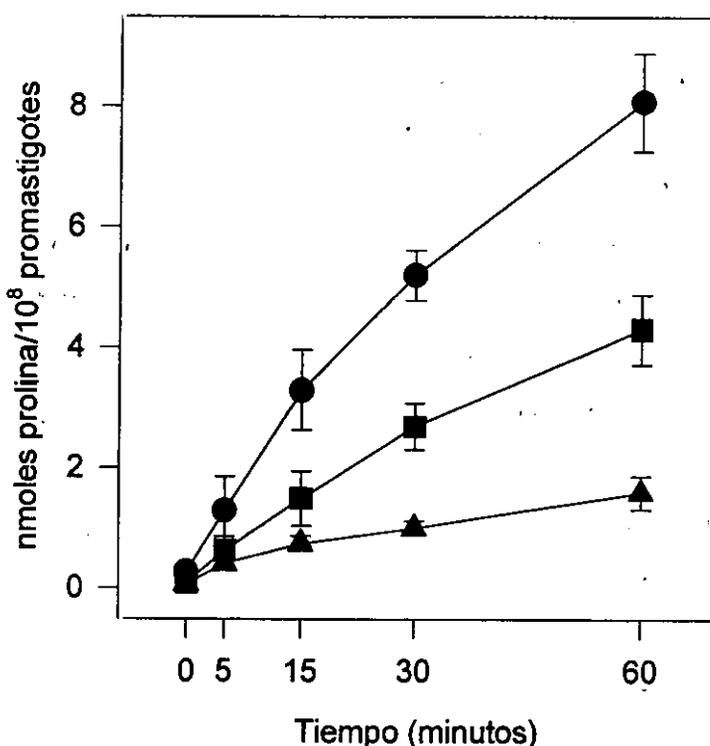


FIGURA 12.- Cinética de la incorporación de prolina en promastigotes de *Leishmania donovani*. ● Control, ■ CA(1-8)M(1-18) 2.5 μ M, ▲ valinomicina 2 μ M.

4.3.2. VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE Ca^{2+} INTRACELULAR

En membranas modelo la permeabilidad inducida por cecropina A se basa en la formación de canales discretos dependientes de voltaje con una relación de conductividades $\text{Cl}^-:\text{Na}^+$ de 2:1 (Christensen et al., 1988); sin embargo en mitocondria aislada de hígado de rata hemos observado permeabilidad a Ca^{2+} y a metabolitos de mayor peso molecular (Díaz-Achirica et al., 1994); por otra parte, melitina, uno de los péptidos parentales es capaz de actuar sobre la ATPasa dependiente de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Baker et al., 1993); una ATPasa semejante ha sido descrita en *Leishmania*, posiblemente localizada en el retículo endoplásmico (Vercesi y Docampo, 1992).

El efecto del péptido sobre la concentración de calcio intracelular fue medido en

promastigotes resuspendidos en soluciones con y sin calcio, y que previamente habían sido incubados con FURA-2 como marcador intracelular, los resultados se muestran en la figura 13. El péptido CA(1-8)M(1-18) a una concentración de 5 μM y en presencia de EGTA 1 mM no supone un aumento significativo de la concentración del calcio intracelular, medido como aumento en la fluorescencia de la sonda.

Cuando los ensayos se realizan en presencia de Ca^{2+} 1 mM se produce un aumento de la fluorescencia respecto a la basal, de 3, 4 y 5 a una concentración de péptido final de 1, 2.5 y 5 μM respectivamente, lo que implica que el péptido induce un equilibrio entre los niveles de Ca^{2+} intracelular y extracelular, ya por entrada de Ca^{2+} externo y/o liberación de la sonda. Sólo en el caso de la concentración más baja de péptido, la adición posterior del ionóforo A-21387 produce un nuevo aumento de fluorescencia, es decir, que el péptido a concentraciones letales no permite el equilibrio completo del calcio.

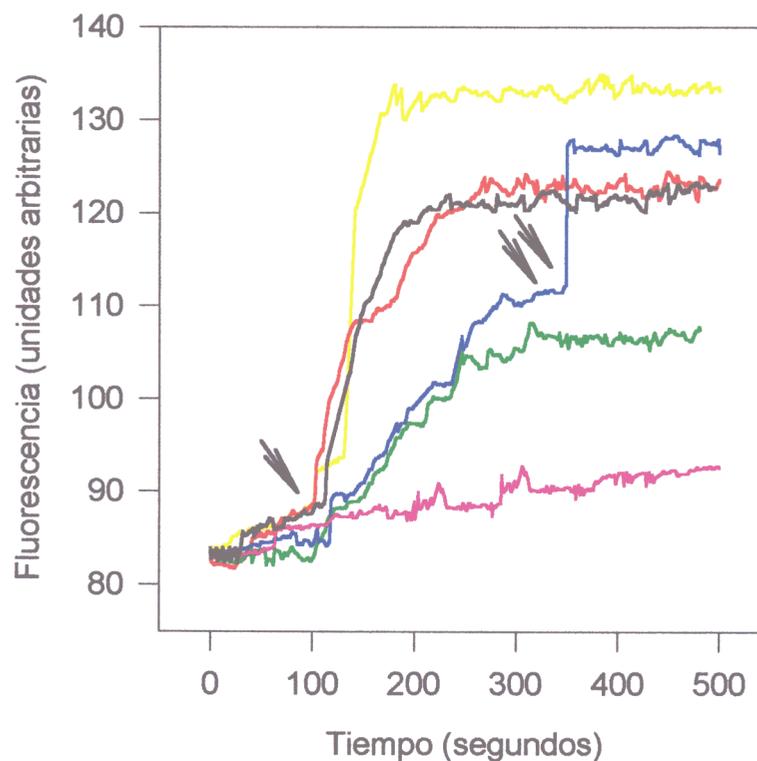


FIGURA 13.- Variación de los niveles de calcio intracelular en promastigotes de *Leishmania donovani* a diferentes concentraciones de CA(1-8)M(1-18). La flecha indica en momento en el que se adicionó el péptido. — 5 μM ; — 2.5 μM ; — 1 μM ; — Ionóforo A-21387 a 5 μM ; — sobre una concentración de 1 μM de péptido se adicionó el ionóforo a 5 μM (indicado con dos flechas); — efecto de 5 μM del péptido en presencia de EGTA 2 mM.

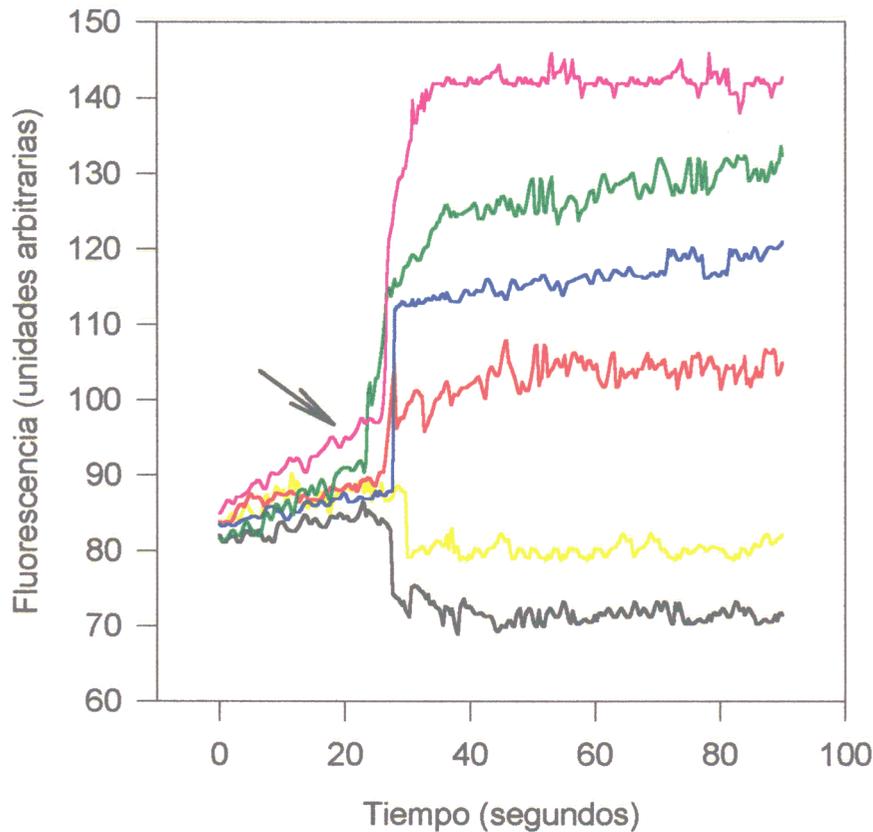


FIGURA 14.- Variación del pH intracelular de promastigotes de *Leishmania donovani* por efecto de CA(1-8)M(1-18) a una concentración de 2.5 μ M. Los promastigotes fueron resuspendidos en tampones a diferentes pHs; — pH 8.0; — pH 7.5; — pH 7.0; — pH 6.5; — pH 6.0; — pH 5.5. La flecha indica el momento de adición del péptido.

4.3.3. EFECTO DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE EL pH INTRACELULAR

El pH interno de *Leishmania* presenta una homeostasis a lo largo de un amplio rango de pH extracelular, por ATPasa H^+/K^+ y por intercambio aniónico, principalmente de Cl^- y HCO_3^- (Zilberstein et al., 1989; Vieira et al., 1994).

La variación del pH intracelular de los promastigotes de *Leishmania donovani* por acción de CA(1-8)M(1-18), fue medida por la fluorescencia de BCECF, dependiente de pH, y atrapada

en el interior de los promastigotes. La sonda fue introducida dentro de los promastigotes en forma de éster permeable a través de la membrana plasmática e hidrolizado por esterasas citoplásmicas, generando grupos carboxilo cargados negativamente que dificultan su transporte al exterior de la célula. La curva de calibración de intensidad de fluorescencia-diferentes pHs se realizó mediante permeabilización de promastigotes con Triton X-100.

La figura 14 representa las variaciones de la intensidad de fluorescencia de promastigotes a diferentes pHs tras la adición de CA(1-8)M(1-18) a una concentración final de 2.5 μM . El péptido provoca un rápido equilibrio entre el pH intracelular y el extracelular, con el consiguiente incremento de fluorescencia para pHs superiores al pH intracelular y disminución cuando el pH extracelular es inferior. El BCECF no queda secuestrado en ningún orgánulo interno, ya que la permeabilización total de la célula por adición de Triton X-100 no aumenta la fluorescencia.

4.3.4. MEDIDAS DE ATP INTRACELULAR

Uno de los efectos más tempranos de péptidos que provocan incremento de la permeabilidad de membrana, es el colapso del potencial de membrana y disminución de los niveles de ATP al intentar recuperar los gradientes iónicos disipados.

Los niveles intracelulares de ATP de promastigotes de *Leishmania* tratados con péptido a 1 μM y 5 μM sufren una pérdida rápida de los niveles intracelulares del mismo, siendo mayor a una concentración de 5 μM (figura 15, gráfica A), en el caso de 1 μM la pérdida inicial de ATP se mantiene constante a lo largo del tiempo.

En las medidas de ATP con los promastigotes transfectados la pérdida de luminiscencia debida al ATP es inmediata a la adición del péptido, excepto a una concentración de 0.2 μM que presenta una pérdida gradual semejante a la disminución de luminiscencia del control, aunque más notable. La disminución aparente de los niveles de ATP observada en los parásitos transfectantes con luciferasa es mayor que la obtenida por extracción del ATP total.

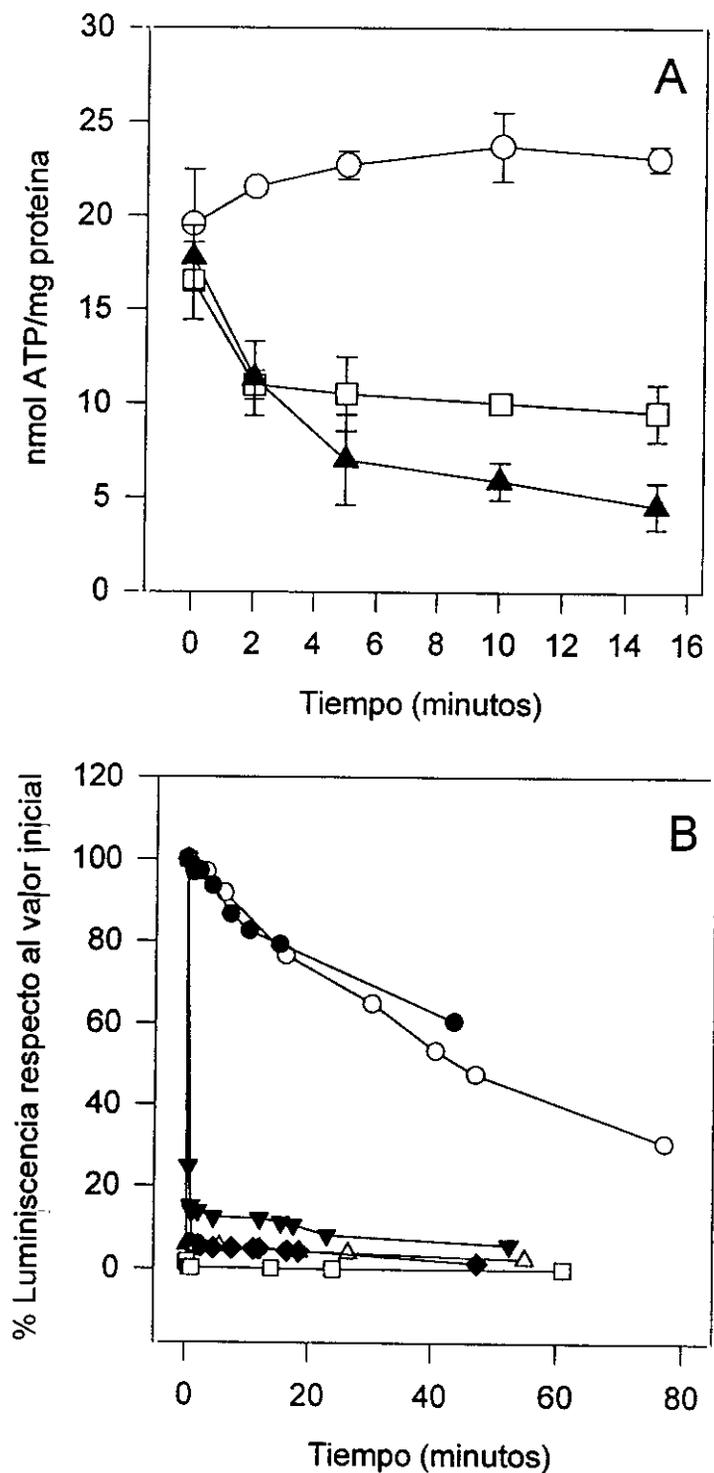


FIGURA 15.- Gráfica A: niveles de ATP de promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18). El ATP fue evaluado según el método descrito en Materiales y Métodos (punto 3.5.4.). \circ Control; \square péptido 1 μM ; \blacktriangle péptido 5 μM . **Gráfica B:** medidas de ATP "in vivo" en parásitos transfectados con luciferasa en presencia de DMNPE-luciferina a 25 μM . \circ Control; \square péptido 5 μM ; \blacktriangle péptido 2.5 μM ; \blacktriangledown péptido 1 μM ; \blacklozenge péptido 0.5 μM ; \bullet péptido 0.2 μM .

En los espectros de ^{31}P NMR (figura 16) se observa que los niveles de ATP libre en el citoplasma son muy bajos, indicando que parte se encuentra asociado a otro tipo de estructuras celulares. En el espectro A correspondiente a los parásitos "in vivo" no se observa ningún pico identificable con ATP, sólo en el caso de la extracción con ácido perclórico se identifica el β ATP (indicado con la flecha en el espectro B de la figura 16). γ y β ATP sólo son visibles cuando al extracto se les añade una concentración de 0.1mM de ATP comercial (espectro C, figura 16)

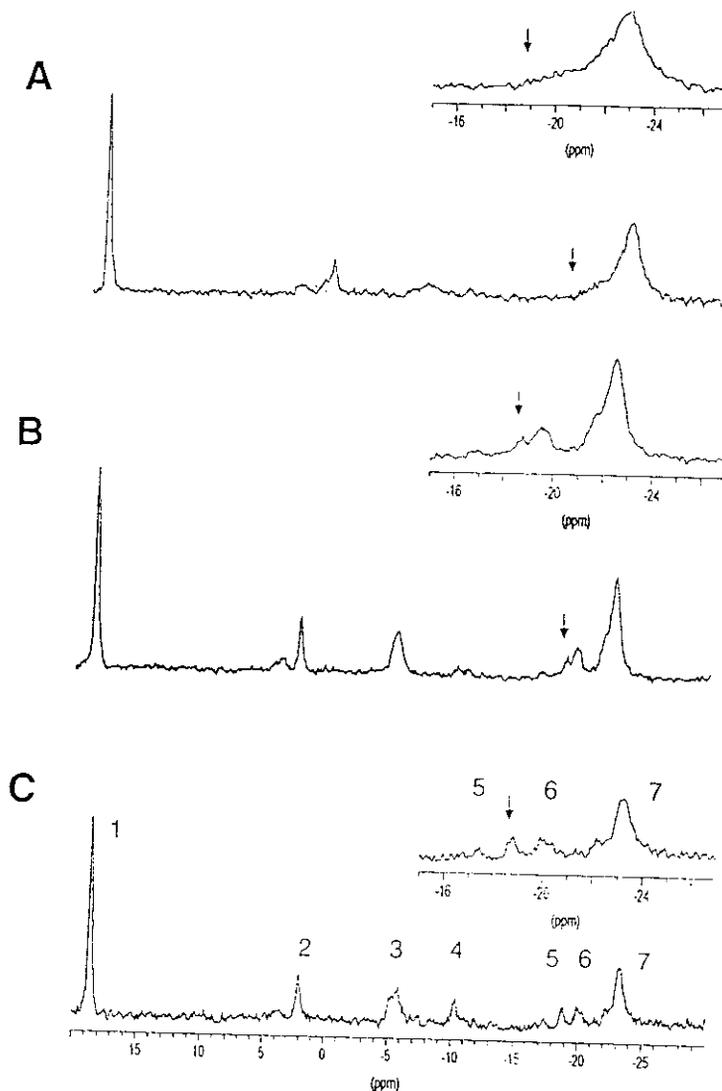


FIGURA 16.- Espectros de ^{31}P RMN (145,78 MHz, 22°C, pH 6.8) de promastigotes de *Leishmania donovani*; A) parásitos "in vivo"; B) extracto de ácido perclórico neutralizado; C) Igual que B con ATP 1 mM. 1.- referencia de ácido metilendifosfónico; 2.- Pi; 3.- fosfatos terminales de polifosfatos; 4.- γ -ATP; 5.- β -ATP; 6.- penúltimos fosfatos de polifosfatos; 7.- polifosfatos de larga cadena.

4.3.5. INHIBICIÓN DE LA VELOCIDAD DEL CONSUMO DE OXIGENO

Los promastigotes presentan un alto grado de respiración basal (49 nmol O₂/min x mg proteína) consecuente con un estado de alta fosforilación preciso para el mantenimiento del rápido movimiento flagelar de estos parásitos. El consumo de O₂ se encuentra asociado a la síntesis de ATP, es decir acoplado a la cadena respiratoria.

La respiración de *Leishmania* es inhibida de manera dosis-dependiente por CA(1-8)M(1-18). En presencia de concentraciones crecientes del péptido CA(1-8)M(1-18) la respiración se enlentece, con una disminución del consumo de oxígeno del 45 y del 70% a unas concentraciones de péptido de 2.5 μ M y de 10 μ M respectivamente. Las diferencias de concentración existentes entre la letalidad obtenida por MTT y estos datos son debidos a la mayor densidad de parásitos requerida para la respiración (2×10^6 contra 10^8 promastigotes/ml) y la acción estequiométrica, y no catalítica, del péptido.

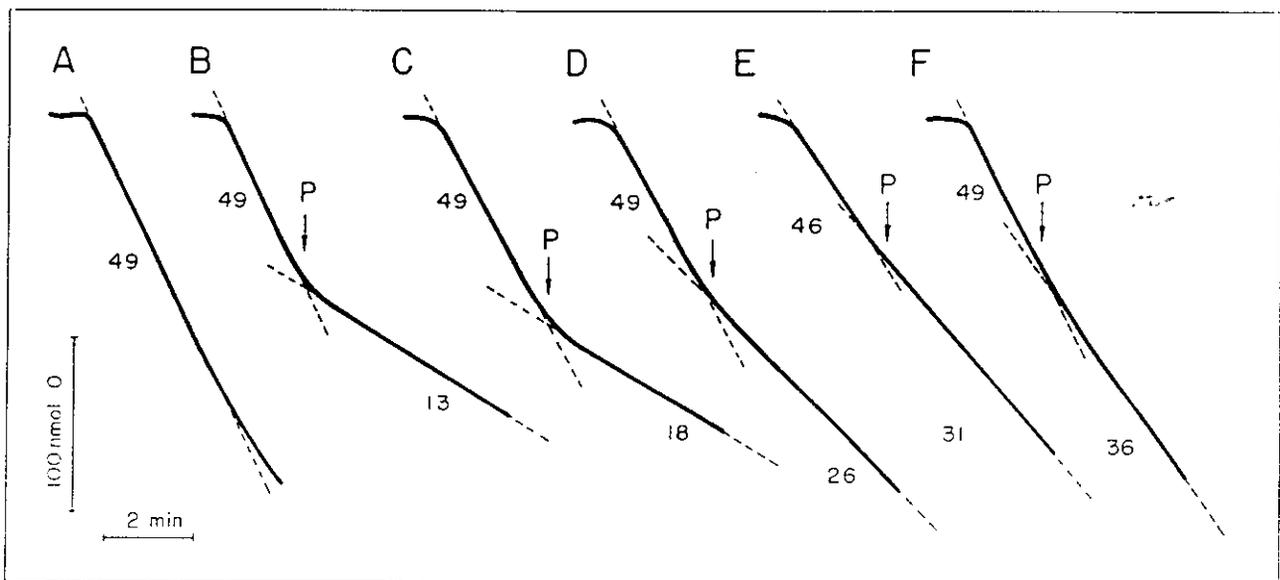


FIGURA 17.- Consumo de oxígeno de promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de distintas concentraciones de péptido. A) control; B) 5 μ M CA(1-8)M(1-18); C) 2.5 μ M; D) 1 μ M; E) 0.5 μ M F) 0.1 μ M. P indica en momento en el que se adicionó el péptido.

4.3.6. VARIACIÓN DEL POTENCIAL DE MITOCONDRIA

La permeabilidad de la membrana plasmática puede inducir cambios en el potencial de mitocondria, tanto por un acceso directo del péptido a la misma, como por provocar permeabilidad a sustratos y cofactores que pueden escapar al medio. Para estudiar si el péptido CA(1-8)M(1-18) influía en el potencial de la membrana de la mitocondria, éste fue medido por acumulación de rodamina 123, una sonda fluorescente catiónica que se acumula en mitocondria bajo la presencia de potencial, y cuantificada por citometría de flujo a una longitud de onda de 525 nm. Los parásitos cargados con la sonda fluorescente e incubados con concentraciones de péptido de 2.5 y 5 μM muestran una subpoblación con menor intensidad de fluorescencia semejante a la inducida con FCCP por disminución del potencial de membrana mitocondrial (figura 18). Sin embargo a concentraciones de péptido que provocan permeabilidad a protones o inhibición del transporte de prolina, la población con disminución del potencial de membrana mitocondrial es muy baja, consecuentemente la fisiología de mitocondria se afecta a concentraciones superiores a las de letalidad del parásito, sugiriendo un efecto secundario y no causa de la muerte celular.

Como control negativo se incubaron promastigotes en presencia de FCCP a una concentración de 7.5 μM .

4.3.7. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA INTERACCIÓN CA(1-8)M(1-18) CON PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA DONOVANI*

En el mecanismo de permeabilización de membranas modelo planas por cecropina A, los canales discretos observados precisan la existencia de un potencial electrostático transmembrana, que serviría para la reorientación de la región del extremo amino terminal cargada positivamente, adquiriendo una disposición vertical y constituyendo la pared del poro formado (Christensen et al., 1987). Otros péptidos, como las defensinas son incapaces de provocar permeabilización en ausencia de potencial de membrana (Wimley et al., 1994; White et al., 1995).

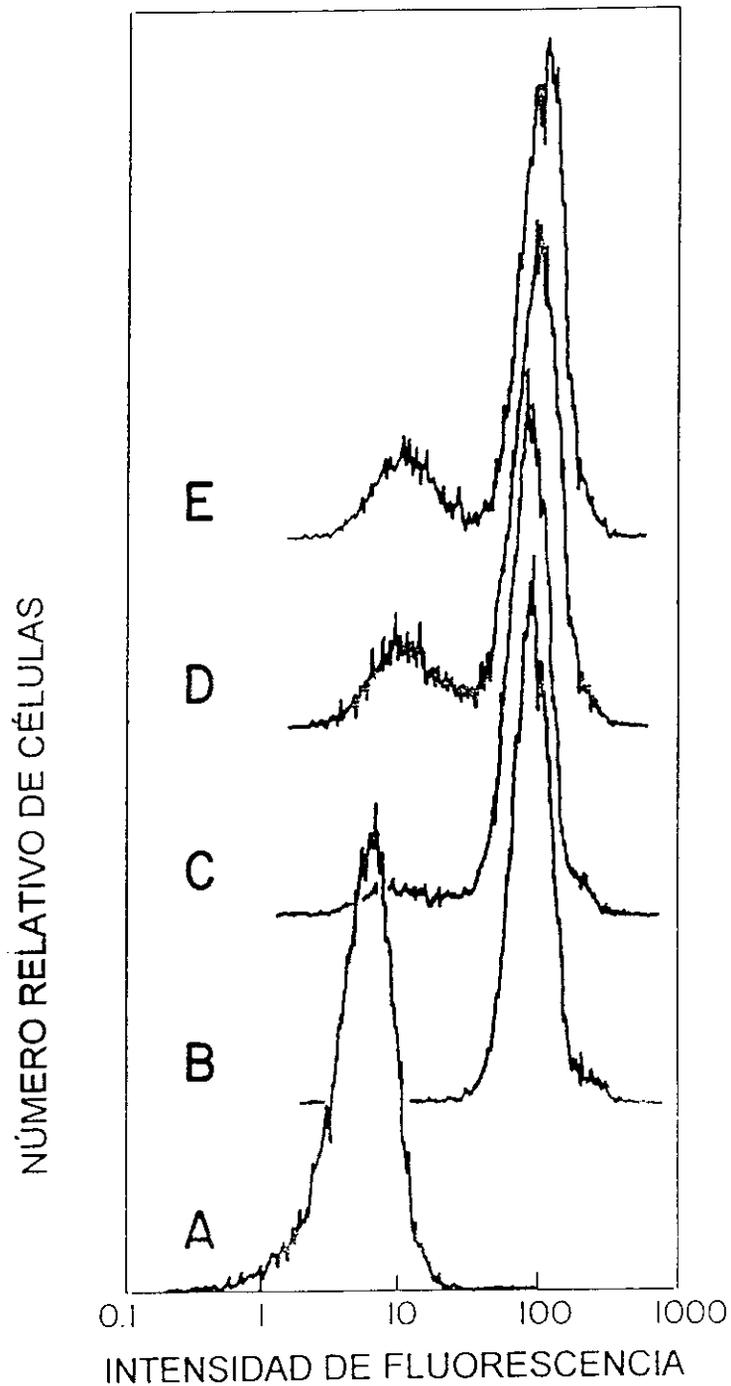


FIGURA 18.- Potencial de mitocondria de promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de distintas concentraciones de péptido medido por citifluorimetría. A) control negativo, promastigotes con FCCP 7.5 μ M; B) Control; C) CA(1-8)M(1-18) 0.5 μ M; D) 2.5 μ M, E) 5 μ M.

El potencial de membrana se colapsa por la adición de valinomicina, un ionóforo para potasio; bajo este estado de despolarización, se estudió la interacción del péptido CA(1-8)M(1-18) en promastigotes previamente incubados con concentraciones crecientes de valinomicina; la disipación del potencial de membrana por valinomicina incrementa la viabilidad de los promastigotes frente a CA(1-8)M(1-18) (figura 19). Debido a la acción tóxica del ionóforo, se realizó, de forma paralela, un estudio sobre la viabilidad del parásito a las concentraciones utilizadas.

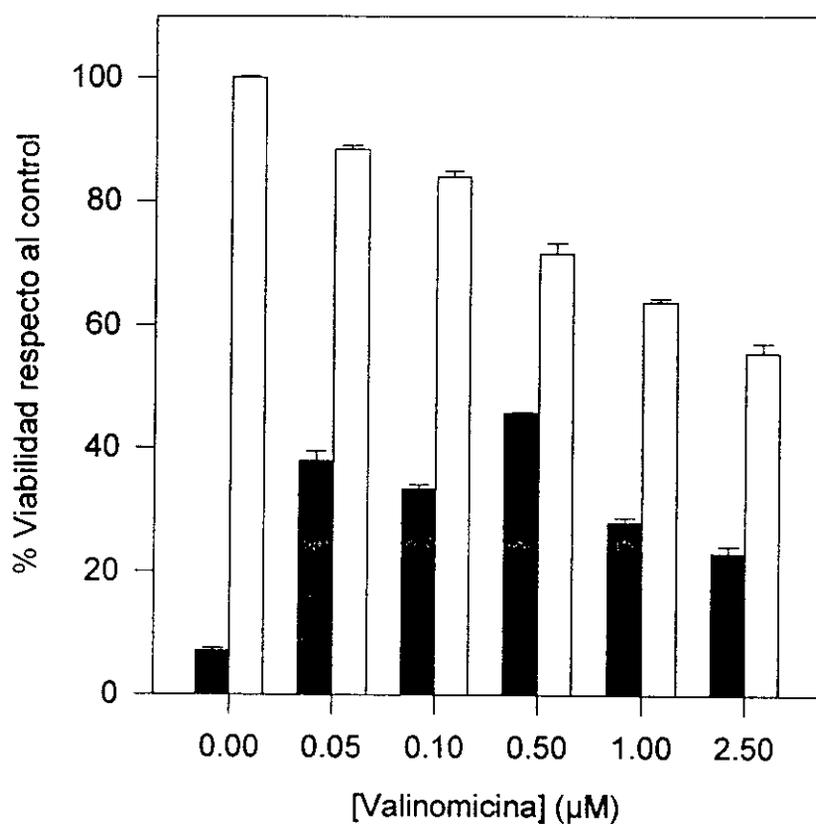


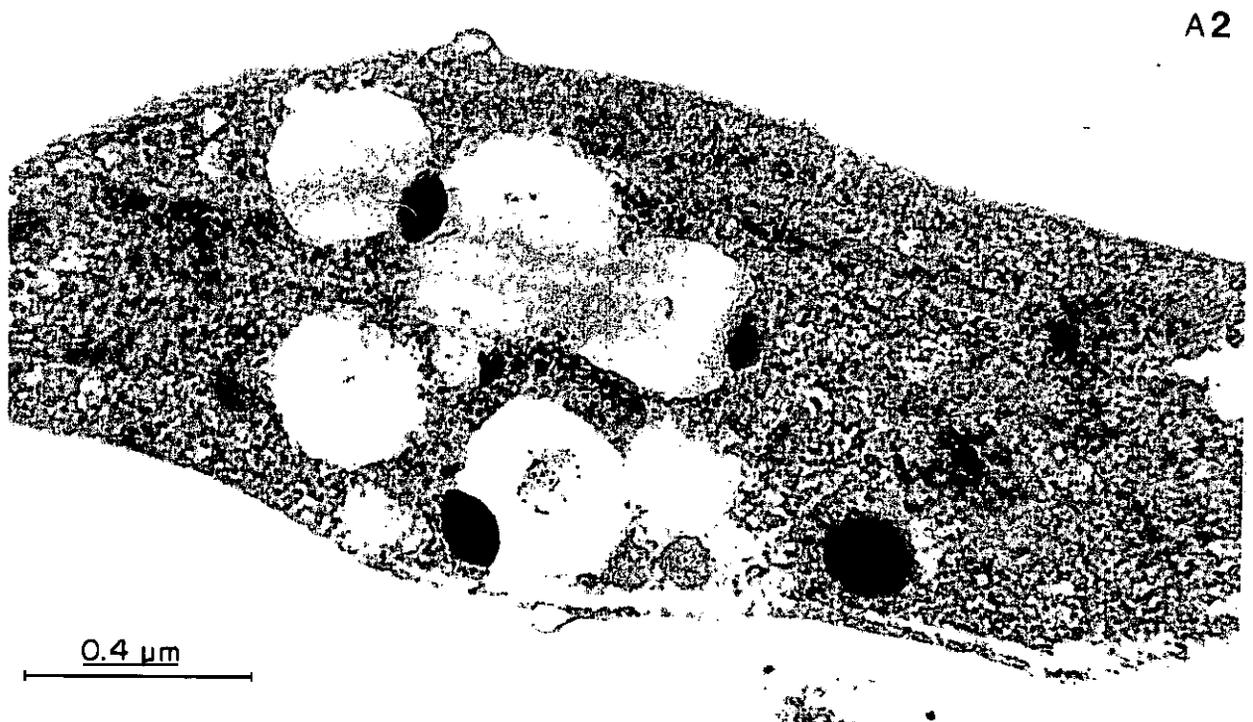
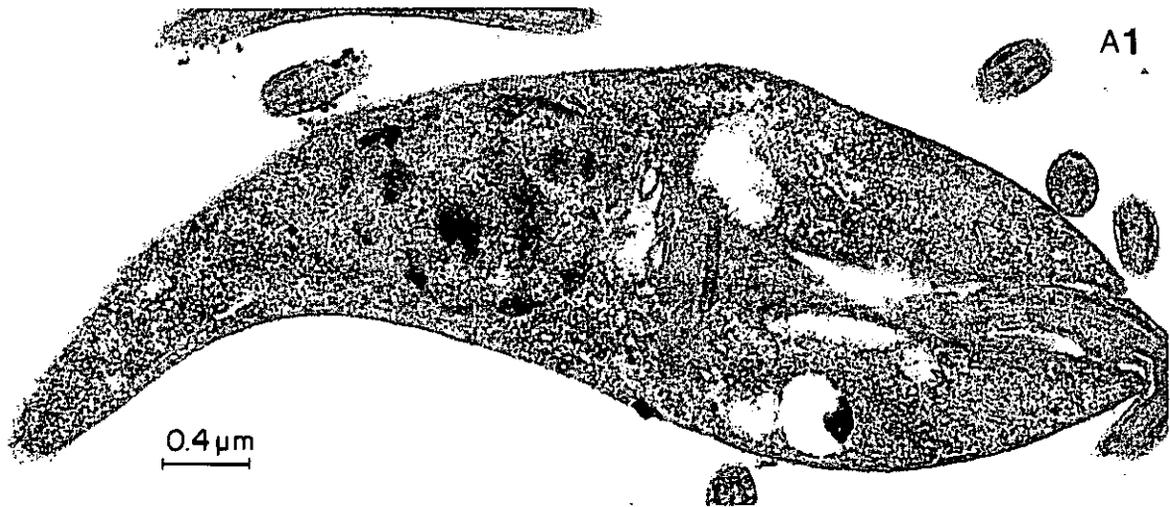
FIGURA 19.- Influencia del potencial de membrana en la acción del péptido. Los promastigotes fueron incubados con distintas concentraciones de valinomicina. En ausencia [□] o presencia [■] de CA(1-8)M(1-18) 2.5 µM.

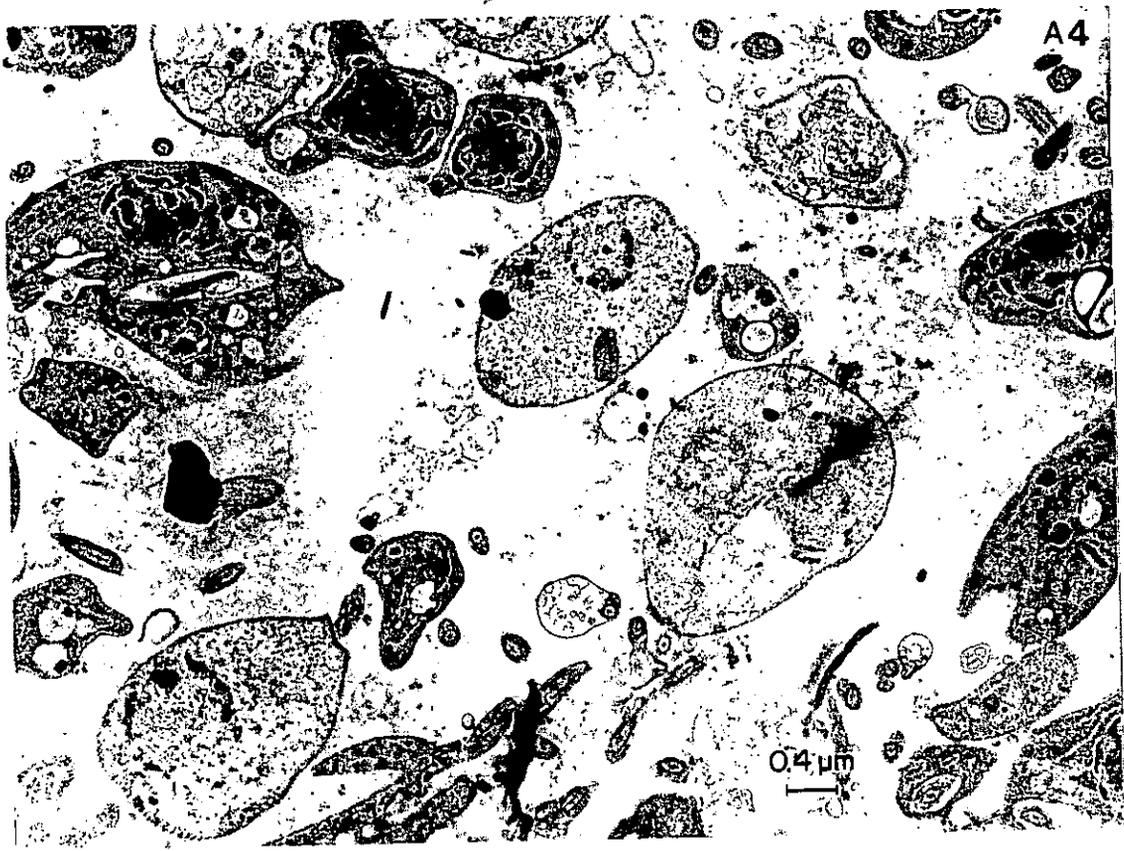
4.4. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

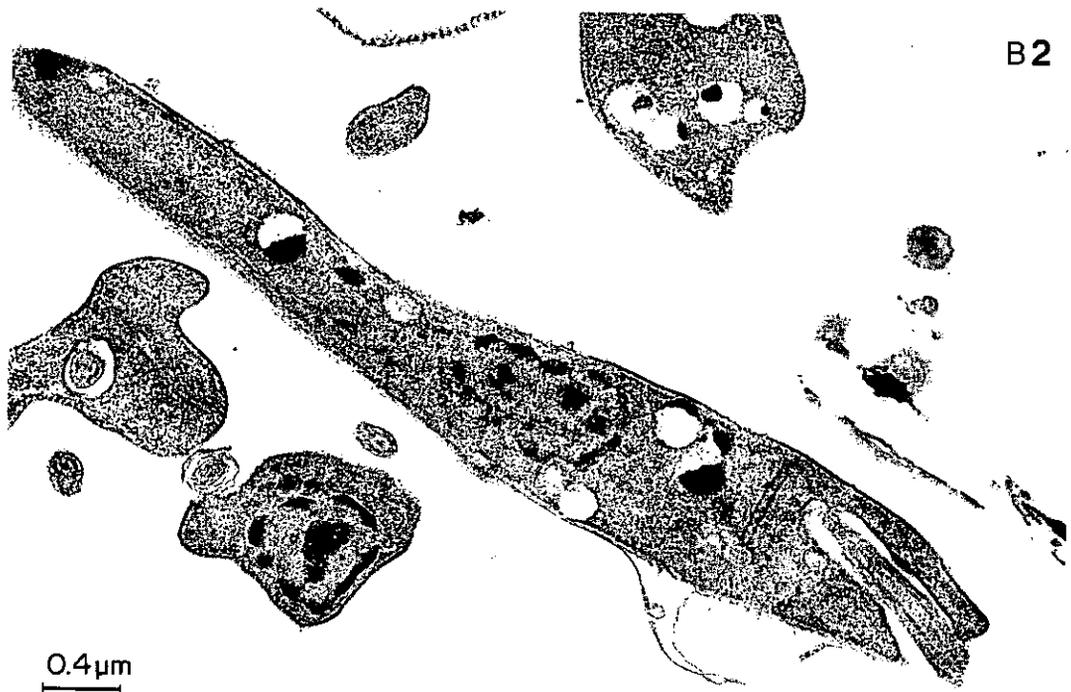
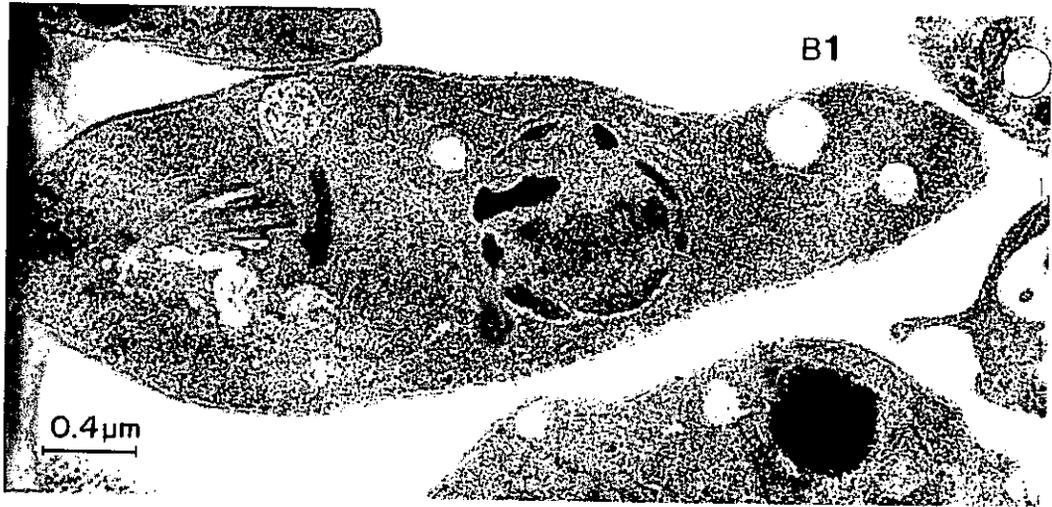
La única estructura de especialización funcional de la membrana plasmática del promastigote de *Leishmania* es el bolsillo flagelar, donde nace el flagelo, que se encuentra desprovista de microtúbulos subpeliculares y donde se realizan las funciones de endo- y exocitosis. Los datos anteriores indicaban un daño funcional de la membrana plasmática del parásito y la definían como diana principal del mismo; para comprobar si tales efectos reflejaban un daño morfológico, se estudió la estructura del parásito por microscopía electrónica tras tratamiento con CA(1-8)M(1-18). Los resultados se pueden observar en las micrografías electrónicas de la figura 20.

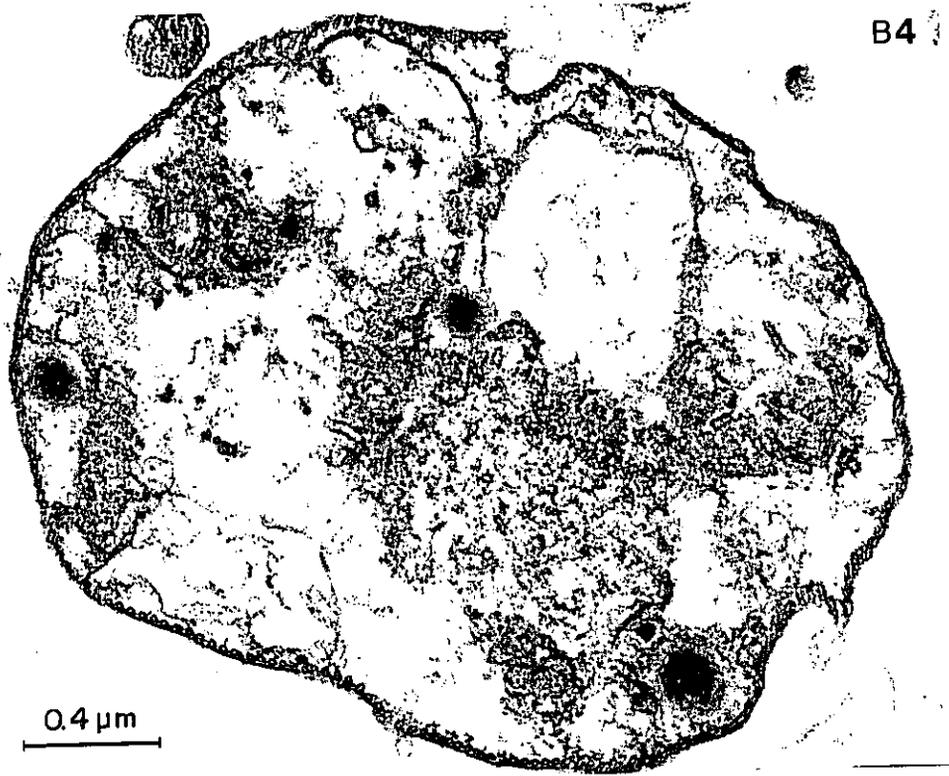
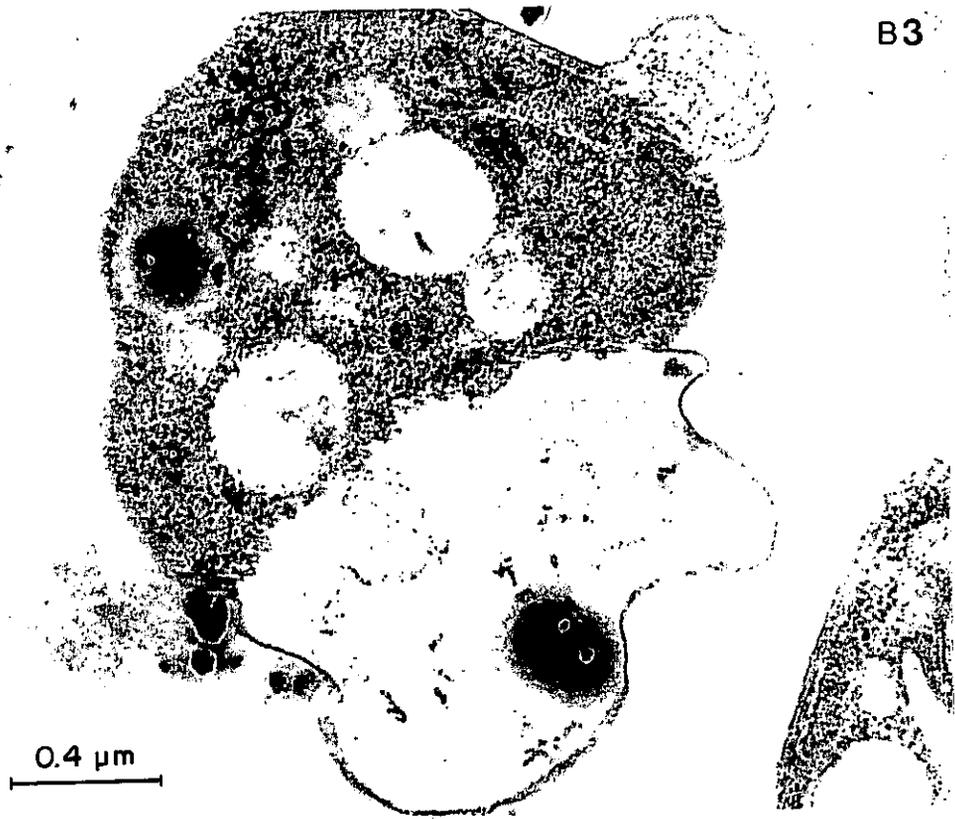
En el citoplasma aparecen una serie de espacios transparentes a los electrones, algunos rodeados por una membrana mientras que otros parecen ser simplemente acúmulos de material refringente. Pero lo más llamativo son las evaginaciones que aparecen en la membrana a manera de burbujas formadas por separación de la membrana, sin que los microtúbulos subpeliculares presenten ningún tipo de alteración, el tamaño de estas evaginaciones aumentan con la concentración de péptido. A 5 μ M el daño celular es muy aparente; la mayoría, pero no la totalidad de los parásitos aparecen como “fantasmas”, con grandes pérdidas de material y orgánulos citoplásmicos, pero conservando íntegro el sistema microtubular subpelicular y flagelar. El daño morfológico es más aparente en el caso de la cepa mutante, R2D2 de promastigotes de *Leishmania donovani*, deficitaria en LPG.

FIGURA 20.- Fotografías de microscopía electrónica de promastigotes de *Leishmania donovani* tratados con distintas concentraciones del péptido CA(1-8)M(1-18), serie A: cepa salvaje, serie B: cepa mutante R2D2. 1) Control; 2) 0.5 μ M, 3) 2.5 μ M, 4) 5 μ M.









4.5. INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE “STRESS”

El patrón de proteínas que presentan los promastigotes marcados metabólicamente y tratados con el péptido CA(1-8)M(1-18) presenta similitud vaga con el obtenido cuando se someten los promastigotes a un aumento de temperatura, figura 21. En el gel de poliacrilamida se aprecian bandas con masas moleculares semejantes a las proteínas de “heat-shock” inducidas por incubación de los promastigotes a 42° C; estas proteínas aparecen a concentraciones bajas que apenas afectan a la viabilidad celular medida por reducción de MTT, pero sí a la síntesis de proteínas. Según aumenta la concentración del péptido se intensifican una serie de bandas en relación al control y más notoriamente en el control de temperatura, estas bandas presentan unas masas moleculares aparentes de 150, 90, 70, 62, 40 y 24 kDa. En promastigotes de *Leishmania* se han descrito la síntesis de proteínas de “heat-shock” en condiciones de “stress” como por ejemplo hsp60 y hsp70, si bien esta última se expresa constitutivamente. Otra diferencia es que en los promastigotes incubados a 42°C la síntesis de tubulina (55 kDa) está muy disminuida, mientras que en los tratados con el péptido no se observan diferencias relativas respecto al control.

4.6. EFECTO DE SUSTANCIAS POLIANIÓNICAS EN LA ACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA DONOVANI*

4.6.1. EFECTO DE LA HEPARINA.

La heparina es un oligosacárido fuertemente sulfatado, con una alta densidad de carga negativa en la molécula; heparina y moléculas derivadas, como el heparan sulfato inhiben la acción de defensinas en membranas biológicas (Lichtenstein et al., 1988), y el número de cargas negativas del LPS de la membrana externa de bacterias Gram- influye en la efectividad de la magainina 2 (Rana et al., 1991), de cecropina (Vaara y Vaara, 1994) y defensinas (Lehrer et al., 1989). En la membrana plasmática de los promastigotes de *Leishmania* se encuentra un polianión natural, el LPG con densidad considerable de carga negativa.

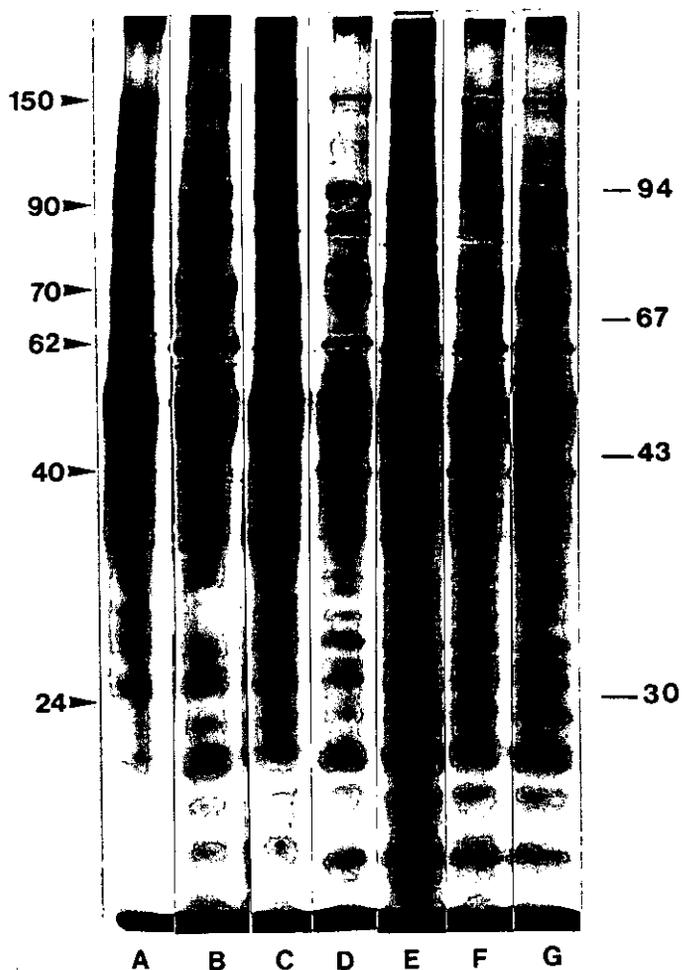


FIGURA 21.- Patrón de proteínas de promastigotes tratados con distintas concentraciones del péptido CA(1-8)M(1-18); A) control; B) control de temperatura; C) 0.1 μ M; D) 0.5 μ M; E) 1 μ M; F) 2.5 μ M; G) 5 μ M. A la derecha del panel se indican los pesos moleculares de marcadores comerciales mientras que a la izquierda se indican las bandas que se intensifican tras el tratamiento con el péptido.

La presencia de 0.2 mg/ml de heparina protege a los promastigotes del efecto de 2.5 μM del péptido (figura 24, gráfica 1), y dicha protección es máxima cuando el péptido y la heparina han sido incubados por espacio de 15 minutos previos a su adición a los promastigotes, con porcentajes de viabilidad del 80%. La adición separada y simultánea de heparina y péptido triplica el valor de supervivencia del parásito (40%) en ausencia de heparina.

El consumo de oxígeno de promastigotes de la cepa salvaje de *Leishmania donovani* se inhibe en presencia del péptido, como ya se ha mencionado anteriormente. Cuando se añaden 0.2 mg/ml de heparina previamente a la adición de una concentración de 5 μM del péptido, se produce una protección frente a la acción desacoplante de la respiración producida por el péptido (figura 22).

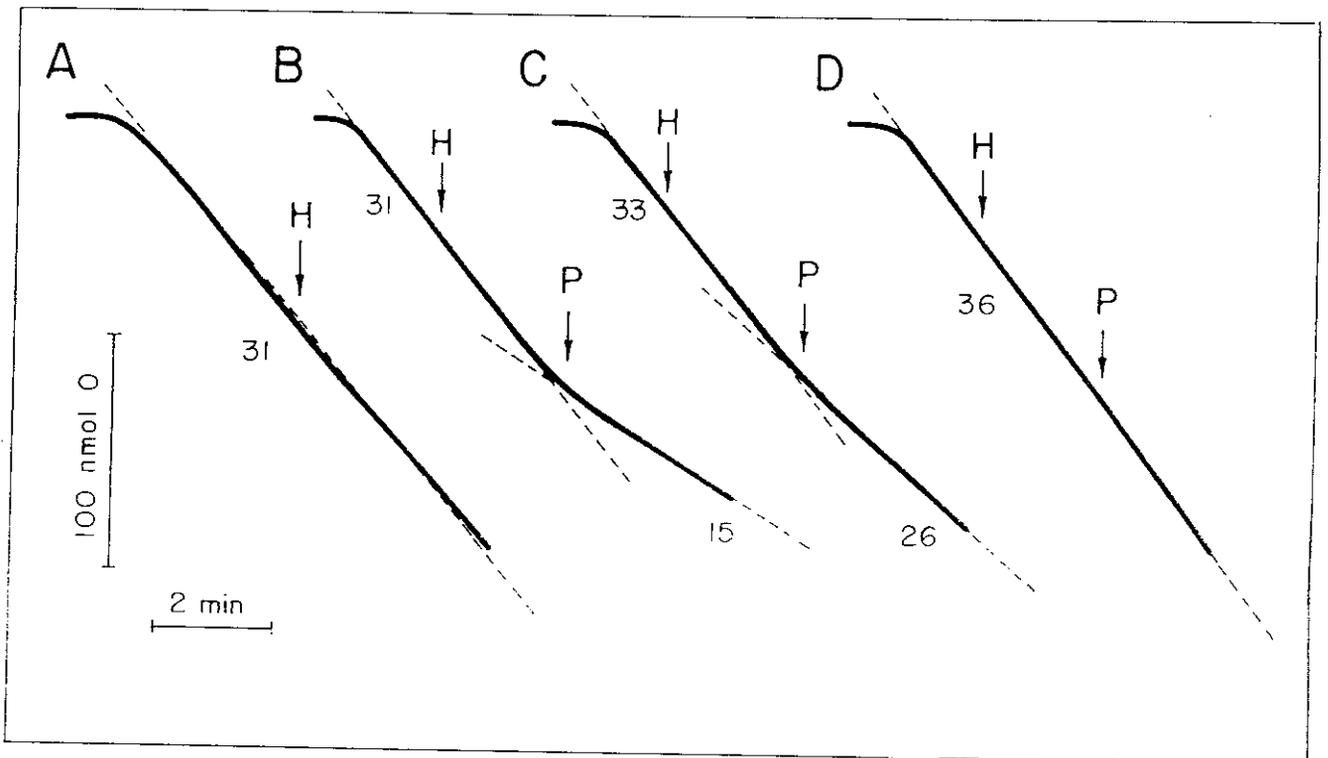


FIGURA 22.- Inhibición del consumo de oxígeno en promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de heparina por CA(1-8)M(1-18). A) control; B) CA(1-8)M(1-18) 5 μM ; C) 2.5 μM ; D) 1 μM . H y P indican los momentos en los que se adicionó la heparina a 0.2 mg/ml y el péptido respectivamente.

4.6.1.1. ACTIVIDAD DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE EL MUTANTE R2D2 DE *LEISHMANIA DONOVANI* DEFICIENTE EN LA BIOSÍNTESIS DE LPG

Conforme a los datos de inhibición por polianiones se planteó la hipótesis de la intervención del LPG, como polianión más abundante en la membrana de los promastigotes de *Leishmania donovani*, en la interacción del péptido. El estudio de mutantes deficientes en biosíntesis de esta molécula nos permitiría comprobar la validez de tal posibilidad. Se utilizó una cepa mutante de *Leishmania donovani* (cepa R2D2) que carece de la estructura repetitiva de unidades de disacárido fosforiladas del LPG (King y Turco, 1988) obtenida mediante mutagénesis del parásito y seleccionada por crecimiento en toxina de ricino y que fue cedida por el Prof. S. Turco (Universidad de Lexington, Kentucky, U.S.A.).

Primeramente se estudió la sensibilidad de la cepa mutante comparada con la parental hacia el péptido CA(1-8)M(1-18). La LD₅₀ de la cepa WT es de 1 µM, mientras que la LD₅₀ para la cepa mutante es menor de 0.5 µM; a esta concentración la cepa parental presenta casi un 95% de supervivencia, mientras que dicho porcentaje en R2D2 requiere la reducción de la concentración a 0.1 µM (figura 23).

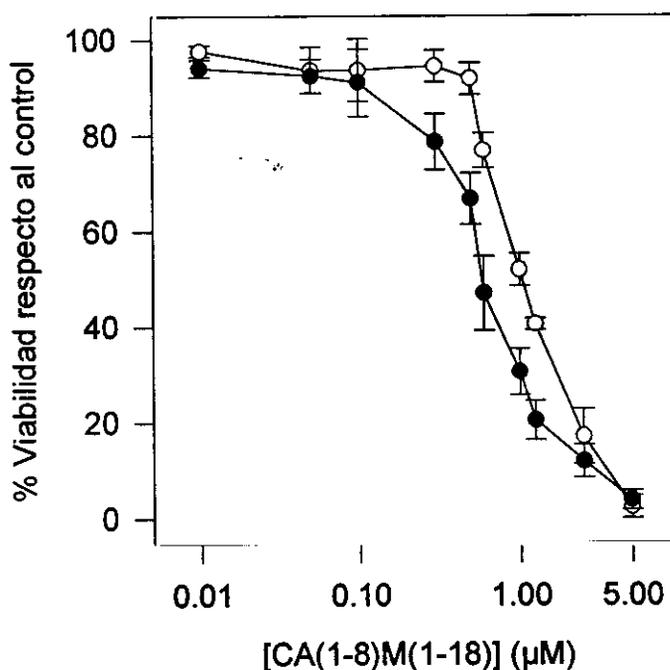


FIGURA 23.- Viabilidad de promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18). ○ cepa salvaje; ● cepa mutante R2D2.

La heparina también protege a las leishmanias deficientes en LPG, aunque como se muestra en la figura 24 (Gráfica 1) el índice de protección es, en general, menor que el que se obtiene usando la cepa salvaje. La adición simultánea no induce un incremento de viabilidad tan considerable, pero sí la preincubación de heparina con el péptido o heparina con el parásito; posiblemente porque la carencia de LPG en su superficie determina una mayor accesibilidad del péptido no acomplexado; pero una vez formado el complejo heparina-péptido los niveles de protección son muy semejantes.

4.6.2. EFECTO DEL LPG, PG Y DEL PG HIDROLIZADO SOBRE LA INTERACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18) CON *LEISHMANIA DONOVANI*

De forma semejante al experimento de inhibición por heparina, se ensayó el posible papel protector del LPG, PG y PG hidrolizado con ácido clorhídrico sobre las cepas parental y R2D2 de *Leishmania donovani* en presencia del péptido; así como la variación ocasionada al alterar el orden de adición de los diferentes componentes.

En el ensayo de la cepa parental con adición conjunta del LPG y péptido, la viabilidad es del 60%, porcentaje similar al obtenido con la heparina, la viabilidad se incrementa hasta el 90% para la incubación del péptido con LPG. La viabilidad de la cepa mutante LPG R2D2 aumenta hasta el 60% cuando el péptido ha sido preincubado con el LPG, mientras que en la preincubación de los promastigotes R2D2 con el LPG se alcanza una viabilidad del 80% (figura 24, Gráfica 2).

La viabilidad de los promastigotes de *Leishmania donovani*, tanto de la cepa parental como mutante R2D2 se incrementa en presencia de polianiones y en orden decreciente de actividad inhibidora que sería heparina >LPG>>PG figura 24 (Gráfica 3). El grado máximo de protección, con la cepa salvaje, se obtiene con los dos tipos de incubaciones sin que se llegue al 60% de viabilidad. La preincubación de péptido y polianión previa su adición a los promastigotes incrementa el grado de protección; dicho efecto es más patente en la heparina que en el PG, lo que sugiere que la unión péptido-polianión se produce más lentamente en el PG que en la heparina, posiblemente debido a la mayor densidad de carga negativa presente en ésta última. Otro dato a considerar es el grado de protección superior logrado cuando R2D2 se incuba con PG (60% respecto al control) que cuando el péptido interacciona previamente con PG y luego es adicionado al promastigote.

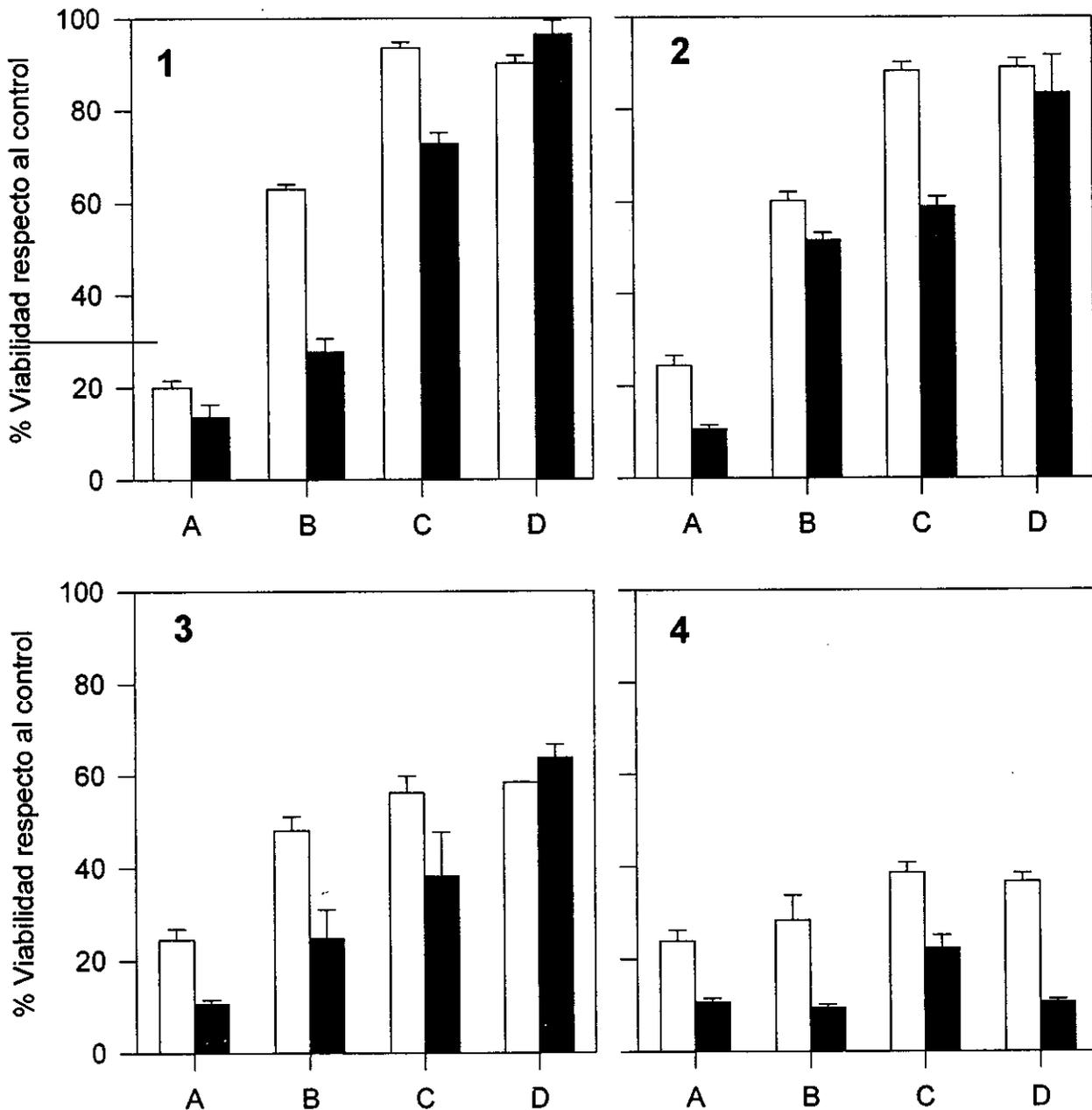


FIGURA 24.- Interacción de sustancias polianiónicas con CA(1-8)M(1-18) 2.5 μ M y su efecto sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania donovani*. Gráfica 1: heparina 0.2 mg/ml. Gráfica 2: LPG 0.3 mg/ml. Gráfica 3: PG 0.3 mg/ml. Gráfica 4: PG 0.3 mg/ml hidrolizado. \square cepa salvaje, \blacksquare cepa mutante R2D2. A) Efecto del péptido, B) Adición conjunta del péptido y el polianión, C) Incubación previa del péptido con el polianión, D) Incubación conjunta de los parásitos con el polianión.

La protección producida por PG es debida fundamentalmente a la unidad repetitiva; cuando se eliminan los enlaces fosfodiéster por tratamiento ácido suave, el incremento de viabilidad es de sólo un 15%, comparado con la molécula intacta; tras la hidrólisis ácida sólo permanece la estructura del núcleo oligosacárido, con sólo una carga negativa debida a un único grupo fosfato figura 24 (Gráfica 4). En la cepa mutante R2D2 la hidrólisis de PG destruye completamente el efecto protector del molécula frente al péptido.

4.7. CAMBIOS CONFORMACIONALES DE CA(1-8)M(1-18) INDUCIDOS POR COMPUESTOS POLIANIÓNICOS

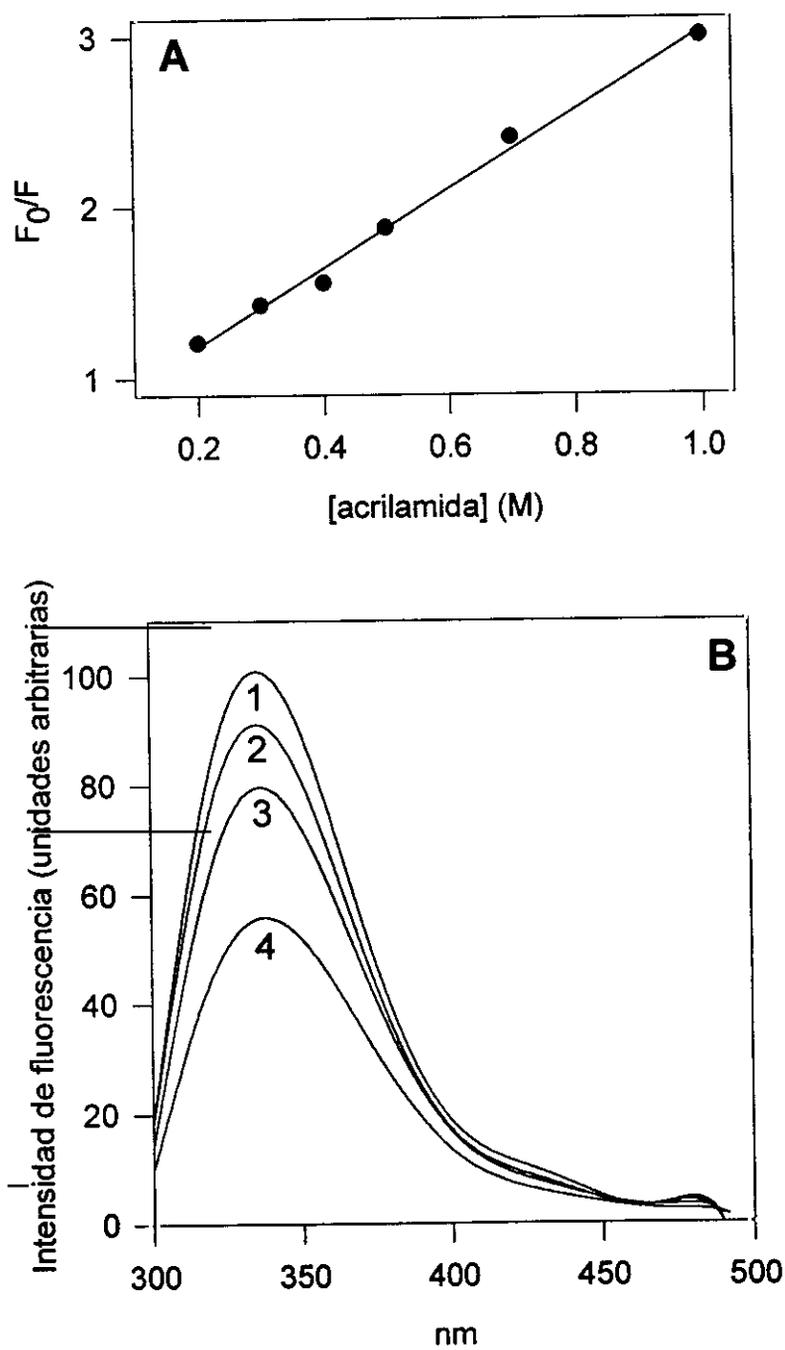
La presencia de sustancias polianiónicas en el medio modulan la interacción de CA(1-8)M(1-18) con los promastigotes de *Leishmania donovani*; lógicamente supone un componente electrostático de unión péptido-polianión por neutralización de cargas que puede conducir a cambios conformacionales del péptido en la estructura secundaria global del mismo, o más sutiles por el cambio de ambiente alrededor del único residuo de triptófano, con cambios en la espectro de fluorescencia de emisión.

El péptido nativo presenta una curva de desactivación dinámico provocada por la acrilamida, de tal manera que en el gráfico de Stern-Volmer (figura 25, gráfica A), existe una pérdida de la fluorescencia, dependiente de la concentración de acrilamida, debido a una mayor interacción entre ella y el residuo de triptófano, siendo la K de la recta de 2.3

El espectro de fluorescencia del triptófano en posición 2 del péptido sufre modificaciones en presencia de heparina; a una concentración de heparina de 0.2 mg/ml, la fluorescencia en el máximo del triptófano disminuye y sufre un desplazamiento hacia longitudes de onda menores, indicativo de un cambio de ambiente más hidrofóbico; la explicación más plausible es una agregación del péptido favorecida por la neutralización de cargas (figura 25, gráfica B).

En presencia de distintas concentraciones de PG también se observa el mismo fenómeno

disminuyendo la intensidad de fluorescencia del triptófano, si bien el desplazamiento en la longitud de onda es menos evidente (figura 25, gráfica C).



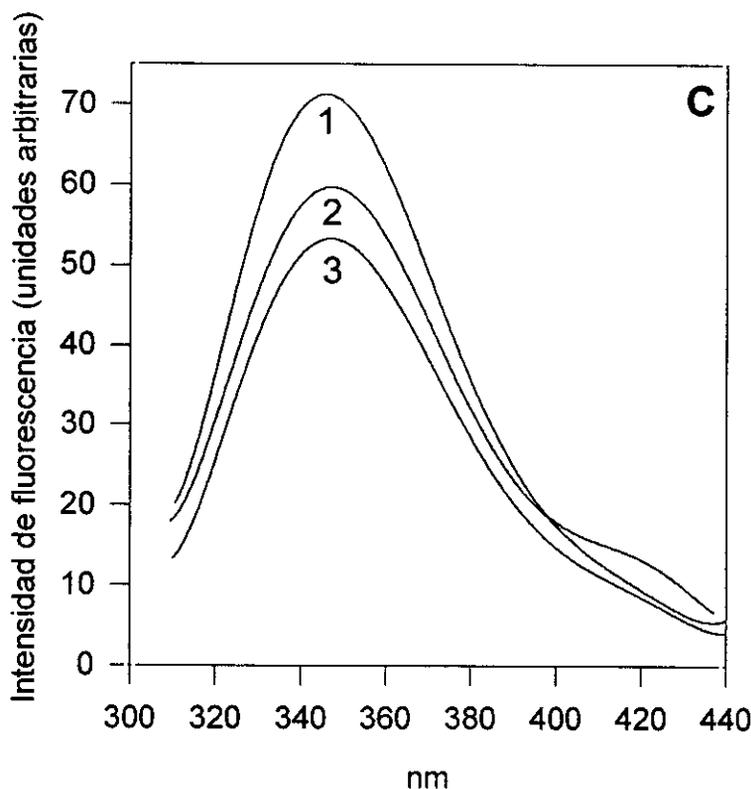


FIGURA 25.- Espectro de fluorescencia del triptófano 2 del péptido CA(1-8)M(1-18). Gráfica A.- Diagrama de Volmer; Gráfica B.- en presencia de heparina; 1) control, 2) 20 µg/ml, 3) 50 µg/ml y 4) 200 µg/ml; Gráfica C.- en presencia de PG; 1) control, 2) 25 µg/ml y 3) 125 µg/ml .

4.8. EFECTO DEL PÉPTIDO CA(1-8)M(1-18) EN LOS DISTINTOS ESTADOS DE *LEISHMANIA*

4.8.1. EFECTO DE CA(1-8)M(1-18) SOBRE DIFERENTES ESTADOS DEL PARASITO

La estructura del LPG es dependiente del estado del parásito; si se compara el LPG obtenido de la fase exponencial de crecimiento con el de la fase estacionaria correspondiente los promastigotes metacíclicos, existe una duplicación en el número de unidades repetitivas existentes en el en

Las diferencias encontradas entre la cepa salvaje y la cepa mutante, deficiente de LPG, de los promastigotes de *Leishmania donovani* nos hizo plantearnos qué ocurriría en las distintas fases

de desarrollo del parásito, ya que el LPG cambia en los distintos estados. Cuando los promastigotes están en fase estacionaria se dobla la longitud del LPG por duplicación del número de unidades fosforiladas sacarídicas (Sacks et al., 1990). En los amastigotes se ha aislado un LPG que se encuentra unido a la membrana por una estructura de glucosilfosfatidilinositol, al igual que en los promastigotes, y que presenta un tamaño intermedio entre el LPG de los promastigotes en fase exponencial de crecimiento y los metacíclicos (Orlandi y Turco, 1987).

En la figura 26 se muestra la viabilidad de los parásitos en las distintas fases del ciclo biológico. En la gráfica A se comparan promastigotes procíclicos con promastigotes metacíclicos, en la gráfica B se comparan amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi* con promastigotes procíclicos de esta misma especie. Mientras que la LD₅₀ de péptido en los promastigotes en fase exponencial de crecimiento es de 1 µM, en los promastigotes metacíclicos aumenta hasta 2.5 µM, pero es mayor en los amastigotes donde alcanza el valor de 5 µM.

4.8.2. EFECTO SOBRE PROMASTIGOTES DENTRO DEL VECTOR

Hembras de flebotomo infectadas con *Leishmania donovani* fueron alimentadas con solución salina conteniendo el péptido a una concentración de 10 µM. Después de 48 horas se diseccionaron los flebotomos observándose que en los tratados con el péptido había una mortalidad de promastigotes cercana al 90% con respecto a los controles (tabla 5).

TABLA 5.- Efecto del péptidos sobre hembras de flebotomo infectadas con promastigotes de *Leishmania donovani*.

	(L)-CA(1-8)M(1-18)	
	10 µM	control
% total infectadas	36,84	37,5
% de infección en válvula estomodeal	26,31	12,5
% mortalidad	90	0

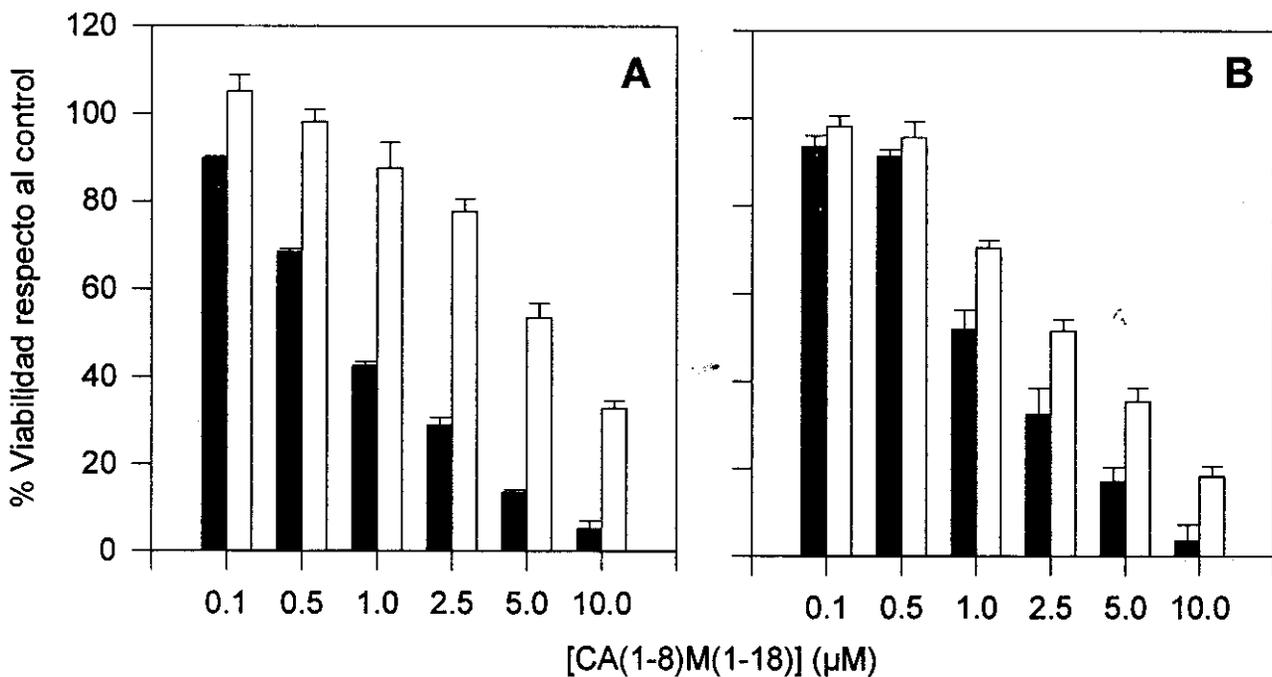


FIGURA 26.- Viabilidad de las distintas formas del ciclo biológico del parásito en presencia de CA(1-8)M(1-18). Gráfica A: promastigotes de *Leishmania donovani* (■) promastigotes procíclicos, (□) promastigotes metacíclicos. Gráfica B: promastigotes procíclicos de *Leishmania amazonensis* (■), (□) amastigotes de *Leishmania pifanoi*.

4.9. EL PÉPTIDO COMO POSIBLE AGENTE TERAPÉUTICO

4.9.1. ACCIÓN SOBRE PROMASTIGOTES MULTIRRESISTENTES A DROGAS

Un estudio preliminar para comprobar si estos péptidos pueden ser usados como agentes terapéuticos fue analizar el efecto sobre una cepa de *Leishmania tropica* resistente a metotrexato (Gamarro et al., 1994) que también presenta resistencia a otros fármacos como daunomicina, debido a sobre expresión de la proteína P. En la figura 27 se muestra como el péptido (L)-CA(1-8)M(1-18) produce un menor efecto sobre la cepa resistente R-150, con una viabilidad superior

a la cepa WT en casi un 20% a una concentración de 2.5 μM . El tratamiento con el análogo D también muestra idéntica tendencia; la cepa resistente posee una viabilidad mayor en un 20% que la salvaje a una concentración de 0.25 μM . Tanto con la cepa WT como con la resistente R-150 el péptido (D)-CA(1-8)M(1-18) produce mayor grado de mortalidad que el análogo L.

Cuando se inhibe la proteína P por incubación de los promastigotes con verapamil a una concentración de 60 μM se consigue un pequeño aumento en la eficacia del péptido entre 5-10% que también se observa en la cepa salvaje que no expresa la proteína P. En ambos casos el efecto leishmanicida aumenta entre un 5 y un 10% (figura 28).

4.9.2. EFECTO SOBRE MACRÓFAGOS INFECTADOS *IN VITRO*

En el hospedador vertebrado *Leishmania* parasita las células macrofágicas del sistema retículoendotelial. La utilización de macrófagos peritoneales de ratón Balb/c o la línea macrofágica J-744 obtenida de estos mismos ratones, simula infecciones "in vitro" semejantes a las naturales. El péptido fue administrado en dos formas diferentes, en solución acuosa y encapsulado en liposomas; con este segundo sistema se perseguían tres fines: 1) Dirigir el péptido hacia el fagolisosoma, donde se encuentran los amastigotes. 2) Evitar que el péptido pudiera actuar directamente sobre la membrana del macrófago, ya que en la literatura está descrito que los péptidos antibacterianos también producen lisis en líneas celulares y células tumorales (Zasloff, 1994; Barra y Simmaco, 1995) y 3) utilizar menor cantidad de péptido.

Como se observa en la figura 29 concentraciones de péptido, 100% líticas en promastigotes pero sólo 40% en amastigotes axénicos, administradas de forma libre a macrófagos infectados reducen la carga parasitaria de éstos a menos del 60% con respecto al control, aunque existe daño evidente de la célula hospedadora (dato no mostrado). Cuando el péptido se administra encapsulado en liposomas la concentración de péptido necesaria para reducir la viabilidad de los amastigotes a menos de un 20% es de 0.1 μM , sin afectación aparente del macrófago.

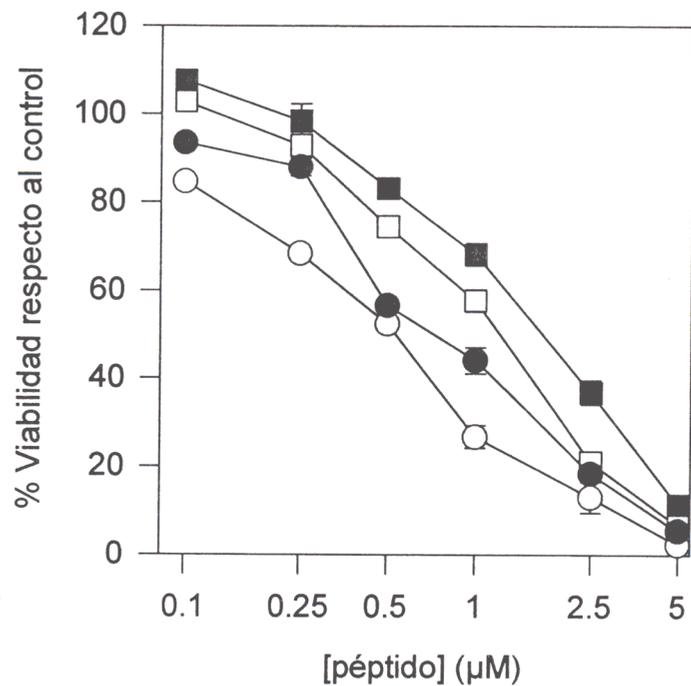


FIGURA 27.- Viabilidad de promastigotes de *Leishmania tropica* en presencia de distintas concentraciones de CA(1-8)M(1-18), tanto análogo L como D. □ cepa salvaje tratada con (L)-CA(1-8)M(1-18); ■ cepa R-150 tratada con (L)-CA(1-8)M(1-18); ○ cepa salvaje con el análogo D; ● cepa resistente R-150 con el análogo D.

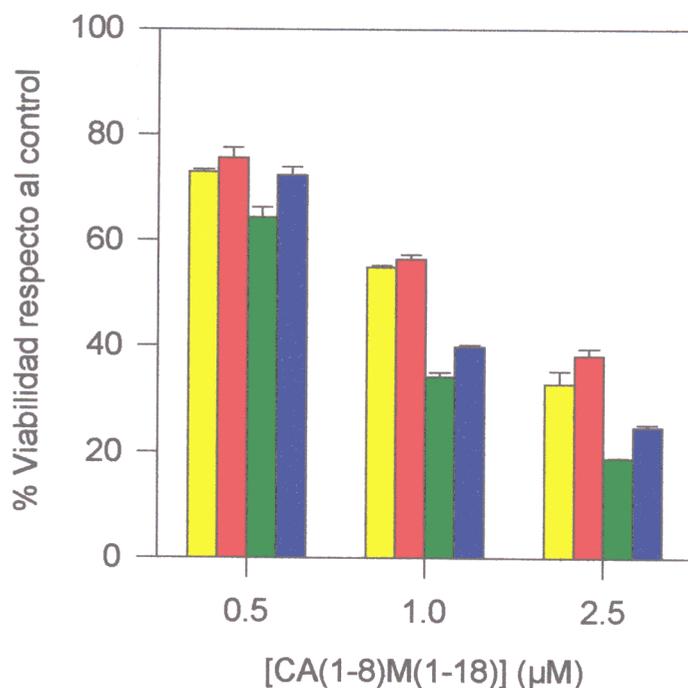


FIGURA 28.- Viabilidad de promastigotes de *Leishmania tropica* (cepa salvaje y R-150) en presencia de CA(1-8)M(1-18). Cepa R-150 con verapamil 60 μM (■); R-150 control (■); cepa salvaje con verapamil 60 μM (■); cepa salvaje control (■).

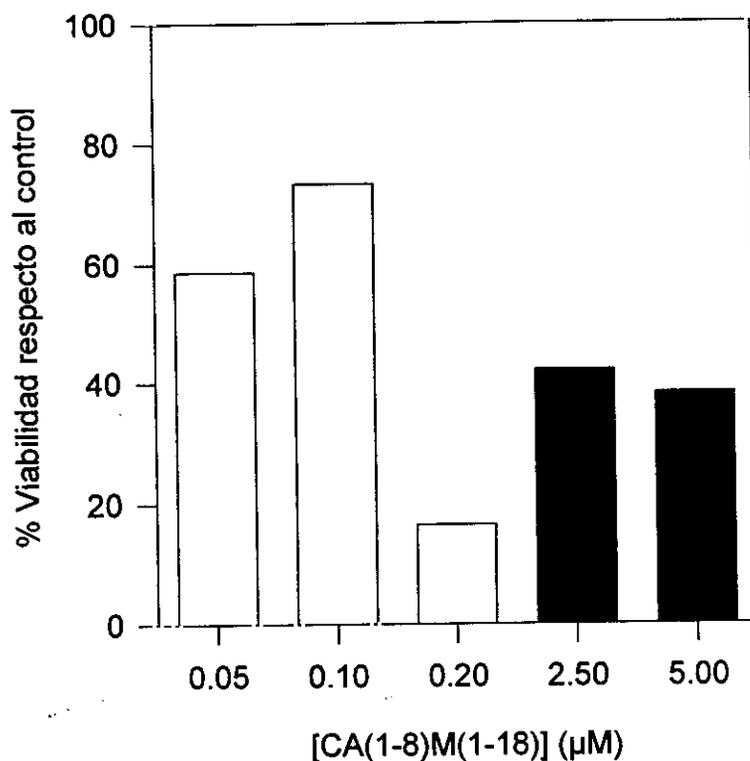


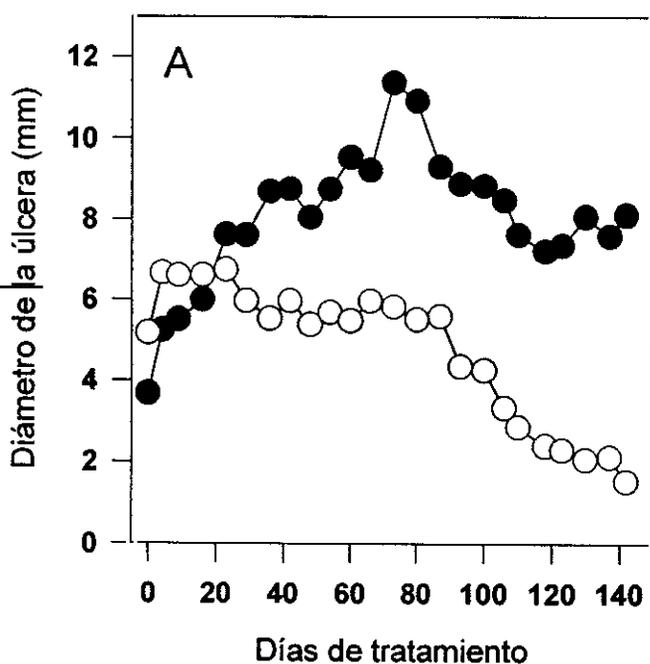
FIGURA 29.- Efecto de CA(1-8)M(1-18) en la viabilidad de amastigotes intracelulares administrado libre (■) o administrado encapsulado en liposomas (□).

4.9.2. TRATAMIENTO DE RATONES

Una vez demostrado que la administración de péptido *in vitro* a macrófagos infectados conseguía reducir la carga parasitaria de los mismos, se realizó el ensayo *in vivo*. Para ello se realizaron dos pruebas independientes con *Leishmania major*, en ratones Balb/c infectados subcutáneamente en la base de la cola. Se escogió un modelo de leishmaniasis cutánea sobre una visceral por ser más cómodo para la aplicación del péptido y seguimiento del tratamiento, y no requerir el sacrificio masivo de los animales. En el ensayo realizado con la cepa (LRC-137) se consiguió la reducción del tamaño de la úlcera en ratones infectados y tratados con péptido a partir del día 25 de tratamiento, hasta el día 85 donde la reducción de la úlcera es muy significativa, llegando casi a

desaparecer por completo (figura 30, gráfica A y figura 31). En los controles la úlcera sufre un aumento progresivo llegando al máximo el día 80, a partir del cual comienza a disminuir. Desde el día 120 se mantiene constante, teniendo la úlcera al final del tratamiento un tamaño casi 8 veces superior al de los ratones tratados con el péptido encapsulado en liposomas. Hay que señalar que los ratones escogidos como control presentaban de partida un tamaño de úlcera menor que los ratones elegidos para la administración del péptido.

En la figura 30 B se observa que en el ensayo realizado con mayor carga p^árasitaria sólo se consigue una evolución más lenta de la infección tanto con la crema con el péptido encapsulado como con el péptido libre, si bien es este último los tamaños de las úlceras siempre fueron los mayores, incluso desde el inicio. El tratamiento durante este ensayo fue más corto debido a que la infección visceralizó causando la muerte en la mayoría de los ratones.



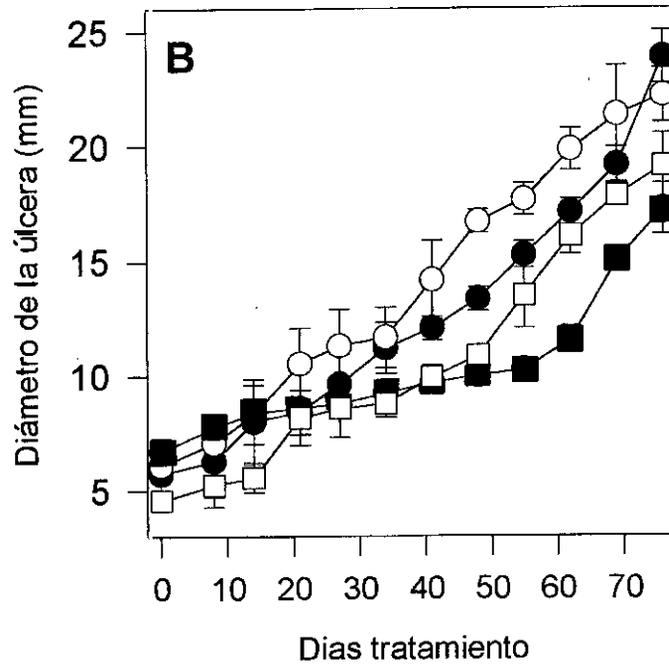


FIGURA 30.- Evolución de las úlceras en ratones Balb/c tratados con el péptido. Gráfica A: infección con 10^6 parásitos, ● ratones no tratados; ○ ratones tratados con crema con péptido encapsulado en liposomas. Gráfica B: infección con 10^7 parásitos, ● ratones no tratados; ○ ratones tratados con crema con liposomas vacíos; □ ratones tratados con crema con péptido libre y ■ ratones tratados con crema con péptido encapsulado en liposomas.

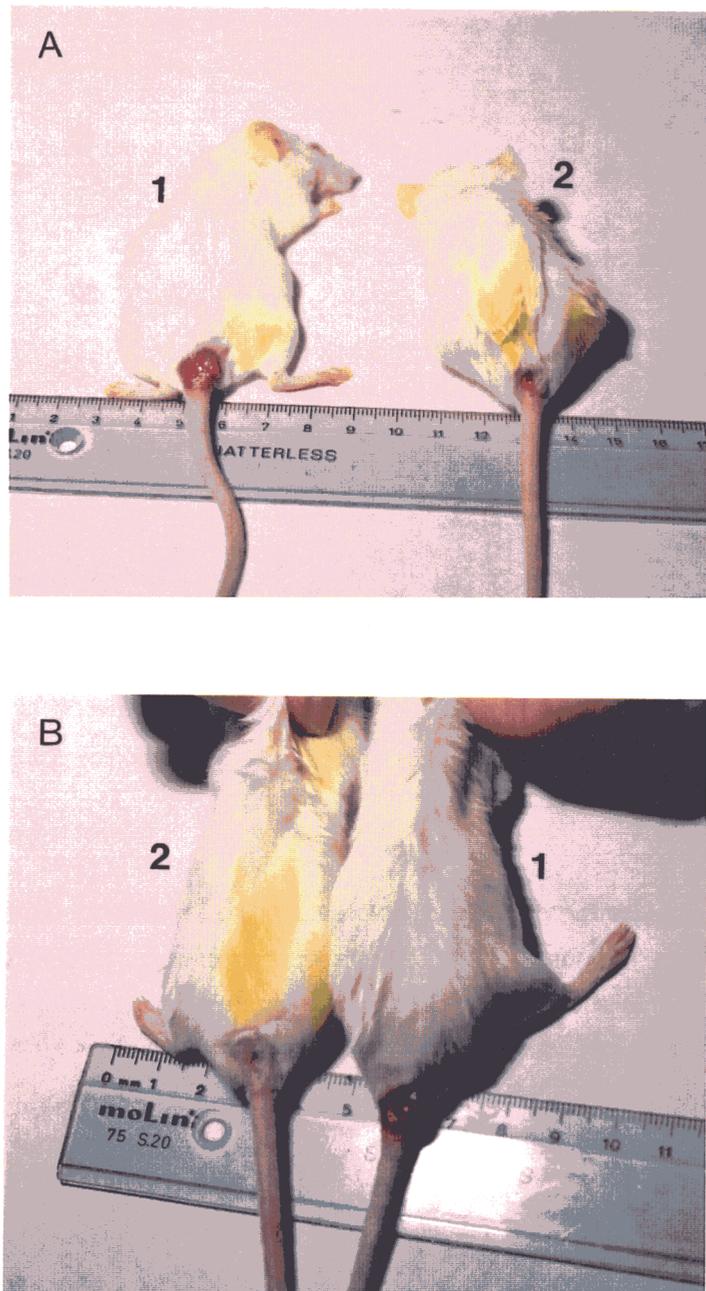


FIGURA 31.- Fotografía de ratones Balb/c infectados con 10^6 promastigotes de *Leishmania major* a los 100 días (panel A) y a los 144 días (panel B). 1) ratón no tratado, 2) ratón tratado con crema con liposomas conteniendo $178 \mu\text{M}$ de CA(1-8)M(1-18).

5. DISCUSIÓN

Los péptidos antibióticos forman parte del denominado sistema inmune no adaptativo, caracterizado por su respuesta inmediata o con periodos de inducción de horas, un espectro de acción sobre microorganismos amplio y carencia de amplificación en sucesivos contactos con el correspondiente patógeno. Estas características son opuestas a la inmunidad adaptativa, cuya inducción es más lenta, el incremento de la eficacia es dependiente de la repetición del estímulo y muestra una alta especificidad de reconocimiento de antígeno por anticuerpo o por receptor de célula T (Janeway, 1994). La importancia de la inmunidad no adaptativa es manifiesta en aquellas situaciones donde la inmunidad adaptativa se encuentra ausente o es menos evolucionada; ejemplo claro son los invertebrados donde únicamente se ha descrito una proteína, la hemolina, relacionada con las inmunoglobulinas, aunque carece de los fenómenos de recombinación génica (Janeway, 1994) que proporcionan a la inmunoglobulinas su alta variedad y consecuentemente especificidad; la defensa de estos organismos depende casi exclusivamente de la inmunidad no adaptativa.

Los péptidos antibacterianos de origen animal presentan una amplia distribución tanto en organismos como en localizaciones anatómicas, aunque las principales fuentes de obtención son la hemolinfa de los insectos (Boman, 1995; Hoffmann, 1995; Hoffmann et al., 1996); los hemocitos de los crustáceos (Iwanaga et al., 1994); las secreciones mucosas de la piel y del estómago de los anfibios (Mor et al., 1991; Simmaco et al., 1993; Clark et al., 1994; Zasloff, 1994; Maloy y Kari, 1995); y los leucocitos y secreciones mucosas de la tráquea (Diamond et al., 1996), mucosa bucal (Schonwetter et al., 1995) e intestino delgado en los mamíferos (Lee et al., 1989; Agerberth et al., 1991; Selsted y Ouellette, 1995; White et al., 1995).

Aunque históricamente los primeros ensayos de actividad antibiótica de estos péptidos se realizaron sobre bacterias, el número de casos de actividad sobre otros microorganismos eucarióticos, incluyendo ciertos tipos celulares de eucariotas superiores, ha incrementado en los

últimos años (ver punto 1.5.4. de la introducción). Debido al pequeño número de aminoácidos y a la carencia de puentes disulfuro, es posible realizar la síntesis química de análogos de estos péptidos antibacterianos que permitan estudiar las relaciones estructura/función y mejorar su actividad antibiótica, ampliando su espectro de acción (Merrifield et al., 1994; Maloy y Kari, 1995). En el presente trabajo se ha estudiado principalmente un péptido sintético híbrido de cecropina A-melitina, formado por los primero 8 aminoácidos del extremo amino de la cecropina A, seguidos de los 18 del extremo amino de la melitina, conservando la estructura de dos α -hélices anfipáticas, una altamente polar y la otra con un mayor dominio hidrofóbico (Andreu et al., 1992).

5.1. EFECTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS EN *LEISHMANIA*

5.1.1. MÉTODOS DE VIABILIDAD

Los péptidos híbridos cecropina A-melitina, formados por la región catiónica N-terminal de la cecropina A seguida por la secuencia hidrofóbica del extremo amino de la melitina, presentan una actividad lítica mayor y contra un rango más amplio de bacterias (Fink et al., 1988; Boman et al., 1989b; Wade et al., 1990; Andreu et al., 1992), careciendo además de la actividad hemolítica de la melitina localizada en la región C-terminal (Blondelle et al., 1993).

Las medidas de viabilidad de los promastigotes de *Leishmania donovani* en presencia de diferentes concentraciones del péptido, se realizaron por tres métodos diferentes. Uno de ellos era la reducción del MTT, debida a las reductasas mitocondriales, mientras que los otros dos procesos, la síntesis de DNA y de proteínas, están relacionados con la viabilidad celular.

A concentraciones de péptido inferiores a la LD₅₀ la síntesis de proteínas muestra una mayor inhibición, posiblemente debido a una pérdida energética o a variaciones en la

homeostasis celular del parásito que interfieren en su metabolismo (Kristensen, 1994) y que conduce a la síntesis preferente de proteínas de "stress"; el péptido antibacteriano PR-39, aislado del intestino delgado del cerdo, produce la muerte de *E. coli* por inhibición de la síntesis de proteínas y de DNA (Boman et al., 1993).

Por otro lado las bajas concentraciones de péptido inducen un aumento en la proliferación de los promastigotes; se han descrito péptidos anfipáticos con capacidad mitogénica en diversos tipos celulares; el mastoparan y Shiva-3 producen la proliferación de fibroblastos 3T3 (Murphy et al., 1993) y SB-37 la proliferación "in vitro" de embriones de ratón (Reed et al., 1992). Este aumento en la proliferación se puede explicar porque a baja concentración de péptido el efecto sobre la membrana, en lugar de producir lisis, facilitaría la entrada iones o alteraciones en la membrana que actuarían como una señal para que la célula entrara en mitosis; se ha descrito que el mastoparán, un péptido antibacteriano aislado del veneno de avispa, activa proteínas G (Higashijima et al., 1988 y 1990; Mousli et al., 1990), estimula la liberación de ácido araquidónico y el crecimiento de células 3T3 (Gil et al., 1991) y en células de pepino también incrementa la actividad de fosfolipasa A₂ y el crecimiento celular de las mismas (Scherer, 1992).

El diferente efecto de CA(1-18)M(1-18) en la síntesis de proteínas y de DNA puede ser explicado por una cierta capacidad de las membranas para reparar el daño producido por el péptido a baja concentración, que permitiría una recuperación de la proliferación celular, medida a las 72 horas, en contraposición a la síntesis de proteínas, medida durante una hora a partir de la adición del péptido, y más sensible al efecto inicial provocado por éste.

La LD₅₀ de CA(1-8)M(1-18) en promastigotes de *Leishmania* se encuentra en el mismo rango que el descrito para las distintas cepas de bacterias testadas (Andreu et al., 1992). La proporción de fosfolípidos ácidos en la membrana plasmática de *Leishmania donovani* es mayor que en otros eucariotas, pero menor que en bacterias (Wasseff et al., 1985), aunque se desconoce su orientación en la membrana. Otro factor importante es la ausencia de colesterol en la membrana de *Leishmania* aunque sí posee hasta un 30% de ergosterol (Hunt y Ellar, 1974; Wasseff et al., 1985).

La cecropina actúa muy rápidamente sobre la membrana; se han descritos tiempos inferiores a 4 minutos como suficiente para producir una muerte del 90% en un cultivo de bacterias (Boman y Steiner, 1981). Los mismos péptidos utilizados en el presente trabajo

presentan cinéticas muy rápidas en experimentos realizados con mitocondrias de hígado de rata (Díaz-Achirica et al.; 1994) y con liposomas (Mancheño et al., 1996); de idéntica forma, la interacción del péptido con *Leishmania* es muy rápida, difiriendo de otros péptidos antibióticos, como las defensinas sobre células tumorales, que requieren la endocitosis del péptido, un periodo de varias horas para producir la muerte celular y es un proceso reversible en las etapas iniciales (Lichtenstein et al., 1988), mientras que en *Leishmania* la unión de CA(1-8)M(1-18) es irreversible; promastigotes tratados previamente con el péptido, y lavados para eliminar el péptido no adsorbido, no recuperan viabilidad tras incubación en medio carente de péptido. Otros péptidos, como las magaininas, muestran procesos de recuperación en interacción con mitocondrias, debido a fenómenos de proteólisis (Juretic et al., 1989); por otro lado, la transposición de péptidos de magainina a la otra cara de la bicapa, justificarían la finalización de procesos de permeabilidad en membrana modelo (Matsuzaki et al., 1995a).

5.1.2. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE ANÁLOGOS DE CECROPINA A-MELITINA

La síntesis química ha permitido mejorar la actividad de nuevos péptidos antibióticos basados tanto en las secuencias naturales como en algoritmos de secuencia. El objetivo final es conseguir una mayor eficacia tanto por una menor concentración letal del péptido como por incremento del rango de microorganismos susceptibles, y disminución del número de residuos, que conlleva una menor inmunogenicidad y abaratamiento con vistas a una aplicación farmacológica de los mismos. En cecropinas se ha realizado un considerable esfuerzo en tal sentido (Andreu et al., 1985a, 1992; Fink et al., 1988; Boman et al., 1989b; Wade et al., 1990), obteniendo una serie de análogos más cortos con alta conservación, o incluso mejora, de su eficacia bactericida.

La mayor actividad leishmanicida entre los cuatro análogos cecropina A-melitina examinados corresponde a CA(1-8)M(1-18). La región correspondiente a la cecropina A se conserva en todos los análogos, a excepción de Ile 8. El péptido correspondiente a la cabeza polar no muestra actividad leishmanicida, incluso a concentraciones muy superiores a las utilizadas con los análogos menos eficaces; otros péptidos y proteínas policatiónicas como

histonas y protaminas presentan efectos bactericidas (revisado por Vaara, 1992); en el caso de polilisinias, la longitud requerida para tal efecto es de aproximadamente 20 aminoácidos; la actividad bactericida de pentalisinas es prácticamente nula, de conformidad con los datos obtenidos en el presente trabajo.

La longitud de la secuencia es importante, considerando la comparación de CA(1-8)M(1-18) con los análogos más cortos, sin embargo no es el único factor; cecropina A de 36 aminoácidos presenta una actividad muy inferior a CA(1-8)M(1-18), conforme a la concentración letal de 100 μ M descrita para *Leishmania aethiopica* (Kimbell, 1991). La actividad de los análogos cortos varía considerablemente dependiendo del fragmento correspondiente de la secuencia de melitina. En todos se ha conservado el motivo VLKVL, esencial para la actividad debido a la pérdida de los mismos en análogos de delección (Blondelle y Houghten, 1991; Cornut et al., 1994).

Aunque el contenido en α -hélice se ha relacionado con la mayor o menor actividad bactericida (Huang et al., 1990), en nuestros análogos los porcentajes en α -hélice son muy semejantes (Andreu et al., 1992). La actividad leishmanicida de los distintos análogos se correlaciona con su acción sobre mitocondrias de hígado de rata (Díaz-Achirica et al., 1994, 1996), así como con la inducción de la óxido nítrico-sintetasa en macrófagos (Velasco et al., en prensa).

La degradación de los péptidos por el promastigote de *Leishmania* podría realizarse mediante la acción de la gp 63, una Zn^{2+} -metaloproteinasa (Schneider et al., 1992). La utilización de proteasas como método de defensa frente a péptidos antibacterianos en *Xenopus* es realizada por una metaloproteinasa de 110 kDa, capaz de reconocer polipéptidos con estructura de α -hélice anfipática de al menos 12 residuos; la especificidad de corte es -X-Lys-, y el resultado es la inactivación del péptido (Resnick et al., 1991). La interacción del péptido con la membrana de *Leishmania* es tan rápida que permitiría únicamente una degradación parcial de los mismos, ya que los análogos D son más efectivos que el correspondiente análogo L, también observado por otros autores con análogos D de melitina, cecropina y magaininas (Wade et al., 1990; Bessalle et al., 1990). La actividad del análogo D demuestra la no existencia de un receptor quiral (Wade et al., 1990).

La melitina es muy activa en *Leishmania* en conformidad con datos anteriores de su

elevada actividad bactericida y hemolítica, aunque ésta última impide su uso terapéutico. La actividad hemolítica se correlaciona con la presencia de un residuo de Trp en el extremo carboxilo-terminal (Blondelle et al., 1993) que está ausente en los análogos estudiados en el presente trabajo.

Por su mayor actividad leishmanicida el péptido elegido para el estudio de los mecanismos de acción y como posible terapia alternativa a la leishmaniasis ha sido el CA(1-8)M(1-18).

5.2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA INTERACCIÓN LEISHMANIA-PÉPTIDO

Una vez demostrado que el mecanismo de acción principal de CA(1-8)M(1-18) era producido a nivel de la membrana plasmática del parásito, se procedió a un estudio de los diferentes factores que intervienen en la misma.

La temperatura es un factor de considerable influencia en la acción lítica del péptido; a 4°C más de un 80% de la actividad leishmanicida de CA(1-8)M(1-18) presente a 25 °C queda inhibida. Dicha dependencia ha sido también observada tanto en membranas modelo, para magaininas (Matsuzaki et al., 1991) y defensinas de insecto (Nakajima et al., 1987); como en organismos vivos, como las defensinas de conejo sobre *Candida albicans* (Lehrer et al., 1985; Selsted et al., 1985), o defensinas humanas sobre células tumorales (Lichtenstein et al., 1986 y 1988; Lichtenstein, 1991); cuyo origen puede deberse a dos causas principales; una, variaciones sobre la conformación o estados de agregación del péptido, y la otra sobre la fluidez de membrana. En la primera es preciso considerar que el nivel de estructuración del péptido a temperatura ambiente y en solución acuosa es muy bajo (Andreu et al., 1992), aunque se conoce que el péptido agrega en macrocomplejos, conforme a datos preliminares de centrifugación analítica, y que existe histéresis dependiente de temperatura observada por IR (A. Muga, datos preliminares); por otro lado la inhibición por bajas temperaturas se observa además en péptidos

con restricciones conformacionales tipo defensinas, debidas a la existencia de enlaces disulfuro, que hace pensar que el principal parámetro afectado es la fluidez de membrana, alterando la penetración del péptido en la membrana, y las interacciones péptido-péptido y péptido-fosfolípido; por otra parte CA(1-8)M(1-18) altera las transiciones de fase existentes en membranas modelo (Mancheño et al., 1996). La curva de actividad del péptido en relación a la temperatura estaría conforme a un cambio de fluidez de la membrana en un rango de temperaturas acorde con el hábitat del parásito, con una transición de fase a temperatura ambiente, en contraposición a la existente a temperaturas más elevadas para homeotermos. La fluidez de membrana en relación a la actividad leishmanicida tiene gran importancia, considerando el papel desempeñado por los esteroides en la regulación de la misma y la selectividad de ciertas drogas utilizadas contra *Leishmania* (ketoconazol, lovastatina), que tienen como blanco etapas biosintéticas de los esteroides, y que podrían sinergizar con la acción farmacológica del péptido (Alcouloumre et al., 1993).

La posible aplicación farmacológica de este péptido requiere considerar su interacción con otros componentes presentes en el medio de incubación; el suero inhibe la actividad tumoricida de péptidos α -hélice anfifílicos (Peek-Miller et al., 1993); y componentes del suero como α -2 macroglobulina (Panyutich y Ganz, 1991) y C1q del complemento interaccionan con defensinas (Panyutich et al., 1994) inhibiendo su unión a células tumorales y lisis de las mismas (Lichtenstein et al., 1988). Otro componente del suero, la seroalbúmina inhibe de manera dosis dependiente la acción de la defensina humana HNP-1 sobre células tumorales (Lichtenstein et al., 1988) y de CA(1-8)M(1-18) sobre *Leishmania*. aunque en este último caso precisa una concentración muy alta y largos tiempos de incubación; presumiblemente la unión péptido-BSA se realiza a través de la secuencia hidrofóbica del péptido, considerando la alta capacidad de unión de compuestos hidrofóbicos por BSA.

Otro componente importante del medio son los cationes divalentes, que pueden actuar sobre los componentes aniónicos de la membrana y competir en la unión del péptido catiónico; la viabilidad de los promastigotes de *Leishmania* aumenta con concentraciones crecientes de Ca^{2+} y, por contra, disminuye en presencia de EDTA; de forma idéntica iones Ca^{2+} inhiben la acción

de defensinas sobre diferentes dianas biológicas (Lehrer et al., 1988). Existe un efecto sinérgico de EDTA con cecropina D en bacterias Gram- (Sidén y Boman, 1983), debido a la eliminación de cationes Mg^{2+} , que intervienen en la estructura entrelazada de las moléculas de LPS, dotando a la membrana externa de la impermeabilidad característica (Leive, 1968; Bayer y Leive, 1977); en el caso de *Leishmania* el LPG une Ca^{2+} , pero aunque es capaz de formar un glucocáliz alrededor del parásito (Pimenta et al., 1991) debido a sus elevados niveles de expresión en la membrana (1.25×10^6 moléculas, 60% de su superficie) (Orlandi y Turco, 1987; McConville y Bacic, 1989) no forma estructuras tan compactas como el LPS, y consecuentemente es menos afectado por EDTA y niveles de Ca^{2+} .

La influencia del pH en la interacción del péptido con *Leishmania* juega sólo un papel secundario, la actividad se acentúa ligeramente a pH alejados del fisiológico; en el intervalo de pHs donde se desenvuelve el ciclo vital de *Leishmania*, no existen alteraciones en el estado de ionización de los diferentes aminoácidos presentes en el péptido. Las pequeñas variaciones observadas en la viabilidad de los promastigotes deben ser consecuencia del efecto del pH en la fisiología del parásito y del estado de la membrana del mismo; un mismo péptido, la defensina NP-1 de leucocitos de conejo, disminuye su actividad bactericida a pH inferiores a 6.0 (Lehrer et al., 1983), mientras que su efecto letal frente a *Candida albicans* es independiente del pH en un rango de pH de 5 a 8 (Selsted et al., 1985).

5.3. LA MEMBRANA COMO DIANA DEL PÉPTIDO

5.3.1. TRANSPORTE DE PROLINA

Prolina es uno de los aminoácidos más abundantes en la hemolinfa de los insectos, y es utilizado por los promastigotes como parte de sus requerimientos energéticos, especialmente en la fase exponencial de crecimiento, gran parte de la prolina permanece como tal hasta su utilización

energética y su incorporación a proteínas en los diez primeros minutos tras la adición es muy baja (menos del 10%).

La prolina es transportada de forma activa al interior del parásito utilizando el gradiente de potencial electroquímico de protones para el mismo (Zilberstein y Gepstein, 1993). Dicho potencial presenta dos componentes, el potencial de membrana y el gradiente de protones; debido a que *Leishmania* mantiene un pH intracelular constante de 6,5-6,8 en un rango de pH de 5.8 a 8.0 (Zilberstein et al., 1989), y a que los experimentos de transporte de prolina son realizados a un pH muy próximo al intracelular, lo que implica un bajo gradiente de pH y que entonces el principal componente es el potencial de membrana, estimado entre -90 y -113 mV para promastigotes de *Leishmania donovani* (Glaser et al., 1992); la casi total inhibición del transporte por valinomicina, que equilibra las concentraciones de K^+ a ambos lados de la membrana, lo avalan; a una concentración subletal de 2 μ M el transporte queda inhibido en una alta proporción, demostrando el colapso del potencial de membrana por la acción del péptido. Este mismo efecto es producido en *E. coli* cuando se trata con sarcotoxina I, aislada de *Sarcophaga peregrina*, (Okada y Natori, 1984).

5.3.2. PERMEABILIDAD DE MEMBRANA A Ca^{2+} Y A H^+

Según los resultados expuestos el péptido induce una permeabilidad al calcio que hay en el medio extracelular. Cuando los niveles de Ca^{2+} libre en el medio extracelular quedan reducidos por la presencia de EGTA, la adición del péptido no provoca un incremento en la concentración de Ca^{2+} , medida por la fluorescencia de FURA-2 atrapado en el citoplasma, consecuentemente, no es la acción del péptido sobre depósitos intracelulares de Ca^{2+} la responsable del incremento observado a pesar del aumento de actividad descrito para la ATPasa de retículo sarcoplásmico por unión de análogos de melitina (Baker et al, 1995); lo que sugiere que la acción de CA(1-8)M(1-18) queda prácticamente restringida a la membrana plasmática del parásito, avalado por los datos de potencial de membrana mitocondrial (ver punto 3.3.6) y por otros autores con péptidos anfipáticos, como el mastoparan sobre fibroblastos 3T3 de ratón, que no produce la movilización de calcio intracelular (Gil et al., 1991).

Por otro lado, promastigotes, previamente cargados con la sonda fluorescente BCECF sensible a cambios de pH, muestran un rápido equilibrio entre el pH interno y el externo cuando son incubados con CA(1-8)M(1-18), consecuentemente el péptido es capaz de inducir el paso de protones a través de la membrana. La formación de poros por cecropinas (Christensen et al., 1988; Wade et al., 1990; Durell et al., 1992) en membranas modelo presenta una permeabilidad más selectiva para aniones que para cationes, en una relación de $\text{Cl}^-:\text{Na}^+$ de 2:1 (Christensen et al., 1988); sin embargo, la formación de canales es un tema controvertido especialmente en membranas biológicas donde la presencia de proteínas y otros componentes pueden alterar sustancialmente la formación de canales; se han descrito dos modelos de canales (revisados en el punto 1.5.2. de la introducción), que pueden formar las cecropinas en una bicapa lipídica; en el primero, la luz del poro queda tapizada por los residuos de lisinas con sus cargas positivas, mientras que en el otro modelo la formarían con los extremos carboxílicos hidrofóbicos (Durell et al., 1992).

CA(1-8)M(1-18) es capaz de permeabilizar mitocondrias de hígado de rata permitiendo el paso a través de la membrana de solutos cargados y de sacarosa (Díaz-Achirica et al., 1994), y en liposomas su acción permite la liberación de dextranos fluoresceinados con una masa de 20 kDa, sugiriendo un fenómeno tipo detergente (Mancheño et al., 1996), por alteración de la estructura de los fosfolípidos de membrana. Hay evidencia experimental de la liberación de material que absorbe a 280 nm, y pérdida de componentes citoplasmáticos, observada por microscopía electrónica (ver figura 20). Posiblemente sea un fenómeno multicausal, coexistiendo la formación de canales discretos con desorganización de fosfolípidos de membrana; en melitina y dependiendo de la concentración de péptido existe preponderancia de cada uno de estos mecanismos (Sansom et al., 1991).

5.4. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

Bajas concentraciones del péptido CA(1-8)M(1-18) inducen evaginaciones de la membrana plasmática de los parásitos con su separación del axonema flagelar y de la red de microtúbulos subpelículaes que mantienen su integridad. Alteraciones similares se han descrito en promastigotes de *Leishmania mexicana* en presencia de dermaseptina (Hernández et al., 1992) y en bacterias con otros péptidos antibióticos catiónicos (Schindler y Teuber, 1975; Okada y Natori, 1984).

En bacterias Gram- se han citado altas estequiometrías de unión de péptidos catiónicos a su membrana externa (Vaara, 1992) que provocarían la expansión de la misma y aparición de evaginaciones (Schindler y Teuber, 1975). Sin embargo de dichas evaginaciones no aparecen en Gram+ ni en células eucariotas; en *Staphylococcus aureus* tratados con defensina aparecen estructuras internas multilamelares tipo mesosoma sin aparente alteración de la membrana plasmática (Shimoda et al., 1995). Si suponemos un fenómeno semejante de incremento de la superficie en células eucarióticas podrían asumir dicho incremento mediante procesos de "shedding" y de endocitosis; sin embargo en el caso de *Leishmania* los procesos de endo- y exocitosis quedan restringidos a una pequeña área desprovista de microtúbulos, el bolsillo flagelar; y por otro lado, la acomodación de un nuevo incremento de superficie en otras zonas de la membrana plasmática presentaría problemas por la unión de ésta a la red de microtúbulos subpelículaes (Bramblett et al., 1987), facilitando la aparición de tales evaginaciones en puntos localizados y provocando el desprendimiento de la membrana.

Esta explicación pierde validez para las grandes estructuras obtenidas a concentraciones subletales de péptido; dos mecanismos alternativos serían la fusión de membranas intracelulares con la membrana plasmática, provocada por una variación en la homeostasis intracelular por incremento de la permeabilidad de membrana; o una alteración "postmortem" a semejanza de las "guirnaldaes funerarias" observadas en bacterias tratadas con péptidos catiónicos (Okada y Natori, 1984).

5.5. INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE "STRESS"

La incubación de los promastigotes con CA(1-8)M(1-18) induce un patrón de proteínas con cierta similitud al obtenido tras choque térmico.

El concepto de "heat-shock" ha sido ampliado al de proteína de "stress", pudiendo ser éste de origen químico, como exposición a metales pesados u otros compuestos tales como arsenito (Lawrence y Robert-Gero, 1985) o agua oxigenada (Zarley et al., 1991).

Durante su ciclo biológico *Leishmania* vive en diferentes ambientes con distintas temperaturas y pH; de los 22° C y un pH cercano a la neutralidad que existe en el tubo digestivo del flebotomo, a los 37° C y el pH ácido de la vacuola parasitófora del macrófago donde habita el amastigote. Conforme a los datos del presente trabajo, existe entrada de Ca²⁺ y eliminación de gradiente de pH a través de la membrana plasmática en presencia del péptido que justificarían una señal de alarma en la homeostasis intracelular; los fenómenos de "heat-shock" disminuyen en muy alta proporción la síntesis de proteínas, con inducción de mRNA codificante de las proteínas de choque térmico, muchas de las cuales cumplen un papel de chaperona. La inhibición de la síntesis de proteínas es uno de los parámetros vitales afectados a concentraciones del péptido muy por debajo de la LD₅₀, consecuentemente un alto porcentaje de la síntesis residual de proteínas parece destinarse a proteínas de "stress" del parásito.

5.6. ALTERACIONES EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE LEISHMANIA POR LA ACCIÓN DE CA(1-8)M(1-18)

Los niveles de ATP sufren una rápida disminución en presencia de CA(1-8)M(1-18). Los promastigotes de *Leishmania* basan su metabolismo energético en la oxidación de aminoácidos, especialmente prolina y en la glucólisis (Blum, 1993); cuando los parásitos son crecidos en un

quimostato, una alta proporción del metabolismo se destina al mantenimiento de las funciones vitales del parásito comparada con otros microorganismo, la producción de ATP es empleada para el mantenimiento del potencial de membrana; (Ter Kuile y Opperdoes, 1992).

Cuando se compara los niveles internos de ATP por métodos indirectos como en los transfectantes de luciferasa con la extracción y valoración de ATP se observa una discrepancia considerable, especialmente a concentraciones medias y bajas, donde la cinética de pérdida del ATP valorada por el método directo es más lenta que el cambio obtenidos en los transfectantes; la discrepancia se explicaría por dos razones; la localización intracelular de la luciferasa en el citoplasma que impide la valoración del ATP intramitocondrial teniendo en cuenta además que la mitocondria en *Leishmania* es única y ocupa un volumen de al menos el 20% del microorganismo (Zilberstein et al., 1989), y posee un mecanismo de recambio de ADP/ATP por el translocador existente en la mitocondria, aunque el estudio en este parásito es todavía muy escaso; la otra explicación se basa en datos recientes obtenidos por RMN de ^{32}P (Cerdán et al., trabajo en progreso) confirman que la concentración de ATP libre disponible para la luciferasa y posiblemente para las ATPasas encargadas del mantenimiento de gradientes iónicos, es una proporción reducida del ATP total, encontrándose el resto asociado a estructuras y componentes intracelulares; consecuentemente la pérdida de pequeña parte del ATP total, medido por extracción del mismo, correspondiente al total del ATP libre, conlleva una rápida bajada del ATP disponible para la luciferasa.

Los cambios en ATP se deberían al colapso del potencial de membrana por disipación de gradientes iónicos existentes a través de ella, similar a otros péptidos antibióticos que actúan a nivel de membrana como magaininas (Westerhoff et al., 1989a); sarcotoxina I (Okada y Natori, 1985); himenoptaecina (Casteels et al., 1993); cecropinas (Boman et al., 1993) etc. Las ATPasas existentes en la membrana plasmática y encargadas de su mantenimiento actuarían inútilmente bombeando los iones al exterior para recuperar los valores iniciales con un alto costo en ATP. La pérdida de potasio intracelular por el incremento de permeabilidad de la membrana no es la única responsable de tal bajada; en nuestro laboratorio, experimentos realizados con promastigotes resuspendidos en un medio cuya concentración de potasio es semejante a la intracelular, retardan pero no impiden la pérdida de ATP causada por CA(1-8)M(1-18); consecuentemente no es sólo la pérdida de potasio, sino la de otros metabolitos intracelulares,

que a su vez también causarían la inhibición de la respiración en los promastigotes, proceso semejante al observado con otros péptidos antibióticos tanto en bacterias (Cociancich et al., 1993) o en levadura (Seldsted et al., 1985). La mitocondria mantiene su potencial de membrana a concentraciones de péptido y tiempos letales para la *Leishmania*, y si el péptido actuara directamente sobre la mitocondria, la respiración se aceleraría por la acción desacoplante del péptido sobre la misma incrementando el consumo de oxígeno, demostrado "in vitro" en mitocondrias de origen animal y vegetal (Hugosson et al., 1994) por permeabilización inespecífica de la membrana (Díaz-Achirica et al., 1994).

5.7. MECANISMO PROPUESTO DE ACCIÓN LETAL DEL PÉPTIDO SOBRE LEISHMANIA

Conforme a los datos anteriores el principal mecanismo de acción en *Leishmania* es un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática. El mecanismo propuesto para cecropinas en procariotas y en membranas modelo (Christensen et al., 1988) se basa en una primera etapa de interacción iónica entre el péptido y la superficie, interacción reforzada con la inserción de la región hidrofóbica dentro de la bicapa lipídica y seguida de una translocación de la región catiónica mediada por el potencial de membrana. La cara externa de la membrana interna bacteriana presenta una alta densidad de fosfolípidos aniónicos que intervienen en la unión de los péptidos catiónicos; cepas deficientes en la biosíntesis de cardiolipina son más resistentes a sapecina (Matsuyama y Natori, 1990) y concuerda la presencia de éste lípido en mitocondria y los efectos de permeabilización de péptidos antibióticos (Westerhoff et al., 1989b, Díaz-Achirica et al., 1994), aunque la composición de fosfolípidos de *Leishmania* no revela una abundancia de fosfolípidos aniónicos tan alta como en bacterias, y se desconoce la orientación de los mismos.

Según los datos presentes existe una relación electrostática entre el péptido y los componentes de la membrana plasmática de *Leishmania*; el calcio inhibe parcialmente esta interacción; los cationes divalentes son capaces de competir con péptidos catiónicos en la unión a componentes aniónicos de membrana; en el caso de bacterias Gram- dos son los componentes principales aniónicos responsables de esta unión; el LPS y la abundancia en fosfolípidos aniónicos. Mutantes en LPS con un menor número de residuos fosforilados y, consecuentemente de carga negativa, presentan una mayor resistencia a péptidos catiónicos tales como magaininas (Rana et al., 1991), melitina (David et al., 1992) y CA(1-8)M(1-18) recombinante (Piers y Hancock, 1994); la alta resistencia a un gran número de péptido catiónicos observada en *Brucella* se debe a la carencia de cargas negativas en su LPS (Martínez de Tejada et al., 1995). Defensinas de mamífero compiten con dansilpolimixina y lisozima en su unión a LPS de *Pseudomonas aeruginosa* y dicha interacción es inhibida por Mg^{2+} (Sawyer et al., 1988). En células eucarióticas el tratamiento con neuraminidasa para la eliminación del ácido siálico aumenta la sensibilidad de las células a análogos de melitina (Pérez-Payá et al., 1995).

El efecto de CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes aumenta cuando se disminuye la fuerza iónica del medio de incubación, favoreciendo la interacción electrostática del péptido con la membrana del parásito. Por contra el efecto en la viabilidad del parásito y en el consumo de oxígeno es totalmente abolido en presencia de polianiones tales como la heparina debido a sus grupos sulfato que neutralizan las cargas positivas del péptido impidiendo su unión a la membrana. Tal efecto se incrementa si el complejo péptido-heparina ha sido formado previamente a su adición a los promastigotes. De igual modo, si se incuban promastigotes con heparina el efecto leishmanicida disminuye; en este caso, puesto que la membrana plasmática se encuentra cargada negativamente existiría una repulsión de carga para la incorporación de heparina al parásito; sin embargo existen proteínas en la membrana capaces de interaccionar con heparina y supuestamente implicadas en la unión parásito-célula hospedadora; se han estimado que el número de receptores de heparina por promastigote es de $6-8 \times 10^5$ (Butcher et al., 1992); otra proteína presente en la membrana de *Leishmania* en un número de 10^5 copias por célula (Rangarajan, et al., 1995), es la denominada proteína B cuyas regiones catiónicas interaccionan con el LPG (Pimenta et al., 1994b) por lo que disminuye la repulsión de cargas e hipotéticamente podría servir como puente para unir heparina.

El efecto inhibitorio de la heparina sobre el péptido es dosis-dependiente, similar al efecto descrito en respiración y tumefacción en mitocondrias de mamífero (Díaz-Achirica et al., 1994). Esta inhibición por neutralización de carga se ha observado para defensinas en células de mamífero (Lichtenstein et al., 1988) y en análogos de melitina sobre eritrocitos en presencia del ácido colomínico (Pérez-Payá et al., 1995). La neutralización de la carga positiva de péptidos antibióticos catiónicos es utilizada en la naturaleza para evitar daño a sus propias membranas, mediante la síntesis de péptidos antibióticos catiónicos bajo la forma de precursores con prosequencias ricas en residuos ácidos (Valore et al., 1996), que disminuyen la carga positiva del péptido durante su transporte y almacenamiento intracelular; éste mecanismo difiere de los péptidos que actúan en el exterior celular y no son almacenados, como las cecropinas, cuyos precursores son menos aniónicos y que son secretados por un sistema diferente del utilizado normalmente por la célula para la secreción de proteínas (Seethaler et al., 1991; Boman 1994).

El potencial de membrana es otro de los factores que intervienen en la interacción con membranas de péptidos catiónicos antibióticos (Groisman, 1994). La incubación de promastigotes con valinomicina colapsa el potencial de membrana y disminuye la eficacia leishmanicida del péptido. Utilizando como modelo membranas planas se ha propuesto que la misión del potencial de membrana sería la traslocación de la secuencia catiónica de la cecropina, orientada de forma paralela al plano de la membrana a una orientación perpendicular exponiendo los residuos cargados a la luz del poro transmembrana, formado por agregación de varios monómeros de péptido (Christensen et al. 1988), sin embargo en estudios realizados sobre liposomas con el mismo péptido muestran que la permeabilidad sucede incluso en ausencia de un potencial de membrana (Steiner et al., 1988). La despolarización de la membrana plasmática impide el efecto letal de defensinas sobre *Micrococcus luteus* (Cociancich et al., 1993), *Escherichia coli* (Lehrer et al., 1989) y *Candida albicans* (Lehrer et al., 1988), y de magaininas sobre células tumorales (Cruciani et al., 1991); y en eritrocitos hiperpolarizados artificialmente hay un aumento de la actividad de magaininas (Matsuzaki et al., 1995a).

La inhibición parcial de efecto letal de CA(1-8)M(1-18) sobre promastigotes tratados con valinomicina demuestra que el potencial de membrana no es un factor esencial para su acción leishmanicida, conforme a la permeabilización de mitocondrias por CA(1-8)M(1-18) en ausencia de respiración y consecuentemente con muy bajo potencial de membrana (Díaz-Achirica et al.,

1994), y de liposomas (Mancheño et al., 1996). La baja dependencia de la actividad de CA(1-8)M(1-18) del potencial de membrana podría asociarse a una mayor rigidez de la molécula al carecer de una secuencia bisagra bien definida, presente en la cecropina, que articula las dos regiones diferenciadas en la molécula permitiendo la nueva orientación de la secuencia catiónica; la actividad sobre membranas modelo de la cecropina P1, cuya estructura es una α -hélice continua carente de secuencia bisagra es independiente del potencial de membrana (Sipos et al., 1991).

El modelo anteriormente descrito de formación de canales discretos transmembrana, denominado modelo de las puertas de barril, no explica porque péptidos de secuencia menor de 20 aminoácidos incapaces de formar una α -hélice que atraviese la bicapa lipídica, producen permeabilidad tanto en células como en membranas modelo. Una explicación sería la formación de estructuras de apilamiento cabeza-cola de monómeros para abarcar la anchura de la membrana (Boman et al., 1989b; Andreu et al., 1992) o bien la adopción de una estructura en hélice 3_{10} (Andreu et al., 1992). El modelo de alfombra, en la cual los diferentes monómeros se dispondrían en orientación paralela al plano de la membrana, cubriendo una gran parte de la misma, originarían discontinuidades discretas y temporales en la membrana por perturbación de la estructura de la bicapa, actuando a manera de un detergente, que en el caso de CA(1-8)M(1-18) explicaría tanto la permeabilidad causada por algunos análogos cortos de CA(1-8)M(1-18), y la permeabilidad a moléculas neutras y de alto peso molecular, observado tanto en mitocondrias (Díaz-Achirica et al., 1994) como en liposomas con liberación, en este último caso, de dextranos de hasta 20 Kda y la alta estequiometría de péptido unido preciso para la inducción de permeabilidad (Steiner et al., 1988 y Mancheño et al., 1996). La coexistencia de ambos mecanismos es posible con una preponderancia de cada uno de ellos dependiente de la concentración de péptido como ocurre con la melitina (Sansom et al., 1991).

5.8. MOLECULAS IMPLICADAS EN LA INTERACCIÓN *LEISHMANIA-CA(1-8)M(1-18)*

La ausencia de receptores quirales en la membrana para los péptidos antibióticos ha sido demostrada repetidamente tanto con análogos D (Wade et al., 1990; Besalle et al., 1990) como con retroenantiómeros (Merrifield et al., 1995) de diversos péptidos; sin embargo es preciso explicar las diferencias de la susceptibilidad de diferentes microorganismos para un mismo péptido, significativas incluso para especies cercanas filogenéticamente y donde las pequeñas variaciones en la composición de fosfolípidos no justificarían la diferente susceptibilidad.

Las opciones principales para explicar tales diferencias dentro de especies parecidas serían moléculas que dificultaran el acceso del péptido a la matriz lipídica o proteinasas que degradaran el péptido. En el primer grupo juegan un papel fundamental los componentes polianiónicos; la elevada carga negativa de la membrana de los promastigotes de *Leishmania* es debido a la presencia de moléculas de LPG que forma un glucocálix (Orlandi y Turco, 1987; McConville y Bacic, 1989), cuyos niveles de expresión se correlacionan con la virulencia del parásito (Shankar et al., 1993) y capaz de evitar "in vivo" el reconocimiento de otros componentes de membrana por anticuerpos presentes en el suero de pacientes (Karp et al., 1991), e impedir la inserción del complejo de ataque del complemento en la membrana (Puentes et al., 1990). El LPG es un factor de defensa de los promastigotes frente a la acción de CA(1-8)M(1-18) al neutralizar la cargas positivas de éstos, pero por otro lado, es capaz de quelar Ca^{2+} produciéndose una situación ambigua, ya que el LPG disminuiría la concentración del péptido cercana a la bicapa lipídica, pero la neutralización de parte de sus cargas por Ca^{2+} contribuiría a una mayor eficacia del péptido; sin embargo, la unión del calcio es débil (Eilam et al., 1985) y no implica un cambio de conformación en el polisacárido, además la densidad de LPG no es suficiente para constituir una trama continua en presencia de cationes divalentes como sucede con LPS.

La cepa R2D2 deficiente en LPG muestra una susceptibilidad mayor que la cepa salvaje, y la incubación de la cepa mutante con LPG purificado confiere a esta resistencia frente al péptido semejante a la mostrada por la cepa salvaje. Por otro lado, el LPG y su porción

hidrofílica, el PG, interaccionan con el péptido con pérdida de la eficacia leishmanicida de manera similar a la heparina, aunque ésta muestra mayor afinidad por el péptido ya que una concentración de 200 µg/ml causa un nivel de protección igual al logrado con 300 µg/ml de LPG y superior al del PG a la misma concentración. La razón plausible es la mayor densidad de carga que posee la heparina comparada con la de LPG, que también originaría una estructuración del péptido con incremento del porcentaje de α -hélice no observado con PG (Díaz-Achirica et al., trabajo en progreso), así como un desplazamiento hacia el rojo de la fluorescencia del triptófano; este residuo en el péptido está flanqueado por dos lisinas; el incremento de la hidrofobicidad del ambiente debería producirse ya por apantallamiento de carga entre los grupos aniónicos de la heparina con los residuos de lisina del péptido, o bien que la neutralización de las cargas induzca un agregación de monómeros peptídicos, quizás con una orientación cabeza cola, a semejanza de lo que sucede en melitina y en análogos cortos (Fernández et al., 1996), y que provocara un área hidrofóbica alrededor del triptófano por las secuencias apoplares de otros monómeros.

La formación de estructuras α -hélice anfipáticas al contacto con la membrana es una de las características comunes a péptidos antibióticos tales como magaininas (Matsuzaki et al., 1991), dermaseptina (Mor et al., 1991), cecropina (Holak et al., 1988) e híbridos cecropina-melitina (Sipos et al., 1991), y que se relaciona con la actividad antibiótica (Nakabayashi et al., 1990) y desacoplante de mitocondrias (Juretic et al., 1989).

La molécula de LPG consta de dos regiones claramente diferenciadas, el anclaje lipídico y la porción oligosacáridica portadora de las cargas negativas. Se obtiene un mayor nivel de protección por LPG que con PG, debido a la posible asociación de éste con la membrana plasmática de la célula. La incubación promastigotes R2D2, deficitarios en LPG, con esta molécula origina la incorporación espontánea y estable de la misma a la superficie del parásito (Tolson et al., 1989) con recuperación de la virulencia frente al macrófago (McNeely y Turco, 1990); la expresión del gen responsable de la deficiencia biosintética de LPG origina una recuperación de la virulencia del parásito, aunque los niveles de expresión de LPG obtenidos mediante complementación génica sólo alcanzan el 10% del nivel correspondiente al LPG, lo cual no permite la utilización de esta técnica en los experimentos mostrados (Ryan et al., 1993). Cuando se incuban promastigotes de la cepa deficiente R2D2, con LPG provoca un grado de protección incluso superior al de la cepa salvaje; una de las causas posibles sería una

estequiometría de unión de LPG al parásito superior al número de copias existente en la cepa silvestre de forma natural, factible porque el porcentaje de área cubierto por LPG es sólo de un 60% en el promastigote (Homans et al., 1992), o bien que las nuevas moléculas incorporadas durante la incubación sean más efectivas en la unión del péptido; primero porque la molécula de LPG purificado carece de la proteína asociada, o por una acción directa sobre la membrana; la incorporación de LPG a membranas de eritrocito, inhibe a muy baja concentración la fusión con la cubierta del virus Sendai y por otro lado incrementa la temperatura de transición de liposomas de fosfatidiletanolamina (Miao et al., 1995)

La región del LPG y del PG correspondiente a la unidad repetitiva, portadora de las mayoría de las cargas negativas, es esencial para la protección ejercida por estas moléculas, la despolimerización de la misma por hidrólisis ácida suave provoca una considerable pérdida en el efecto inhibitorio sobre el péptido; esta región es responsable del efecto estabilizador del LPG sobre la membrana (Miao et al., 1995), y parcialmente de la inhibición de proteína-quinasa C (McNeely et al., 1989).

El LPG juega un papel semejante en ciertos aspectos al LPS, aunque no alcanza una densidad suficiente para la formación de un glicocáliz denso que restrinja el acceso de moléculas de pequeño tamaño al interior intracelular. Se ha descrito que los péptidos antibacterianos llegan hasta la membrana plasmática de la bacteria mediante un mecanismo denominado autopromoción (Hancock, 1984); la interacción de péptidos antibacterianos catiónicos con el LPS aniónico de la membrana externa de bacterias Gram- ha sido descrita en péptidos tales como atacina (Engström et al., 1984), cecropina (Vaara y Vaara, 1994), magainina (Rana et al., 1991), defensinas de mamíferos (Hodinka y Modrazowski, 1983; Sawyer et al., 1988) y taquiplesinas (Ohta et al., 1992).

5.9. DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS ESTADOS DEL PARÁSITO

5.9.1. DIFERENCIAS ENTRE PROMASTIGOTES PROCÍCLICOS Y METACÍCLICOS

La lisis de promastigotes debida a CA(1-8)M(1-18) es mayor en aquellos obtenidos en fase exponencial de crecimiento que en la fase estacionaria. Las diferencias existentes entre las fases de crecimiento del parásito "in vitro" se relacionan con parámetros de virulencia y en la localización del parásito dentro del tubo digestivo del flebotomo (McConville et al., 1993; Pimenta et al., 1994a). La metacicloogénesis tiene bases moleculares especialmente estudiadas en *Leishmania major* y *Leishmania donovani* (Sacks, 1989); además de las diferencias metabólicas, con una disminución en el metabolismo del parásito, que quizás conlleve una bajada en el potencial de membrana, hay un incremento en la expresión de gp63 (Ramamoorthy et al., 1992). Sin embargo, datos obtenidos con la cepa utilizada en el presente estudio en nuestro laboratorio no muestran un incremento sustancial de tal actividad; quizás los cambios más implicados con la resistencia al péptido puedan ser explicados por la variación en la estructura y composición del LPG, con cambio en las estructuras terminales, que implican alteración en la aglutinabilidad de parásitos con diferentes lectinas, y la duplicación en el número de unidades repetitivas fosforiladas (Sacks et al., 1990), provocando un engrosamiento del glucocáliz que recubre al promastigote y el incremento de la carga negativa de su superficie. Tal variación en el LPG explicaría que la actividad leishmanicida sobre *Leishmania mexicana* de otro péptido catiónico, la dermaseptina, no sea dependiente de la fase de crecimiento del parásito (Hernández et al., 1992), por la constancia de la estructura de LPG presente en promastigotes de esta especie, aunque sí existe incremento en los niveles de gp63 (Chaudhuri y Chang, 1988). Además del incremento en el número de cargas, simplemente el aumento en la longitud de la cadena polisacáridica podría actuar como barrera para que el péptido alcanzara la membrana del parásito a semejanza de mutantes de *Salmonella typhimurium*, que difieren en la longitud del antígeno O de LPS siendo directamente proporcional a su resistencia frente a magainina (Rana et al., 1990; 1991), aunque las diferencias entre ambos tipos de moléculas y su densidad en la correspondiente membrana, discutidas anteriormente, deben ser consideradas. Por otro lado, se desconoce si hay

diferencias en el contenido en fosfolípidos de membrana entre las dos fases del parásito.

5.9.2. DIFERENCIAS PROMASTIGOTES Y AMASTIGOTES

Los estudios en los distintos estados del parásito se realizaron en amastigotes de *Leishmania pifanoi* en cultivo axénico y sus correspondientes promastigotes.

Los amastigotes son más resistentes que los promastigotes frente a la acción del péptido. Esta resistencia no se puede atribuir a una mayor actividad enzimática por parte de la gp63 ya que en los amastigotes hay una menor expresión de esta proteinasa (Ilg et al., 1993) y no se encuentra asociada a la membrana sino en el interior del bolsillo flagelar (Medina-Acosta et al., 1993). Por otro lado, el LPG en amastigotes presenta, además de distintas unidades disacáridas terminales, un número muy bajo de copias, $<10^3$ moléculas/célula (Bahr et al., 1993), y aunque una gran superficie del amastigote está recubierta por los GIPLS (McConville y Blackwell, 1991) al carecer éstos de la region terminal y de la secuencia repetitiva (McConville y Bacic, 1989) el número de cargas negativas en la superficie se ve disminuido. Se desconocen la composición en fosfolípidos de la membrana plasmática de los amastigotes, sin embargo amastigotes obtenidos por choque térmico son más sensibles a la acción del ketoconazol y de la anfotericina B (Ramos et al., 1990 y 1994).

5.9.3. EFECTO SOBRE PROMASTIGOTES EN EL VECTOR

La actuación de péptidos antibióticos sobre parásitos ha sido demostrado anteriormente. El desarrollo esporogónico de los oocistos de *Plasmodium* en el interior de *Anopheles* es inhibido por inyección en el mosquito de cecropinas y magaininas (Gwadz et al., 1989) o análogos sintéticos de cecropinas (Rodríguez et al., 1995). En *Leishmania* la mayor parte de los promastigotes en el interior del tubo digestivo del flebotomo se encuentran en fase de crecimiento procíclico y son más sensibles a la acción del péptido.

El tubo digestivo del flebotomo tiene un alto contenido en enzimas proteolíticas y la unión del péptido al parásito compite con otras membranas y componentes del tubo digestivo, a pesar de que *Leishmania* es capaz de inhibir parcialmente la actividad proteolítica del sistema digestivo del flebotomo (Schlein, 1993), por lo que la eficacia del péptido debe relacionarse con una rápida unión al parásito.

5.9.4. CA(1-8)M(1-18) EN MACRÓFAGOS INFECTADOS Y EN EL MODELO MURINO DE LA LEISHMANIASIS

Sorprendentemente, la actividad de CA(1-8)M(1-18) sobre *Leishmania* en el interior de macrófagos es superior a la observada sobre los amastigotes axénicos; la encapsulación de CA(1-8)M(1-18) en liposomas y su posterior fagocitosis por macrófagos, incrementa considerablemente tal efecto.

Todos los datos anteriores corroboran que la muerte del parásito sea causada por una actividad del péptido sobre el macrófago más que por acción directa sobre *Leishmania*. Esta última posibilidad requeriría primero una concentración local de péptido muy elevada, a tenor de los datos "in vitro" de CA(1-8)M(1-18) sobre amastigotes axénicos. La presencia del péptido en la vacuola implicaría una endocitosis o un transporte del mismo a través de dos membranas, la plasmática y la correspondiente a la vacuola parasitófora; según fue discutido anteriormente, la alta afinidad del péptido por las membranas determina en la especificidad un alto componente cinético en su unión a las mismas, por lo que la totalidad o una gran parte del péptido quedaría unido a la membrana plasmática del parásito al ser la primera estructura de contacto; además de la proteólisis e interacciones inespecíficas con componentes del citoplasma, todavía existe una competición con el resto de orgánulos celulares; siendo la mitocondria, con su elevado potencial de membrana el principal orgánulo diana. Otra posibilidad es la vía endo- o pinocítica, debido a que la vacuola parasitófora está en comunicación con la misma (Russell et al., 1992), sin embargo el péptido entraría en competición con la membrana endocítica, y al final del proceso componentes lisosomales, tales como proteínas LAMP con un alto contenido en siálico, actuarían como puntos de unión. Otro inconveniente es la elevada proteólisis que podría sufrir el péptido en esta vía.

El encapsulamiento en liposomas evitaría primero que el péptido atravesara las dos membranas del macrófago y posiblemente gran parte de la proteólisis que sufriría. Los liposomas son fácilmente fagocitados por las células macrofágicas, y han sido ampliamente utilizados para concentrar fármacos leishmanicidas como la anfotericina (Davidson et al., 1991); sin embargo el péptido competiría también con la membrana del liposoma para su unión al amastigote, y por otra parte la estabilidad del liposoma supone una restricción en la concentración de péptido que puede ser incorporada al mismo, además de competición por la membrana de la vacuola parasitófora anteriormente citada.

CA(1-8)M(1-18) libre es capaz de inducir en macrófagos la expresión de iNOS, así como la producción de NO a partir de arginina, aunque a niveles muy inferiores a los logrados con LPS, con el que además muestra un efecto antagónico (Velasco et al., en prensa). La eliminación de *Leishmania* está directamente relacionada con los niveles de NO producidos por macrófagos activados (Liew et al., 1990a) y la eliminación del gen de la NO sintetasa inducible en cepas de ratón resistentes a leishmania hace que la infección progrese en el ratón (Wei et al., 1995). El mecanismo de la inducción de iNOS por CA(1-8)M(1-18) no se ha clarificado totalmente; es una acción a nivel de membrana, ya que el análogo enantiomérico (D)-CA(1-8)M(1-18) es tan efectivo como el péptido natural, existiendo inducción de NF- κ B, y elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular originada por entrada de Ca^{2+} extracelular, en vez de liberación de los depósitos internos que podría ser debida a la presencia de péptido libre en el citoplasma. El incremento en la permeabilidad de la membrana del macrófago por el ionóforo A-12387 induce también iNOS y actividad leishmanicida (Buchmuller y Mauel, 1991), sin embargo requiere el primado del macrófago con LPS, situación contraria a la nuestra, donde existe un efecto antagónico entre ambas moléculas, indicando rutas de transducción de señales diferentes. La inducción de iNOS puede realizarse por otros péptidos tales como el tetrapéptido tufsina, y dicha activación conlleva la muerte de *Leishmania major* (Cillari et al., 1994), sin embargo la activación del macrófago es debida a una interacción específica entre tufsina y su receptor y no a un fenómeno de permeabilidad inespecífica de membrana; péptidos derivados de la matriz extracelular son también capaces de inducir iNOS, aunque el trabajo original es sólo descriptivo, sin estudiar el posible mecanismo de interacción (Pérez-Mediavilla et al., 1995). La inducción de iNOS es un proceso multifactorial sólo parcialmente estudiado, reflejado en la región promotora de la misma;

en ratón se han identificado al menos 24 motivos para la unión de factores transcripcionales (Xie et al., 1993). Son precisos más experimentos con inhibidores de la iNOS así como el estudio de la inducción de la misma por péptidos encapsulados en liposomas para dilucidar el papel de la inducción del NO por el péptido.

El péptido CA(1-8)M(1-18) es capaz de mejorar el curso de la enfermedad en ratones Balb/c infectados en la base de la cola con promastigotes de *Leishmania major*. El nivel de curación depende de la carga parasitaria del ratón; desde una curación total cuando se infectan con 10^6 parásitos a simplemente un retraso en la aparición de los síntomas de la infección con dosis mayores del parásito; la curación en cualquier caso es más lenta que la lograda por tratamiento con antimoniales orgánicos, y la dependencia con la dosis del parásito ha sido observada en experimentos de protección vacunando ratones con diferentes antígenos (McMahon-Pratt et al., 1993). El curso de la enfermedad en ratón depende de la preponderancia de los linfocitos pertenecientes a uno de los dos subconjuntos mayoritarios de CD4+, Th1 o Th2. La inducción de uno u otro es decidida en los primeros días de la enfermedad con implicación de los niveles de IL-4 e IL-12 (Reiner et al., 1994); uno de los factores que inducen la proliferación de Th2 es la mayor carga antigénica, conforme al curso de la enfermedad en ratón con distintas dosis de parásitos. Una vez establecida una respuesta tipo Th2 puede ser revertida a Th1 mediante IL-12, tras reducción de la carga parasitaria por tratamiento con antimoniales (Nabors et al., 1995). También "in vivo" el péptido encapsulado es superior a la pomada con el péptido libre, aunque las diferencias entre péptido libre y encapsulado en experimentos "in vitro" con macrófagos infectados son muy inferiores; además de la inducción de iNOS, otros fenómenos farmacológicos, como una mejor dirección del péptido en liposomas hacia su correspondiente diana deben ser objeto de una mejor definición, así como realizar experimentos en ratones deficientes en iNOS para confirmar el mecanismo propuesto en el presente estudio.

5.10. PÉPTIDOS CECROPINA A-MELITINA EN CEPAS MULTIRRESISTENTES A FÁRMACOS

La multirresistencia a drogas es uno de los principales desafíos a la quimioterapia parasitaria; en *Leishmania* los mecanismos principales son la modificación en el número de transportadores, alteraciones que afectan al sitio de unión del fármaco, amplificación génica y expresión de proteína P.

Los promastigotes de *Leishmania tropica* cepa R-150, resistente a daunomicina, son menos susceptibles que la cepa salvaje, a la acción de CA(1-8)M(1-18). La proteína P pertenece a la familia de transportadores denominados ABC (Gros et al., 1986), entre cuyos miembros se encuentran proteínas capaces de transportar péptidos como la hemolisina de *E. coli* (Juranka et al., 1992); permeasa de oligopéptidos de *Salmonella* (Gallagher et al., 1989), el transportador de la feromona STE6 de levadura (McGrath y Varshavsky, 1989) o los transportadores TAP 1 y TAP 2 encargados del transporte de péptidos a través del retículo endoplásmico (Powis et al., 1992); en eucariotas superiores gramicidina es sustrato de la proteína P (Loe y Sharom, 1994) y otros péptidos hidrofóbicos (Sharom et al., 1995) sin embargo magaininas no son utilizadas por la proteína P, ya que células tumorales multirresistentes por expresión de la proteína P son susceptibles a la acción de dicho péptido catiónico (Lincke et al., 1990). La mayor resistencia frente a CA(1-8)M(1-18) de la cepa multirresistente de *Leishmania* puede explicarse en términos de modificación de las características físicas de la membrana (Chiquero, 1996), la proteína P atraviesa 6 veces la membrana, y su sobreexpresión debe conducir a cambios en la estructura de la membrana de *Leishmania*, cuyos componentes mayoritarios se encuentran anclados a la misma por estructuras GPI.

En experimentos de acumulación de daunomicina se observa un incremento intracelular del fármaco, muy considerable en la cepa multirresistente R-150 tratada con el péptido (F. Gamarro, comunicación personal), lo que indica que hay un bloqueo de la proteína P para expulsar la daunomicina. La acción de CA(1-8)M(1-18) se realiza, más que sobre la propia proteína P, sobre la fluidez de membrana, como ya se ha observado con este mismo péptido en

membranas modelo (Mancheño et al., 1996), o por una disminución en los niveles de ATP por permeabilización de la membrana, los datos discutidos en el punto 5.6. avalan esta hipótesis, pero no se puede descartar la coexistencia de ambos.

La inhibición en la proteína P en presencia de verapamil muestran un ligero incremento de sensibilidad al péptido, tanto en la cepa resistente como en la salvaje, que puede ser debida a la variación en la fluidez de membrana por el verapamil, ya observada en otros trabajos (Drori et al., 1995).

5.11. UTILIZACIÓN TERAPÉUTICA DE PÉPTIDOS CON FUNCIÓN LEISHMANICIDA

La terapia a base de péptidos puede ser efectiva en *Leishmania*, conforme se ha demostrado en el presente trabajo y en otros ya publicados (Hernández et al., 1992; Barr et al., 1995; Vouldoukis et al., 1996).

Entre los factores de especificidad en procariotes descritos para péptidos antibióticos el contenido en esteroides es uno de los principales; sin embargo, es una cuestión controvertida; en liposomas con diferentes niveles de colesterol no se ha observado variación en el efecto de análogos de cecropina (Steiner et al., 1982), y liposomas con alta concentración de colesterol son permeabilizados por análogos cortos de cecropina (Fernández et al., 1994), en magaininas sí se observa un efecto inhibitorio del colesterol (Matsuzaki et al., 1991), aunque no es un factor esencial en la unión del péptido a la membrana (Matsuzaki et al., 1995a), la sarcotoxina I es menos activa en liposomas que contienen colesterol (Nakajima et al., 1987).

Leishmania carece de colesterol sin embargo su membrana plasmática es rica en ergosterol, esteroide típico de plantas y hongos, cuya presencia no sólo influye en el estado físico de la membrana, sino que también interacciona con determinados componentes de membrana. La disminución de sus niveles en membranas, mediadas por efecto de azoles tipo ketoconazol

que actúa inhibiendo al citocromo P-450 dependiente de la desmetilación del lanosterol (Berman et al., 1984), producen la muerte del parásito, a pesar de la acumulación de su precursor biosintético, el lanosterol y de la capacidad del parásito de incorporar a su membrana colesterol procedente del hospedador (Ramos et al., 1994). La posible sinergia o antagonismo con la acción del péptido vendrá determinada por el mayor o menor efecto protector de los correspondientes esteroides presentes en la membrana; hasta la fecha no se ha estudiado el efecto comparativo de ergosterol, colesterol y lanosterol sobre la efectividad de los péptidos híbridos cecropina A-melitina tanto en leishmania "in vivo" como en membranas modelo.

Las diferencias de expresión de LPG y gp63 pueden ser factores diferenciales en la resistencia de diferentes cepas y especies de *Leishmania* frente al péptido. La amplificación génica y su implicación en la resistencia del parásito frente al péptido debería realizarse a 3 niveles: 1) proteínas particulares implicadas en resistencia, tipo gp63; 2) en la ruta metabólica biosintética de las unidades responsables de la carga negativa del LPG como ocurre en bacterias con LPS (Rana et al., 1991), y 3) en la biosíntesis de fosfolípidos, una alteración en la composición de éstos en la membrana, aunque no descartable, implicaría la acomodación de multitud de procesos biológicos.

Otras estrategias encaminadas a disminuir la cantidad precisa de un péptido para un tratamiento es la sinergia con otros fármacos; los péptidos catiónicos, al destruir la estructura de la membrana externa en Gram-, favorecen que otros fármacos hidrofóbicos sean capaces de interaccionar con la membrana interna bacteriana, disminuyendo varios órdenes de magnitud la LD₅₀ correspondiente al fármaco a concentraciones subletales del péptido (Vaara y Vaara, 1986); por otra parte han sido descritos efectos sinérgicos con β -lactamasas, posiblemente por facilitar el paso del péptido (Darveau et al., 1991) o de defensinas con fluconazol, un inhibidor de la síntesis del ergosterol (Alcouloumre et al., 1993); es común la sinergia entre péptidos antibióticos presentes en una misma localización anatómica tales como PGLa y magaininas en la piel de anfibios (Westerhoff et al., 1995) o entre los componentes de neutrófilos sobre *E. coli* (Levy et al., 1994), o bien con otros mecanismos microbicidas tales como producción de peróxido de hidrógeno en neutrófilos sobre células tumorales (Lichtenstein et al., 1988).

La encapsulación en liposomas es otro de los medios empleados para incrementar la eficacia del péptido; sin embargo, muchos de estos péptidos son activos en membrana, lo que

implica un estudio previo de la estequiometría péptido: fosfolípido y composición del liposoma; únicamente en el presente trabajo, como empleo tópico y para la indolicina contra *Aspergillus fumigatus* (Ahmad et al., 1995), han sido empleados, favoreciendo su uso entérico por disminución de los efectos citotóxicos del péptido.

Los péptidos pueden ser empleados como control del parásito, tanto a nivel del hospedador, mediante la introducción de genes de los mismos en las células dianas de los correspondientes parásitos (Couto et al., 1994) como a nivel de vector; ya por originar mosquitos transgénicos, capaces de expresar péptido en el tubo digestivo, mediante posicionamiento del gen bajo promotores inducibles tras la ingesta de sangre, como vitelogenina o promotores de enzimas digestivas tipo tripsina, o con estrategia semejante a la descrita para el control de *Trypanosoma cruzi* en *Reduviidae*, utilizando endosimbiontes bacterianos capaces de resistir la acción del péptido, y que generan un nivel suficiente para disminuir la multiplicación de *Trypanosoma cruzi*; por otro lado existe una transmisión vertical ya que los endosimbiontes son transportados en la corteza del huevo, asegurando su transmisión a la descendencia, (Beard et al., 1993). En *Leishmania* el estudio de la fauna bacteriana del tubo digestivo es muy reducida.

Además de encontrar nuevas fuentes de antibióticos animales, estudiar los efectos de los mismos sobre patógenos, y el descubrimiento de nuevos antibióticos endógenos, el futuro lejano del campo se encamina hacia la definición de “antibióticos inteligentes” es decir, promover la producción de antibióticos endógenos por el mismo órgano infectado, que requiere estudios previos sobre inducción génica y posibles efectos tóxicos producidos por un exceso de los mismos.

5.12. INTERACCIÓN DE *LEISHMANIA* CON PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS EN LA NATURALEZA

Todo el trabajo anterior se ha basado en la interacción de *Leishmania* con un péptido sintético;

con vistas a un posible terapia de péptidos; es preciso recapitular con el fin de responder dos cuestiones: si en su ciclo vital en la naturaleza *Leishmania* tiene contacto con péptidos antibióticos catiónicos y, si la respuesta es afirmativa, los mecanismos defensivos desarrollados lo son en relación al directa al péptido o cumplen otras funciones y la defensa anti-peptídica es anecdótica.

La respuesta de la primera pregunta debe ser analizada en los dos ambientes en que se desarrolla el parásito; en el interior del flebotomo y en los macrófagos del hospedador vertebrado. En dípteros las cecropinas son producidas por las células del cuerpo graso, en menor extensión por los hemocitos (Samakovlis et al., 1990; Tryselius et al., 1992) y en las células tegumentarias (Brey et al., 1993) y activada por LPS y otros componentes de bacterias, aunque la secreción en el tubo digestivo del adulto no ha sido descrita hasta ahora. En el estado larvario existe una producción local y limitada en el tiempo de cecropinas (Tryselius et al., 1992), que pudiera estar relacionada más con fenómenos de remodelación de órganos, papel que ha sido asignado a sapecina en insectos (Matsuyama y Natori, 1990) y a magaininas en anfibios como en la resorción de la cola en renacuajos (Zasloff, 1994), más que una función antiséptica.

Por otro lado, existe un daño a la pared del tubo digestivo mediada por quitinasas secretadas por el parásito (Schlein et al., 1993), y si este daño alcanzara las células epiteliales, éstas serían capaces de inducir cecropinas, ya que incluso el daño estéril de las mismas es capaz de inducir su producción (Brey et al., 1993). En otros órdenes de insectos como *Hemiptera* y en la familia *Reduviidae* han sido descritas toxinas catiónicas peptídicas que contribuyen a la hemólisis de la sangre ingerida (De Azambuja et al., 1983), así como un factor antibacteriano inducible (De Azambuja et al., 1986); hasta el presente no han sido descritas en flebotomos, a pesar de ser también un vector hematófago. Los redúvidos parecen provenir de un antepasado cuya alimentación se basaba en la succión de jugos vegetales, consecuentemente conllevó la desaparición de serina proteinasas tipo tripsina encargadas de digerir las ingestas proteicas (Barillas-Mury y Wells, 1993); cuando este orden recuperó la capacidad de ingerir sangre, la proteólisis la efectuó a partir de cisteín-proteinasas, debido a su facilidad de secreción (Lehane, 1991); las cisteínas proteinasas serían menos efectivas que las serina proteinasas y el desarrollo de toxinas hemolíticas contribuiría en parte a recuperar tal efectividad, mientras que en los dípteros no existió el ciclo fútil evolutivo en la alimentación.

A excepción de *Trypanosoma rangeli*, ningún otro Trypanosomátido invade el hemocele perdiendo la posibilidad de inducción de cecropinas y otros péptidos antibacterianos; por otra parte el mismo *Trypanosoma rangeli* es un bajo o nulo inductor de actividad microbiana basada en péptidos antibióticos, aunque sí es capaz de inducir e incrementar las actividades de otros sistemas inmunes tales como la profenoloxidasa (Mello et al., 1995). En el tubo digestivo de flebotomos debe existir un modo de control de la flora local bacteriana aunque muy escaso, la confinación de *Leishmania* en el tubo digestivo la hace sensible a la ingesta de péptidos por parte del flebotomo cuando son alimentados con una solución salina de péptidos.

Leishmania es un parásito prácticamente exclusivo de los macrófagos "in vivo"; en el laboratorio se ha logrado infectar fibroblastos (Chang, 1978) y neutrófilos (Chang, 1981), aunque en este caso los parásitos son fagocitados y destruidos; entre el armamento existente en los neutrófilos destaca las defensinas, que constituyen un 30 % del contenido proteico de los gránulos azurófilos; las defensinas HNP-2 presentan una actividad leishmanicida frente a *Leishmania donovani* a concentraciones muy inferiores a las calculadas tras la fusión del gránulo con la vacuola fagocítica (Díaz-Achirica, datos no publicados); sin embargo sólo en macrófagos alveolares de conejo se ha descrito defensinas (Lehrer et al., 1983) aunque otros péptidos catiónicos, con semejanza secuencial a histonas, han sido descritos en diversos tipos de macrófagos murinos (Hiemstra et al., 1995). Como antecedentes de terapia génica se han empleado macrófagos transfectados con genes de defensinas presentan una actividad contra *Histoplasma capsulatum* (Couto et al., 1994), y presumiblemente exhiban un cierto grado de actividad leishmanicida; en cualquier caso el mecanismo principal de eliminación de *Leishmania* intracelular se basa en la inducción de óxido nítrico; consecuentemente el papel jugado por posibles péptidos antibióticos no es esencial y jugaría únicamente un efecto sinérgico con el NO. Debido al bajo contacto que existe entre péptido y parásito, los mecanismos de defensa para péptidos existentes deben haber sido desarrollados para otra función; tanto LPG como gp63 juegan papeles pleiotrópicos en la fisiología del parásito, en la resistencia contra mecanismos oxidativos, interferencia en las señales del macrófago y del sistema inmune, y en la unión a la célula huésped y el LPG en la unión al epitelio del tubo digestivo (McConville et al., 1992) y sólo de forma tangencial contribuyen a la defensa contra los péptidos. Debido al desconocimiento que se posee sobre la superficie del amastigote, y su alta resistencia a la acción de los péptidos, la

discusión sobre los mismos requiere mayores estudios.

El escaso contacto del parásito con péptidos no parece haber inducido mecanismos de resistencia específicos contra los mismos, lo que favorece su utilización en el control del parásito y en el tratamiento de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

- 1.- El péptido CA(1-8)M(1-18), en un rango de concentración micromolar, es el más letal de los análogos testados para producir la muerte de promastigotes de *Leishmania donovani*, demostrado por inhibición de la síntesis de DNA, de proteínas y la reducción de MTT. Los análogos con secuencia más corta, que mantienen una actividad bactericida alta, presentan una menor eficacia en *Leishmania*.
- 2.- El efecto del péptido presenta una dependencia alta de la temperatura y de la fuerza iónica, pero una dependencia parcial del potencial de membrana. Otros factores como cationes divalentes, seroalbúmina bovina o pH no modifican el efecto del péptido en más de un 10%.
- 3.- La acción letal se basa en una permeabilización de la membrana plasmática del promastigote, con colapso del potencial de membrana, permeabilización a protones y a calcio, y un evidente daño morfológico en la misma.
- 4.- El péptido inhibe la respiración y provoca una bajada en los niveles de ATP, sin embargo es debido al anteriormente mencionado incremento de la permeabilidad y no a un efecto directo sobre la mitocondria, que conserva su potencial de membrana en las primeras etapas del proceso.
- 5.- A semejanza con las bacterias la primera interacción es electrostática, entre el péptido y componentes catiónicos de la membrana; la fuerza iónica y polianiones tales como heparina inhiben este proceso.
- 6.- El LPG como polianión natural y componente mayoritario en la membrana de *Leishmania* inhibe la acción del péptido, ya que cepas deficientes en LPG son más sensibles al efecto del péptido. La incubación del péptido con LPG anula parcialmente la acción leishmanicida del péptido. Los promastigotes metacíclicos, con un LPG de mayor longitud, son más resistentes al efecto lítica del péptido.

7.- Gp63, una metaloproteinasa muy abundante en la membrana del promastigote sólo inactiva parcialmente la acción del péptido, a causa de su rápida cinética de interacción con la membrana. El análogo enantiomérico sintetizado con aminoácidos D presenta mayor actividad leishmanicida que el análogo L, debido a su resistencia a las proteinasas y por otra parte demuestra la ausencia de un receptor quirral para el mecanismo de acción del péptido.

8.- La forma intracelular del parásito, el amastigote, es más resistente al efecto del péptido “in vitro”, sin embargo en macrófagos infectados y en el modelo “in vivo” murino de la enfermedad el péptido es activo mediante un mecanismo indirecto de activación de macrófagos. La encapsulación del mismo en liposomas incrementa tal efecto.

9.- El péptido no es sustrato de la proteína P cuya sobreexpresión en promastigotes produce cepas multirresistentes a fármacos. La inactivación de la proteína P por el péptido se debe a un mecanismo de depleción de ATP o a alteraciones en la fluidez de membrana.

10.- Los datos anteriormente presentados hacen que estos péptidos puedan ser candidatos a nuevos agentes leishmanicidas, aunque el modelo murino de la enfermedad no es directamente extrapolable a humanos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agerberth, B., Lee, J-Y., Bergman, T., Carlquist, M., Boman, H. G., Mutt, V. y Jornvall, H., (1991). "Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides". Eur. J. Biochem., **202**: 849-854.
- Ahmand, I. Perkis, W. R., Lupan, D. M., Selsted, M. E. y Janoff, A. S., (1995). "Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with *in vivo* antifungal activity". Biochim. Biophys. Acta, **1237**: 109-114.
- Alcouloumre, M. S., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Selsted, M. E. y Edwards, J. E., Jr., (1993). "Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans in vitro*". Antimicrob. Ag. Chemother., **37**: 2628-2632.
- Aley, S. B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M. E. y Gilling, F. D., (1994). "Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides". Infect. Immun., **62**: 5397-5403.
- Alvar, J., (1988). "Caracterización molecular de *Leishmania infantum*. Aplicación a estudios clínico-epidemiológicos". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Alvar, J., (1994). "Leishmaniasis and AIDS co-infection: the spanish example". Parasitol. Today, **10**: 160-163.
- Alvar, J., Gutiérrez-Solar, B., Pachón, I., Calbacho, E., Ramírez, M., Vallés, R., Guillén, J-L., Cañavate, C. y Amela, C., (1996). "AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem". Clin. Dermatol., **14**: 541-546.
- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R. y Moreno, J., (1997). "*Leishmania* and HIV coinfection: the first ten years". Clin Microbiol. Rev., en prensa.
- Ando, K., Okada, M. y Natori, S., (1987). "Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae". Biochemistry, **26**: 226-230.
- Andreu, D., Merrifield, R. B., Steiner, H. y Boman, H. G., (1985a). "N-terminal analogues of cecropin A: Synthesis, antibacterial activity, and conformational properties". Biochemistry, **24**: 1683-1688.
- Andreu, D., Aschauer, H.M., Kreil, G. y Merrifield, R. B., (1985b). "Solid-phase synthesis of PYLa and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4-24)] from skin secretion of *Xenopus laevis*". Eur. J. Biochem., **149**: 531-535.
- Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Wählin, B., Wade, D., Merrifield, R. B. y Boman, H. G., (1992). "Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity". FEBS Lett., **296**: 190-194.

- Angelopoulos, E., (1970). "Pellicular microtubules in the Family *Trypanosomatidae*". J. Protozool., **17**: 39-51.
- Anónimo, (1984). "The Leishmaniasis". Technical Report Series, **701**. (WHO). Ginebra.
- Anónimo, (1990). "Control of leishmaniasis". Technical Report Series, **793** pp 25. (WHO). Ginebra.
- Anónimo, (1991). TRD (WHO) News, **36**: 1.
- Anzai, K., Hamasuna, M., Kadono, H., Lee, S., Aoyagi, H. y Kirino, Y., (1991). "Formation of ion channels in planar lipid bilayer membranes by synthetic basic peptides". Biochim. Biophys. Acta, **1064**: 256-266.
- Arrowood, M. J., Jaynes, J. M. y Healey, M. C., (1991). "In vitro activities of lytic peptides against the sporozoites of *Cryptosporidium parvum*". Antimicrob. Agents Chemother., **35**: 224-227.
- Ashford, R. W., Desjeux, P. y DeRaadt, P., (1992). "Estimation of population at risk and number of cases of leishmaniasis". Parasitol. Today, **8**: 104-105.
- Assreuy, J., Cunha, F. Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C. A., Liew, F. Y. y Moncada, S., (1994). "Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*". Eur. J. Immunol., **24**: 672-676.
- Bahr, V., Stierhof, Y-D., Ilg, T., Demar, M., Quinten, M. y Overath, P., (1993). "Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein gp63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*". Mol. Biochem. Parasitol., **58**: 107-122.
- Baker, K. J., East, J. M. y Lee, A. G., (1995). "Mechanism of inhibition of the Ca²⁺-ATPase by melittin". Biochemistry, **34**: 3596-3604.
- Barillas-Mury, C. y Wells, M. A., (1993). "Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region". Insect Mol. Biol., **2**: 7-12.
- Barr, S. C., Rose, D. y Jaynes, J. M., (1995). "Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro and parasitemias in mice". J. Parasitol., **81**: 974-978.
- Barra, D. y Simmaco, M., (1995). "Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides". Trends Biotechnol., **13**: 205-209.
- Bayer, M. E. y Leive, L., (1977). "Effect of ethylenediaminetetraacetate upon the surface of *Escherichia coli*". J. Bacteriol., **130**: 1364-1381.

- Bazzo, R., Tappin, M. J., Pastore, A., Harvey, T. S., Carver, J. A. y Campbell, I. D., (1988). "The structure of melittin. A ^1H study in methanol". Eur. J. Biochem., **173**: 139-146.
- Beach, D. H., Holz Jr., G. G., y Anekwe, G. E., (1979). "Lipids of *Leishmania* promastigotes". J. Parasitol., **65**: 201-216.
- Beard, C. B., O'Neill, S. L., Tesh, R. B., Richards, F. F. y Aksoy, S., (1993). "Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria". Parasitol. Today, **9**: 179-183.
- Benaim, G. y Romero, P. J., (1990). "A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*". Biochim. Biophys. Acta, **1027**: 79-84.
- Benaim, G., Bermúdez, R. y Urbina, J. A., (1990). " Ca^{2+} transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes". Mol. Biochem. Parasitol., **38**: 61-68.
- Berman, J. D., Holz, G. G. y Beach, D. H., (1984). "Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture". Mol. Biochem. Parasitol., **12**: 1-13.
- Berman, J. D., Edwards, N., King, M. y Grogl, M., (1989). "Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*". Am. J. Trop. Med. Hyg., **40**: 159-164.
- Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I. y Fridkin, M., (1990). "All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance". FEBS Lett., **274**: 151-155.
- Beverley, S. M., (1991). "Gene amplification in *Leishmania*". Annu. Rev. Microbiol., **45**: 417-444.
- Blank, C., Bogdan, C., Bauer, C., Erb, K. y Moll, H., (1996). "Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase". Eur. J. Immunol., **25**: 745-750.
- Blondelle, S. E. y Houghten, R. A., (1991). "Probing the relationships between the structure and hemolytic activity of melittin with a complete set of leucine substitution analogs". Pept. Res., **4**: 12-18.
- Blondelle, S. E., Simpkins, L. R., Pérez-Payá, E. y Houghten, R. A., (1993). "Influence of tryptophan residues on melittin's hemolytic activity". Biochim. Biophys. Acta, **1202**: 331-336.
- Blum, J. J., (1993). "Intermediary metabolism of *Leishmania*". Parasitol. Today, **9**: 118-121.
- Boman, H. G., (1994). "Cecropins: antibacterial peptides from insects and pigs". En: Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect Host Defense. pp. 3-17. Eds., Jules A. Hoffman, Charles A. Janeway, Jr., y Shunji Natori. R.G. Landes Company. Austin, Texas (EUA).
- Boman, H. G., (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity". Annu. Rev. Immunol., **3**: 61-92.

- Boman, H. G. y Steiner, H., (1981). "Humoral immunity in *Cecropia pupae*". Curr. Top. Microbiol. Immunol., **94-95**: 75-91.
- Boman, H. G. y Hultmark, D., (1987). "Cell-free immunity in insect". Annu. Rev. Microbiol., **41**: 103-126.
- Boman, H. G., Boman, A. I., Andreu, D., Li, Z-Q., Merrifield, R. B., Schlenstedt, G. y Zimmermann, R., (1989a). "Chemical synthesis and enzymatic processing of precursor forms of cecropin A and B". J. Biol. Chem., **264**: 5852-5860.
- Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wählin, B. y Merrifield, R. B., (1989b). "Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids". FEBS Lett., **259**: 103-106.
- Boman, H. G., Faye, I., Gudmundsson, G. H., Lee, J-Y. y Lidholm, D. A., (1991). "Cell-free immunity in cecropia-A model system for antibacterial proteins". Eur. J. Biochem., **201**: 23-31.
- Boman, H. G., Ageberth, B. y Boman, A., (1993). "Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine". Infect. Immun., **61**: 2978-2984.
- Bordier, C., (1987). "The promastigote surface protease of *Leishmania*". Parasitol. Today, **3**: 151-153.
- Bordier, C., Etges, R. J., Ward, J., Turner, M. J. y Cardoso de Almeida, M. L., (1986). "*Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycopospholipid membrane anchor". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 5988-5991.
- Borst, P. y Ouellette, M., (1995). "New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa". Annu. Rev. Microbiol., **49**: 427-460.
- Bouvier, J., Etges, R. y Bordier, C., (1987). "Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*". Mol. Biochem. Parasitol., **24**: 73-79.
- Bouvier, J., Bordier, C., Vogel, H., Reichelt, R. y Etges, R., (1989). "Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase". Mol. Biochem. Parasitol., **37**: 235-246.
- Bouvier, J., Schneider, P., Etges, R. y Bordier, C., (1990). "Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*". Biochemistry, **29**: 10113-10119.
- Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M. y Ashida, M., (1993). "Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 6275-6279.

- Bryceson, A., (1987). "Therapy in man". En: Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol. II, pp. 848-907. Eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick. Academic Press, Londres.
- Buchmüller-Rouiller, Y y Maüel, J., (1991). "Macrophage activation for intracellular killing as induced by calcium ionophore. Correlation with biologic and biochemical events". J. Immunol., **146**: 217-223.
- Bulet, P., Cociancich, S., Hetru, C. y Hoffmann, J. A., (1992). "A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata)". Eur. J. Biochem., **209**: 977-984.
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A. y Hoffmann, J.A., (1993). "A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution". J. Biol. Chem., **268**: 14893-14897.
- Butcher, B. A., Sklar, L. A., Seamer, L. C. y Glew, R. H., (1992). "Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages". J. Immunol., **9**: 2879-2886.
- Button, L. L., Russell, D. G., Klein, H. L., Medina-Acosta, E., Kares, R. E. y McMaster, W. R., (1989). "Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed". Mol. Biochem. Parasitol., **32**: 271-284.
- Cairns, B. R., Collard, M. W. y Landfear, S. M., (1989). "Developmentally regulated gene from *Leishmania* encodes a putative membrane transport protein". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 7682-7686.
- Campos-Neto, A., Soong, L., Cordova, J. L., Sant'Angelo, D., Skeiky, Y. A., Ruddle, N. H., Reed, S. G., Janeway Jr., C. y McMahon-Pratt, D. (1995). "Cloning and expression of a *Leishmania donovani* gene instructed by a peptide isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected macrophages". J. Exp. Med., **182**: 1423-1433.
- Carafoli, E., (1987). "Intracellular calcium homeostasis". Annu. Rev. Biochem., **56**: 395-433.
- Carlsson, A., Engström, P., Palva, E. T. y Bennich, H., (1991). "Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription". Infect. Immun., **59**: 3040-3045.
- Cassel, D., Shoubi, S., Glusman, G., Cukierman, E., Rotman, M. y Zilberstein, D., (1991). "*Leishmania donovani*: characterization of a 38 kDa membrane protein that cross-reacts with the mammalian G-proteins transducin". Exp. Parasitol., **72**: 411-417.
- Casteels, P. y Tempst, P., (1994). "Apiadaecin-type peptide antibiotic function through a non-pore forming mechanism involving stereospecificity". Biochem. Biophys. Res. Comm., **199**: 339-345.

- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. y Tempst, P., (1989). "Aptideacins: Antibacterial peptides from honeybees". EMBO J., **8**: 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F. y Tempst, P., (1990). "Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybees (*Apis mellifera*)". Eur. J. Biochem., **187**: 381-386.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F. y Tempst, P., (1993). "Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in honeybee (*Apis mellifera*)". J. Biol. Chem., **268**: 7044-7054.
- Chalk, R., Towson, H. y Ham, P. J., (1995). "*Brugia pahangi*: The effects of cecropins on microfilariae *in vitro* and in *Aedes aegypti*". Exp. Parasitol., **80**: 401-406.
- Champsi, J. y McMahon-Pratt, D., (1988). "Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection". Infect. Immunol., **56**: 3272-3279.
- Chan, M. M. y Fong, D., (1994). "Plant microtubule inhibitors against trypanosomatids". Parasitol. Today, **10**: 448-451.
- Chan, J., Fujira, T., Brennan, P., McNeil, M. y Turco, S. J., (1989). "Microbial glycoproteins and virulence factors that scavenge oxygen radicals". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 2453-2457.
- Chang, K. P., (1978). "*Leishmania* infection of human skin fibroblasts *in vitro*: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes and their intracellular transformation". Am. J. Trop. Med. Hyg., **27**: 1084-1086.
- Chang, K. P., (1981). "Leishmanicidal mechanism of human polymorphonuclear phagocytes". Am. J. Trop. Med. Hyg., **30**: 322-333.
- Chang, K. P., Fong, D. y Bray, R. S., (1985). "Biology of *Leishmania* and leishmaniasis". En: Leishmaniasis. pp 1-30. Eds. K. P. Chang y R. Bray. Elsevier Science Publ. B. V., Amsterdam.
- Chaudhuri, G. y Chang, K. P., (1988). "Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes". Mol. Biochem. Parasitol., **27**: 43-52.
- Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A. y Chang, K. P., (1989). "Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*: a metallo-enzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages". J. Biol. Chem., **264**: 7483-7489.
- Chiquero Lozano, M. J., (1996). "Mecanismos de multirresistencia a farmacos en *Leishmania tropica*". Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Granada.

- Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. y Mauzerall, D., (1988). "Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipids membranes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 5072-5076.
- Chulay, J. D., Spencer, H. C. y Mugambi, M., (1985). "Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate)". Am. J. Trop. Med. Hyg., **34**: 702-709.
- Cillari, E., Arcoleo, F., Dieli, M., D'Agostino, R., Gromo, G., Leoni, F. y Milano, S., (1994). "The macrophage-activating tetrapeptide tuftsin induces nitric oxide synthesis and stimulates murine macrophages to kill *Leishmania* parasites *in vitro*". Infect. Immun., **62**: 2649-2652.
- Clark, D. P., Durell, S., Maloy, W. L. y Zasloff, M., (1994). "Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic polymyxin". J. Biol. Chem., **269**: 10849-10855.
- Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A. y Letellier, L., (1993). "Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*". J. Biol. Chem., **268**: 19239-19245.
- Cornut, I., Buttner, K., Dasseux, J. L. y Duforcq, J., (1994). "The amphipathic alpha-helix concept. Application to the novo design of ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic activity higher than that of melittin". FEBS Lett., **349**: 29-33.
- Couto, M. A., Liu, L., Lehrer, R. I. y Ganz, T., (1994). "Inhibition of intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensin". Infect. Immun., **62**: 2375-2378.
- Cruciani, R. A., Barker, J. L., Zasloff, M., Chen, H.-C. y Colamonici, O., (1991). "Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 3792-3796.
- Cunha, F. Q., Moss, D. W., Leal, L. M. C., Moncada, S. y Liew, Y., (1993a). "Induction of macrophage parasitocidal activity by *Staphylococcus aureus* and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway". Immunology, **78**: 563-567.
- Cunha, F. Q., Assreuy, J., Xu, D., Charles, I., Liew, F. Y. y Moncada, S., (1993b). "Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages". Eur. J. Immunol., **23**: 1385-1388.
- Da Silva, R. y Sacks, D. L., (1987). "Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigotes virulence and attenuation". Infect. Immun., **55**: 2802-2806.
- Darveau, R. P., Cunningham, M. D., Seachord, C. L., Cassiano-Clough, L.M., Cosand, W. L., Blake, J. y Watkins, C. S., (1991). "Beta-lactam antibiotics potentiate magainin-2 antimicrobial activity "in vitro" and "in vivo". Antimicrob. Agents Chemother., **35**: 1153-

1159.

- David, S. A., Mathan, V. I. y Balaram, P., (1992). "Interaction of melittin with endotoxic lipid A". Biochim. Biophys. Acta, **1123**: 269-274.
- Davidson, R. N., Croft, S. L., Scott, A., Maini, M., Moody, A. H. y Bryceson, A. D. M., (1991). "Successful use of liposomal amphotericin B in the treatment of drug-related leishmaniasis". Lancet, **337**: 1061-1062.
- De Azambuja, P., Guimaraes, J. A. y Garcia, E. S., (1983). "Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*. Evidence and partial characterization." J. Insect Physiol., **29**: 833-837.
- De Azambuja, P., Freitas, C. C., y García, E. S., (1986). "Evidence and partial characterization of an inducible antibacterial factor in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*". J. Insect Physiol., **32**: 807-812.
- De Ibarra, A. A. L., Howard, J. G. y Snary, D., (1982). "Monoclonal antibodies to *Leishmania tropica major* specificities and antigen location". Parasitology, **85**: 423-531.
- De Kossodo, S., Grau, G. E., Louis, J. A. y Müller, I., (1994). "Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and TNF- β and their receptors in experimental cutaneous leishmaniasis". Infect. Immun., **62**: 1414-1420.
- DeGrado, W. F., Musso, G. F., Lieber, M., Kaiser, E. T. y Kedzy, F. J., (1982). "Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue". Biophys. J., **37**: 329-338.
- Del Campo, F. F., Hernández-Asensio, M. y Ramírez, J. M., (1975). "Transport of α -methyl glucoside in mutants of *Escherichia coli* K12 deficient in Ca²⁺, Mg²⁺-activates adenosine triphosphatase". Biochem. Biophys. Res. Commun., **63**: 1099-1105.
- Dempsey, C. E., (1990). "The actions of melittin on membranes". Biochim. Biophys. Acta, **1031**: 143-161.
- Descoteaux, A. y Matlashewski, G., (1989). "*C-fos* and TNF- α gene expression in *Leishmania donovani* infected macrophages". Mol. Cell Biol., **9**: 5223-5227.
- Descoteaux, A., Turco, S. J., Sacks, D. L. y Matlashewski, G., (1991). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages". J. Immunol., **146**: 2747-2753.
- Diamond, G., Russell, J. P. y Bevins, C. L., (1996). "Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 5156-5160.
- Díaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E. y Rivas L., (1994). "Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin A-melittin hybrid peptides". Eur.

J. Biochem., **224**: 257-263.

- Díaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Andreu, D. y Rivas, L., (1996). "Mechanism of action of cecropin A-melittin hybrid peptides on *Leishmania sp.* parasites". En: Peptides, Chemistry, Structure and Biology: Proceedings of the Fourteenth American Peptide Symposium. Eds. P. T. P. Kaumaya y R. S. Hodges. Mayflower Scientific Lda., Inglaterra.
- Dimarcq, J. L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Rankine, S. M., Fothergill, J. E. y Hoffmann, J. A., (1988). "Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin-A". Eur. J. Biochem., **171**: 17-22.
- Docampo, R. y Pignataro, O. P., (1991). "The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathways in *Trypanosoma cruzi*". Biochem. J., **275**: 407-411.
- Drori, S., Eytan, G. D. y Assaraf, Y. G., (1995). "Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability". Eur. J. Biochem., **228**: 1020-1029.
- Duclohier, H., Molle, G. y Spach, G., (1989). "Antimicrobial peptide magainin 1 from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers". Biophys. J., **56**: 1017-1021.
- Dunn, P. E., (1986). "Biochemical aspects of insect immunology". Annu. Rev. Entomol., **31**: 321-339.
- Durell, S. R., Raghunathan, G. y Guy, R., (1992). "Modelling the ion channel structure of cecropin". Biophys. J., **63**: 1623-1631.
- Eilam, Y., El-On, J. y Spira, D. T., (1985). "*Leishmania major*: excreted factor, calcium ions and the survival of amastigotes". Exp. Parasitol., **59**: 161-168.
- El-On, J., Schnur, L. F. y Greenblatt, C. L., (1979). "*Leishmania donovani*: physicochemical, immunological and biological characterization of excreted factor from promastigotes". Exp. Parasitol., **47**: 254-269.
- El-On, J., Bradley, D. J. y Freeman, J. C., (1980). "*Leishmania donovani*: activation of excreted factor in hydrolytic enzymes activity of macrophages from mice with genetically different resistance infection". Exp. Parasitol., **49**: 167-174.
- Endicott, J. A. y Ling, V., (1989). "The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance". Annu. Rev. Biochem., **58**: 137-171.
- Engström, P., Carlsson, A., Engström, A., Tao, Z-J., y Bennich, H., (1984). "The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*". EMBO J., **3**: 3347-3351.

- Etges, R., (1992). "Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata* and *Herpetomonas samuelpessoai*". Acta Trop., **50**: 205-217.
- Etges, R., Bouvier, J. y Bordier, C., (1986a). "The major surface protein of *Leishmania* promastigote is a protease". J. Biol. Chem., **261**: 9098-9101.
- Etges, R., Bouvier, J. y Bordier, C., (1986b). "The major surface protein of *Leishmania* promastigote is anchored in the membrane by a myristic acid-labeled phospholipid". EMBO J., **5**: 597-601.
- Fernández, I., Ubach, J., Fuxreiter, M., Andreu, J. M., Andreu, D. y Pons, M., (1996). "Conformation and self-association of a hybrid peptide of cecropin A and melittin with improved antibiotic activity". Chem. Eur. J., **2**: 838-846.
- Fink, J., Merrifield, R. B., Boman, A. y Boman, H. G., (1989). "The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity". J. Biol. Chem., **264**: 6260-6267.
- Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M. y Romeo, D., (1990). "Amino acids sequences of two proline-rich bactericins - Antimicrobial peptides of bovine neutrophils". J. Biol. Chem., **265**: 18871-18874.
- Frankenburg, S., Leibovici, V., Mansbach, N., Turco, S. J. y Rosen, G., (1990). "Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan". J. Immunol., **145**: 4284-4289.
- Gallagher, M. P., Pearce, S. R. y Higgins, C. F., (1989). "Identification and localization of the membrane-associated, ATP-binding subunit of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*". Eur. J. Biochem., **180**: 133-141.
- Gamarro, F., Chiquero, M. J., Amador, M. V., Légaré, D., Ouellette, M. y Castanys, S., (1994). "P-Glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*". Biochem. Pharmacol., **47**: 1939-1947.
- Gazit, E., Lee, W-J., Brey, P. T. y Shai, Y., (1994). "Mode of action of the antibacterial cecropin B2: A spectrofluorometric study". Biochemistry, **33**: 10681-10692.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G. y Shai, Y., (1995). "Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles". Biochemistry, **34**: 11479-11488.
- Gil, J., Higgins, T. y Rozengurt, E., (1991). "Mastoparan, a novel mitogen for Swiss 3T3 cells, stimulates pertussis toxin-sensitive arachidonic acid release without inositol phosphate accumulation". J. Cell Biol., **113**: 943-950.
- Glaser, T. A. y Mukkada, A. J., (1992). "Proline transport in *Leishmania donovani* amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential". Mol. Biochem. Parasitol., **51**: 1-8.

- Glaser, T. A., Moody, S. F., Handman, E., Bacic, A. y Spithill, T. W., (1991). "An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of *Leishmania major*". Mol. Biochem. Parasitol., **45**: 337-344.
- Glaser, T. A., Utz, G. L. y Mukkada, A. J., (1992). "The plasma membrane electrical gradient (membrane potential) in *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes". Mol. Biochem. Parasitol., **51**: 9-16.
- Gradoni, L. y Gramiccia, M., (1994). "*Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status?". Parasitol. Today, **10**: 264-267.
- Green, S. I., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S. y Nacy, C. A., (1990). "*Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α ". J. Immunol., **145**: 4290-4297.
- Greis, K. D., Turco, S. J., Thomas, J. R., McConville, M. J., Homans, S. W. y Ferguson, M. A., (1992). "Purification and characterization of an extracellular phosphoglycan from *Leishmania donovani*". J. Biol. Chem., **267**: 5876-5881.
- Groisman, E. A., (1994). "How bacteria resist killing by host-defense peptide". Trends Microbiol., **2**: 444-449.
- Grogl, M., Oduola, A. M., Cordero, L. D. y Kyle, D. L., (1989). "*Leishmania* spp.: development of pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure". Exp. Parasitol., **69**: 78-90.
- Grogl, M., Thomason, T. N. y Franke, E. D., (1992). "Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease". Am. J. Trop. Med. Hyg., **47**: 117-126.
- Gros, P., Croop, J. y Housman, D., (1986). "Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins". Cell, **47**: 371-380.
- Gudmundsson, G. G., Lidholm, D. A., Asling, B., Gan, R. y Boman, H. G., (1991). "The locus, cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*". J. Biol. Chem., **266**: 11510-11517.
- Gunders, A. E., (1987). "Vaccination: past and future role in control". En: The Leishmaniases in Biology and Medicine. Vol. II. pp. 929-941. Eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick. Academic Press, Londres.
- Gupta, A.P., (1979). "Insect hemocytes. Development, forms, functions and techniques". pp 614. Cambridge Univ. Press, Londres/Nueva York.
- Guy, R. A. y Belosevic, M., (1993). "Comparison of receptors requires for entry of *Leishmania*

- major* amastigotes into macrophages". Infect. Immun., **61**: 1553-1558.
- Gwadz, R. W., Kaslow, D., Lee, J-Y., Maloy, W. L., Zasloff, M. y Miller, L. H., (1989). "Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes". Infect. Immun., **57**: 2628-2633.
- Habermann, E., (1972). "Bee and wasp venoms". Science, **177**: 314-322.
- Hammond, D. J. y Gutteridge, W. E. (1984). "Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*". Mol. Biochem. Parasitol., **13**: 243-261.
- Hancock, R. E. W., (1984). "Alterations in outer membrane permeability". Annu. Rev. Microbiol., **38**: 237-264.
- Handman, E., (1990). "Study of *Leishmania major*-infected macrophages by use lipophosphoglycan specific monoclonal antibodies". Infect. Immun. **58**: 2297-2302.
- Handman, E. y Hocking, R. E., (1982). "Stage-specific, strain-specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species identified by monoclonal antibodies". Infect. Immun., **37**: 28-33.
- Handman, E., Greenblatt, C. L. y Goding, J. W., (1984). "An amphipatic sulphate glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies". EMBO J., **3**: 2301-2306.
- Handman, E., Mitchell, G. F. y Goding, J. W., (1987). "*Leishmania major*: a very sensitive dot-blot ELISA for detection of parasites in cutaneous lesion". Mol. Biol. Med., **5**: 377-383.
- Hermetter, A. y Lakowicz, J. R., (1986). "The aggregation state of melittin in lipids bilayers. An energy transfer study". J. Biol. Chem., **261**: 8243-8248.
- Hernández, C., Mor, A., Dagger, F., Nicolas, P., Hernández, A., Benedetti, E. L. y Dunia, I., (1992). "Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin". Eur. J. Cell Biol., **59**: 414-424.
- Herwaldt, B. L. y Berman, J. D., (1992). "Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies". Am. J. Trop. Med. Hyg., **46**: 296-306.
- Hiemstra, P. S., Eisenhauer, P. B., Harwig, S. S. L., van der Basselaar, M. T., van Furth, R. y Lehrer, R., (1995). "Antimicrobial proteins of murine macrophages". Infect. Immun., **61**: 3038-3043.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. y Ross, E. M., (1988). "Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimic receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins)". J. Biol. Chem., **263**: 6491-6494.
- Higashijima, T., Burnier, J. y Ross, E. M., (1990). "Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines". J. Biol. Chem., **265**: 14176-14186.

- Hockertz, S., Franke, G., Paulini, I. y Lohmann-Matthes, M. L., (1991). "Immunotherapy of murine visceral leishmaniasis with murine recombinant interferon-gamma and MTP-PE encapsulated in liposomes". J. Interferon Res., **11**: 177-185.
- Hodinka, R. L. y Modrzakowski, M. C., (1983). "Bactericidal activity of granule contents from rat polymorphonuclear leukocytes". Infect. Immun., **40**: 139-146.
- Hoffmann, J. A., (1995). "Innate immunity of insects". Curr. Op. Immunol., **7**: 4-10.
- Hoffmann, J. A. y Hetru, C., (1992). "Insect defensins: inducible antibacterial peptides". Immunol. Today, **13**: 411-415.
- Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M. y Hetru, C., (1996). "Innate immunity in higher insects". Curr. Op. Immunol., **8**: 8-13.
- Holak, T. A., Engström, A., Krulis, P. J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T. A., Gronenborn, A. M. y Clore, G. M. (1988). "The solution conformation of the antibacterial peptide Cecropin-A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study". Biochemistry, **27**: 7620-7629.
- Homans, S. W., Melhert, A. y Turco, S. J., (1992). "Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*". Biochemistry, **31**: 654-661.
- Huang, C. M., Chen, H-C. y Zierdt, C. H., (1990). "Magainin analogs effective against pathogenic protozoa". Antimicrob. Agents Chemother., **34**: 1824-1826.
- Hubert, F., Noël, T. y Roch, P., (1996). "A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*)". Eur. J. Biochem., **240**: 302-306.
- Hugosson, M., Andreu, D., Boman, H. G., y Glaser, E., (1994). "Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and protein import". Eur. J. Biochem., **223**: 1027-1033.
- Hultmark, D., Engstrom, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H. y Boman, H. G., (1983). "Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*". EMBO J., **2**: 571-576.
- Hunt, R. y Ellar, D. J., (1974). "Isolation of the plasma membrane of trypanosomatid flagellated: general characterization and lipid composition". Biochim. Biophys. Acta, **339**: 173-189.
- Ilg, T., Menz, B., Winter, G., Russell, D. G., Etges, R., Schell, D. y Overath, P., (1990). "Monoclonal antibodies to *Leishmania mexicana* promastigotes antigens. Secreted acid phosphatase and other proteins share epitopes with lipophosphoglycan". J. Cell Sci., **99**: 175-180.
- Ilg, T., Etges, R., Overath, P., McConville, M. J., Thomas-Oates, J., Thomas, J., Homans, S. W. y Ferguson, M. A. J., (1992). "Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan".

- J. Biol. Chem., **267**: 6834-6840.
- Ilg, T., Harbecke, D. y Overath, P., (1993). "The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum". FEBS Lett., **327**: 103-107.
- Ip, H. S., Orn, A., Russell, D. G. y Cross, G. A., (1990). "*Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase". Mol. Biochem. Parasitol., **40**: 163-172.
- Iwanaga, S., Muta, T., Shigenaga, T., Miura, Y., Seki, N., Saito, T. y Kawabata, S., (1994). "Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense". Ann. N. Y. Acad. Sci., **712**: 102-116.
- Iwu, M. M., Jackson, J. E. y Schuster, B. G. (1994). "Medicinal plants in the fight against leishmaniasis". Parasitol. Today, **10**: 65-68.
- Jackson, P. R., Wohlhieter, J. A., Jackson, J. E., Sayles, P., Diggs, C. L. y Hockmeyer, W. T., (1984). "Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasite responsible of visceral and cutaneous disease". Am. J. Trop. Med. Hyg.: **33**: 808-819.
- Jaffe, C. L., Pérez, L. y Schnur, L. F., (1990). "Lipophosphoglycan and secreted acid phosphatase of *Leishmania tropica* share species-specific epitopes". Mol. Biochem. Parasitol., **41**: 233-240.
- Jähning, F. y Etges, R., (1988). "Secondary structure of the promastigote surface protease of *Leishmania*". FEBS Lett., **241**: 79-82.
- Janeway Jr., C. A., (1994). "The role of microbial pattern recognition in itself: Non-self discrimination in innate and adaptive immunity". En: "Phylogenetic perspectives in immunity: the insect host defense". pp 115-122. Eds. J. A. Hoffmann, C. A. Janeway Jr., y S. Natori, R. G. Landes Co. Austin (EUA).
- Jardim, A., Alexander, J., Teh, H. S., Ou, D. y Olafson, R. W., (1990). "Immunoprotective *Leishmania major* synthetic T cell epitopes". J. Exp. Med., **172**: 645-648.
- Jardim, A., Funk, V., Caprioli, R. M. y Olafson, R.W. (1995). "Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein". Biochem. J., **305**: 307-313.
- Jaynes, J. M., Burton, C. A., Barr, S. B., Jeffers, G. W., Julian, G. R., White, K. L., Enright, F. M., Klei, T. R. y Laine, R. A., (1988). "*In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptide on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*". FASEB J., **2**: 2878-2883.
- Juranka, P., Zhang, F., Kulpa, J., Endicott, J., Blight, M., Holland, I. B. y Ling, V. (1992). "Characterization of the hemolysin transporter, HlyB, using an epitope insertion". J. Biol. Chem., **267**: 3764-3770.

- Juretic, D., Chen, H. C., Brown, J. H., Morell, J. L., Hendler, R. W. y Westerhoff, H. V., (1989). "Magainin 2 amide and analogues. Antimicrobial activity, depolarization and susceptibility to proteolysis". FEBS Lett., **249**: 219-223.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Lee, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J., Mak, T. W., Taniguchi, T. y Vilcek, J., (1994). "Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages". Science, **263**: 1612-1615.
- Kanai, A. y Natori, S., (1989). "Cloning of gene cluster for sarcotoxin I, antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*". FEBS Lett., **258**: 199-220.
- Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gattef, E., Hoffmann, J. A. y Reichhart, J. M., (1993). "Insect immunity: 217 bp repeats nesting a κ B-related sequence confer inducibility to the dipterin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*". EMBO J., **12**: 1561-1568.
- Karp, C. L., Turco, S. J. y Sacks, D. L., (1991). "Lipophosphoglycan masks recognition of the *Leishmania donovani* promastigote surface by human kala-azar serum". J. Immunol., **147**: 680-684.
- Kataota, M., Head, J. F., Seaton, B. A. y Engelman, D. M., (1989). "Melittin binding causes a large calcium-dependent conformational change in calmodulin". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 6944-6948.
- Kaur, K., Coons, T., Emmett, K. y Ullman, B., (1988). "Methotrexate resistant *Leishmania donovani* genetically deficient in the folate-methotrexate transporte". J. Biol. Chem., **263**: 7020-7028.
- Killick-Kendrick, R. (1978). "Recent advances and outstanding problems in the biology specific phlebotomine sandflies. A review". Acta Tropica, **35**: 764-776.
- Killick-Kendrick, R. (1990). "The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with the specific reference to the form infective to the vertebrate host". Ann. Parasitol. Hum. Comp., **65**: 37-42.
- Kimbell, D. A., (1991). "Insect antibacterial proteins: not just for insects and against bacteria". BioEssays, **13**: 657-663.
- Kinderlen, A. F. y Kaye, P. M. (1990). "A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites". J. Immunol Meth., **127**: 11-18.
- King, D. L., Chang, Y. D. y Turco, S. J. (1987). "Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*". Mol. Biochem. Parasitol., **24**: 47-53.
- King, D. L. y Turco, S. J. (1988). "A ricin agglutinin-resistant clone of *Leishmania donovani* deficient in lipophosphoglycan". Mol. Biochem. Parasitol., **28**: 285-294.

- Knodler, L. A., Schofield, P. J. y Edwards, M. R. (1992). "Glucose transport in *Crithidia luciliae*". Mol. Biochem. Parasitol., **56**: 1-14.
- Konji, V. N., Olembo, N. K. y Pearson, D. J. (1988). "Proline synthesis in the fat body of the tsetse fly *Glossina morsitans* and its stimulation by isocitrate". Insect Biochem., **18**: 449-452.
- Kooy, R. F., Hirumi, H., Moloo, S. K., Nantulya, V. M., Dukes, P., Van der Linden, D. M., Puijndam, W. A. L., Janse, C. J. y Overdulve, J. P. (1989). "Evidence for diploidy in metacyclic forms of African trypanosomes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 5469-5472.
- Krassner, S. M. y Flory, B. (1977). "Physiologic interactions between L-proline and D-glucose in *Leishmania tarentolae*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma scelopori* culture forms". Acta Trop., **34**: 157-166.
- Kreutzer, R. D., Yemma, J. J., Grogl, M., Tesh, R. B. y Martin, T. I., (1994). "Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)". Am. J. Trop. Med. Hyg., **51**: 301-307.
- Kristensen, S. R., (1994). "Mechanism of cell damage and enzyme release". Dan. Med. Bull., **41**: 423-433.
- Kylsten, P., Samakovlis, C. y Hultmark, D. (1990). "The cecropin locus in *Drosophila*: A gene compact cluster involved in the response to infection". EMBO J., **9**: 217-224.
- Laemmli, U. K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature, **309**: 716-717.
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J. L., Wicker, C., Reichhart, J. M., Dunbar, B., Lepage, P., Van Dorsselaer, A., Hoffman, J., Fothergill, J. y Hoffmann, D., (1989). "Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 262-266.
- Langford, C. K., Ewbank, S. A., Hanson, S.S., Ullman, B. y Landfear, S. M. (1992). "Molecular characterization of two genes encoding members of the glucose transporter superfamily in the parasitic protozoan *Leishmania donovani*". Mol. Biochem. Parasitol., **55**: 51-64.
- Langreth, S. G., Berman, J. D., Riordan, G. P. y Lee, L. S., (1983). "Fine-structural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs in vitro". J. Protozool., **30**: 555-561.
- Lawrence, F. y Robert-Gero, M., (1985). "Induction of heat shock and stress in promastigotes of three *Leishmania* species". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 4414-4417.
- Lazarovici, P., Primor, N. y Loew, L. M., (1986). "Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the red sea moses sole (*Pardachirus marmoratus*). J. Biol. Chem. **261**: 16704-16713.

- Lear, J. D., Wasserman, Z. R. y DeGrado, W. F., (1988). "Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels". Science, **240**: 1177-1181.
- Lee, J. Y., Boman, A., Sun, C., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, V. y Boman, H. G., (1989), "Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 9159-9162.
- Lehane, M. J. (1991). "Biology of blood-sucking insects". pp. 89. Ed. M. J. Lehane, Harper Collins Academic (Londres, RU).
- Lehrer, R. I., Selsted, M. E., Szklarek, y Fleischmann, J., (1983). "Antibacterial activity of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages". Infect. Immun., **42**: 10-14.
- Lehrer, R. I., Szklarek, D., Ganz, T. y Selsted, M. E., (1985). "Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity". Infect. Immun., **49**: 207-211.
- Lehrer, R. I., Ganz, T., Szklarek, D. y Selsted, M. E., (1988). "Modulation of the *in vitro* candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations". J. Clin. Invest., **81**: 1829-1835.
- Lehrer, R. I., Barton, A., Daher, D. A., Harwig, S. S., Ganz, T. y Selsted, M. E., (1989). "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity". J. Clin. Invest., **84**: 553-561.
- Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K. y Ganz, T., (1993). "Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells". Annu. Rev. Immunol., **11**: 105-128.
- Leive, L., (1968). "Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by ethylenediaminetetraacetate". J. Biol. Chem., **243**: 2373-2380.
- Lerner, E. A. y Shoemaker, C. B., (1992). "Maxadilan: Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator". J. Biol. Chem., **267**: 1062-1066.
- Lerner, E. A., Ribero, J. M. C., Nelson, R. J. y Lerner, M. R., (1991). "Isolation of maxadilan. A potent vasodilator peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*". J. Biol. Chem., **266**: 11234-11236.
- Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vra, J. y Wallace, F. (1980). "A newly revised classification of the *Protozoa*". J. Protozool., **27**: 37-58.
- Levy, O., Ooi, C. E., Weiss, J., Lehrer, R. I. y Elsbach, P., (1994). "Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on *Escherichia coli*". J. Clin. Invest., **94**: 672-682.
- Li, Y., Severn, A., Rogers, M. V., Palmer, R. M. J., Moncada, S. y Liew, F. Y., (1992). "Catalase

- inhibits nitric oxide synthesis and the killing of intracellular *Leishmania major* in murine macrophages". Eur. J. Biochem., **22**: 441-446.
- Lichtenstein, A. K., (1991). "Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for initial alteration of the plasma membrane". J. Clin. Invest., **88**: 93-100.
- Lichtenstein, A. K., Ganz, T., Selsted, M. E. y Lehrer, R. I., (1986). "In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes". Blood, **68**: 1407-1410.
- Lichtenstein, A. K., Ganz, T., Nguyen, T-M., Selsted, M. E. y Lehrer, R. I., (1988). "Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity". J. Immunol., **140**: 2686-2694.
- Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. J. y Moncada, S., (1990a). "Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine". J. Immunol., **144**: 4794.
- Liew, F. Y., Li, Y., y Millott, S. (1990b). "Tumor necrosis factor-alpha in combination with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide". J. Immunol., **145**: 4306-4310.
- Lincke, C. R., van der Blick, A. M., Schuurhuis, G. J., van der Velde-Koerts, T., Smit, J. J y Brust, P., (1990). "Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA". Cancer Res., **50**: 1779-1785.
- Liveanu, V., Webster, P. y Zilberstein, D. (1991). "Localization of the plasma membrane and mitochondrial H⁺-ATPase in *Leishmania donovani* promastigotes". Eur. J. Cell Biol., **54**: 95-101.
- Locksley, R. M., Heinzel, F. P., Holaday, B. J., Mutha, S.S., Reiner, S. L. y Sadick, M. D., (1991). "Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ subsets during murine *Leishmania major* infection". Res. Immunol., **142**: 28-32.
- Loe, D. W. y Sharom, F. J., (1994). "Interaction of multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells with the peptide ionophore gramicidin D". Biochim. Biophys. Acta, **1190**: 72-84.
- López, J. A., LeBowitz, J. H., Beverley, S. M., Rammensee, H. G. y Overath, P. (1993). "*Leishmania mexicana* promastigotes induce cytotoxic T lymphocytes *in vivo* that do not recognize infected macrophages". Eur. J. Immunol., **23**: 217-223.
- Love, D. C., Esko, J. D. y Mosser, D. M. (1993). "A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans". J. Cell. Biol., **123**: 759-766.
- Lowenberger, C. A., Ferdig, M. T., Bulet, P., Khalili, S., Hoffmann, J. A. y Christensen, B. M., (1996). "*Aedes aegypti*: induced antibacterial proteins reduce the establishment and development of *Brugia malayi*". Exp. Parasitol., **83**: 105-122.

- Maloy, W. L. y Kari, U. P., (1995). "Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides". Biopolym., **37**: 105-122
- Mancheño, J. M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A., Díaz-Achirica, P., Andreu, D., Rivas, L. y Gavilanes, J. G., (1996). "Release of lipid vesicle contents by an antibacterial cecropin-A-melittin hybrid peptide". Biochemistry, **35**: 9892-9899.
- Marín, F., Marín, I. y Martín-Luengo, F., (1982). "Papel de perros y zorros como reservorios de leishmaniosis en la región murciana. Estudios preliminares". Rev. Ibér. Parasitol., **42**: 307-313.
- Martínez, S. y Marr, J. J., (1992). "Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis". N. Engl. J. Med., **326**: 741-744.
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. y Moriyón, I., (1995). "The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides". Infect. Immun., **63**: 3054-3061.
- Matsuyama, K. y Natori, S., (1988). "Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*". J. Biol. Chem., **263**: 17117-17121.
- Matsuyama, K. y Natori, S., (1990). "Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly)". J. Biochem. Tokyo, **108**: 128-132.
- Matsuzaki, K., Harada, M., Funakoshi, S., Fujui, N. y Miyajima, K., (1991). "Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers". Biochim. Biophys. Acta, **1063**: 162-170.
- Matsuzaki, K., Murase, O. y Miyajima, K., (1995a). "Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2 in phospholipid bilayer". Biochemistry, **34**: 12553-12559.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N. y Miyajima, K., (1995b). "Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2". Biochemistry, **34**: 3423-3429.
- Mazumder, S., Mukherjee, T., Ghosh, J., Ray, M. y Bhaduri, A. (1992). "Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca²⁺-ATPase by endogenous calmodulin". J. Biol. Chem., **267**: 18440-18446.
- McConville, M. J. y Bacic, A., (1989). "A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*". J. Biol. Chem., **264**: 757-766.
- McConville, M. J. y Blackwell, J. M. (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*". J. Biol. Chem., **266**: 15170-15179.
- McConville, M.J., Thomas-Oates, J. E., Ferguson, M. A. J. y Homans, S. W., (1990). "Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*". J. Biol. Chem., **265**: 19611-19621.

- McConville, M. J., Turco, S. J., Ferguson, M. A. J. y Sacks, D. L., (1992). "Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage". EMBO J., **11**: 3593-3600.
- McGrath, J. P. y Varshavsky, A., (1989). "The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein". Nature, **340**: 400-404.
- McMahon-Pratt, D., Traub-Cseko, Y., Lohman, K. L., Rogers, D. D. y Beverly, S. M., (1992). "Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex". Mol. Biochem. Parasitol., **50**: 151-160.
- McMahon-Pratt, D., Rodriguez, D., Rodriguez, J-R., Zhang, Y., Manson, K., Bergman, C., Rivas, L., Rodriguez, J. F., Lohman, K. L., Ruddle, N. H. y Esteban, M. (1993). "Recombinant Vaccinia viruses expressing gp46/M-2 protect against *Leishmania* infection". Infect. Immun., **61**: 3351-3359.
- McNeely, T. B. y Turco, S. J., (1987). "Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan". Biochem. Biophys. Res. Commun., **148**: 653-657.
- McNeely, T. B. y Turco, S. J., (1990). "Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes". J. Immunol., **144**: 2745-2750.
- McNeely, T. B., Rosen, G., Londner, M. V. y Turco, S. J. (1989). "Inhibitory effects on protein kinase C by lipophosphoglycan and glycosyl-phosphatidylinositol antigens of *Leishmania*". Biochem. J., **259**: 601-604.
- Medina-Acosta, E., Karess, R. E. y Russell, D. G. (1993). "Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated". Mol. Biochem. Parasitol., **57**: 31-46.
- Mello, C. B., Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A. y Azambuja, P., (1995). "*Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*". J. Invertebr. Pathol., **65**: 261-268.
- Merrifield, R. B., Merrifield, E. L., Juvvadi, P., Andreu, D. y Boman, H. G., (1994). "Design and synthesis of antimicrobial peptides". Ciba Found Symp., **186**: 5-26.
- Miao, L., Stafford, A., Nir, S., Turco, S. J., Flanagan, T. D. y Epanand, R. M., (1995). "Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*". Biochemistry, **34**: 4676-4683.
- Michels, P. A. M. y Opperdoes, F. R., (1991). "The evolutionary origin of glycosomes". Parasitol. Today, **7**: 105-109.
- Molyneux, D. H. y Killick-Kendrick, R. (1987). "Morfology, ultraestructure and life cycles". En: The Leishmaniases in Biology and Medicine, Vol. I, pp. 121-177. Eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick. Academic Press, Londres.

- Moody, S. F., Handman, E., McConville, M. J. y Bacic, A. (1993). "The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan". J. Biol. Chem., **268**: 18457-18466.
- Moore, K. S., Wehrli, S., Roder, H., Rogers, M., Forresat, J. N., McCrimmon, D. y Zasloff, M., (1993). "Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 1354-1358.
- Mor, A. y Nicolas, P. (1994). "Isolation and structure of novel defensive peptide from frog skin". Eur. J. Biochem., **219**: 145-154.
- Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore, D. y Nicolas, P., (1991). "Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin". Biochemistry, **30**: 8824-8830.
- Moreno, S. N. J., Docampo, R. y Vercesi, A. E., (1992). "Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*". J. Biol. Chem., **267**: 6020-6026.
- Morgan, N. G. y Montague, W., (1984). "Stimulation of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans by melittin". Biosci. Rep., **4**: 665-671.
- Mosser, D. M. y Edelson, P. J. (1987). "The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*". Nature, **327**: 329-331.
- Mosser, D. M., Vlassara, H., Edelson, P. J. y Cerami, A., (1987). "*Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts". J. Exp. Med., **165**: 140-145.
- Mougneau, E., Altare, F., Wakil, A. E., Zeng, S., Coppola, T., Wang, Z. E., Waldmann, R., Locksley, R. M. y Glaichenhaus, N., (1995). "Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen". Science, **268**: 563-566.
- Mousli, M., Bueb, J. L., Bronner, C., Rouot, B. y Landry, Y., (1990). "G protein activation: a receptor independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides". Trends Pharmacol. Sci., **11**: 358-362.
- Mukhopadhyay, R y Madhubala, R., (1993). "Effect of a bis(benzyl)polyamine analogue, and DL-alpha-difluoromethylornithine on parasite suppression and cellular polyamine levels in golden hamster during *Leishmania donovani* infection". Pharmacol. Res., **28**: 359-365.
- Mukkada, A. J. (1985). "Energy coupling in active transport of substrates in *Leishmania*". En: Transport Process, Endo- and Osmoregulation. Eds. G. Gilles y M. Gilles-Baillien. pp. 326-333. Springer, Berlin.
- Murphy, C. J., Foster, B. A., Mannis, M. J., Seldsted, M. E. y Reid, T. W., (1993). "Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts". J. Cell. Physiol., **155**: 408-413.
- Murray, H. W. (1981). "Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by

- normal macrophages". J. Exp. Med., **153**: 1302-1315.
- Murray, H. W., (1982). "Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes". J. Immunol., **129**: 351-357.
- Nabors, G. S., Afonso, L. C., Farrell, J. P. y Scott, P., (1995). "Switch from a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **92**: 3142-3146.
- Nakabayashi, H., Brown, J. H., Morell, J. L., Chen, H. C. y Huang, K. P., (1990). "Phosphorylation of magainin-2 by protein kinase C and inhibition of protein kinase C isozymes by a synthetic analogue of magainin-2-amide". FEBS Lett., **267**: 135-138.
- Nakajima, Y., Qu, X. M. y Natori, S., (1987). "Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly)". J. Biol. Chem., **262**: 1665-1669.
- Nikaido, H. y Vaara, M., (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability". Microbiol. Rev., **49**: 1-32.
- O'Donnell, C. y Liew, E., (1994). "Immunological aspects of nitric oxide". The Biochemist, Oct/Nov, pp 19-22.
- Ohta, M., Ito, H., Masuda, K., Tanaka, S., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., y Kato, N., (1992). "Mechanisms of antibacterial action of tachyplepsins and polyphemusins, a group of antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes". Antimicrob. Ag. Chemother., **36**: 1460-1465.
- Okada, M. y Natori, S., (1984). "Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly larvae)". Biochem. J., **222**: 119-124.
- Okada, M. y Natori, S., (1985). "Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*". Biochem. J., **229**: 453-458.
- Olliaro, P. L. y Bryceson, A. D. M., (1993). "Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis". Parasitol. Today, **9**: 323-328.
- Opperdoes, F. R. (1987). "Compartmentation of carbohydrate metabolism". Annu. Rev. Microbiol., **41**: 127-151.
- Orlandi Jr., P. A. y Turco, S. J., (1987). "Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan". J. Biol. Chem., **262**: 10384-10391.
- Pan, A. A., (1984). "*Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium". Exp. Parasitol., **58**: 72-80.

- Panton, L. J., Tesh, R. B., Nadeau, K. C. y Beverley, S. M., (1991). "A test for genetic exchanging mixed infections of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*". J. Protozool., **38**: 224-228.
- Panyutich, A. V. y Ganz, T., (1991). "Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein". Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **5**: 101-106.
- Panyutich, A. V., Szold, O., Poon, P. H., Tseng, Y. y Ganz, T. (1994). "Identification of defensin binding to C1 complement". FEBS Lett., **356**: 169-173.
- Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A. E., Farber, M., Esteva, M., Flawia, M. M. y Torres, H. N., (1995). "The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*". J. Biol. Chem., **270**: 16576-16579.
- Peek-Miller, K. A., Darveau, R. P. y Fell, H. P., (1993). "Identification of serum components that inhibit the tumoricidal activity of amphiphilic alpha helical peptides". Cancer Chemother. Pharmacol., **32**: 109-115.
- Pérez-Mediavilla, L. A., López-Zabalza, M. J., Calonge, M., Montuenga, L., López-Moratalla, N. y Santiago, E., (1995). "Inducible nitric oxide synthase in human lymphomononuclear cells activated by synthetic peptides derived from extracellular matrix proteins". FEBS Lett., **3**: 121-124.
- Pérez-Payá, E., Houghten, R. A. y Blondelle, S. E., (1995). "The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins". J. Biol. Chem., **270**: 1048-1056.
- Philosoph, H y Zilberstein, D. (1989). "Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*". J. Biol. Chem., **264**: 10420-10424.
- Piers, K. L. y Hancock, R. E. W., (1994). "The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*". Mol. Microbiol., **12**: 951-958.
- Pimenta, P. F. P., da Silva, R. P., Sacks, D. L. y da Silva, P. (1989). "Cell surface nanoanatomy of *Leishmania major* as revealed by fracture flip. A surface mesh work of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stages of promastigotes". Eur. J. Cell Biol., **48**: 180-190.
- Pimenta, P. F. P., Saraiva, E. M. B. y Sacks, D. L., (1991). "The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*". Exp. Parasitol., **72**: 191-204.
- Pimenta, P. F. P., Saraiva, E. M. B., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. N., Turco, S. J. y Sacks, D. L. (1994a). "Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 9155-

9159.

- Pimenta, P. F. P., Da Silva, P. P., Rangarajan, D., Smith, D. F. y Sacks, D. L., (1994b). "Leishmania major: association of the differentially expressed gene B protein and surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping". Exp. Parasitol., **79**: 468-479.
- Powis, S. H., Mockridge, I., Kelly, A., Kerr, L. A., Glynn, R., Gileadi, U., Beck, S. y Trowsdale, J., (1992). "Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **89**: 1463-1467.
- Prina, E., Jouanne, C., de Souza Loa, S., Szabo, A., Guillet, J. G. y Antoine, J. C., (1993). "Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes". J. Immunol., **151**: 2050-2061.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A. V., Feng, G-J., Wei, X-Q., Ferguson, M. A. J., Brimacombe, J. S. y Liew, F. Y., (1996). "Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **93**: 10984-10989.
- Puentes, S. M., Sacks, D. L., da Silva, R. P. y Joiner, K. A., (1988). "Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan". J. Exp. Med., **167**: 887-902.
- Puentes, S. M., Dwyer, D. M., Bates, P. A. y Joiner, K. A. (1989). "Binding release of C3 from *Leishmania donovani* promastigote during incubation in normal serum". J. Immunol., **143**: 3743-3749.
- Puentes, S. M., da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H. y Joiner, K. A. (1990). "Serum resistance metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9". J. Immunol., **145**: 4311-4316.
- Quinlan, R. A., Roobol, A., Pogson, C. I. y Gull, K., (1981). "A correlation between *in vivo* and *in vitro* effects of the microtubule inhibitors colchicine, parbendazole y nocodazole on myxamoebae of *Physarum polycephalum*". J. Gen. Microbiol., **122**: 1-6.
- Ramamoorthy, R., Donelson, J. E., Paetz, K. E., Maybodi, M., Roberts, S. C. y Wilson, M. E. (1992). "Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form". J. Biol. Chem., **267**: 1888-1895.
- Ramos, H., Milhau, J., Cohen, B. E. y Bolard, J., (1990). "Enhanced action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* resulting from heat transformation". Antimicrob. Agents Chemother., **34**: 1584-1589.
- Ramos, H., Saint-Pierre-Chazalet, M., Bolard, J. y Cohen, B. E., (1994). "Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes". Antimicrob.

Agents Chemother., **38**: 1079-1084.

- Rana, F. R., Sultany, C. M. y Blazyk, J., (1990). "Interactions between *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide and the antimicrobial peptide, magainin 2 amide". FEBS Lett., **261**: 464-467.
- Rana, F. R., Macias, E. A., Sultany, C. M., Modzrakowski, M. C. y Blazyk, J., (1991). "Interactions between Magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: Effect of lipopolysaccharide structure". Biochemistry, **30**: 5858-5866.
- Rangarajan, D., Gokool, S., McCrossan, M. V. y Smith, D. F., (1995). "The gene B protein localises to the surface of *Leishmania major* parasites in the absence of metacyclic stage lipophosphoglycan". J. Cell Sci., **108**: 3359-3366.
- Ratcliffe, N. A., (1985). "Invertebrate immunity- A primer for the non specialist". Immunol. Lett., **10**: 253-270.
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W. y Rhodes, C. P., (1985). "Invertebrate immunity basic concepts and recent advances". Internat. Rev. Cytol., **97**: 183-350.
- Reed, S. G. y Scott, P., (1993). "T-cell and cytokine in leishmaniasis". Curr. Op. Immunol., **5**: 524-531.
- Reed, W. A., White, K. L., Enrigh, F. M., Holck, J., Jaynes, J. M., y Jeffers, G. W., (1992). "Enhanced in vitro growth of murine fibroblasts cells and preimplantation embryos cultured in medium supplemented with an amphipatic peptide". Mol. Reprod. Dev., **31**: 106-113.
- Reiner, N. E. (1987a). "Parasite-accessory cell interactions in immune leishmaniasis I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin I response by *Leishmania donovani*". J. Immunol., **138**: 1919-1925.
- Reiner, N. E., (1987b). "Parasite-accessory cell interactions in immune leishmaniasis II. *Leishmania donovani* suppressed macrophage expression of class I and II major histocompatibility complex gene products". J. Immunol., **138**: 1926-1932.
- Reiner, N. E., Ng, W., Wilson, C. B., McMaster, W. R. y Burchett, S. K., (1990). "Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1". J. Clin. Invest., **85**: 1914-1924.
- Reiner, S. L., Zheng, S., Wang, Z-E., Stowring, L. y Locksley, R. M. (1994). "*Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection". J. Exp. Med., **179**: 447-456.
- Remaley, A. T., Glew, R. H., Kuhns, D. B., Basford, R. E., Waggoner, A. S., Ernst, L. A. y Pope,

- M. (1985). "*Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production". Exp. Parasitol., **60**: 331-341.
- Resnick, N. M., Maloy, W. L., Guy, H. R. y Zasloff, M., (1991). "A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alfa-helical secondary structure". Cell, **66**: 541-554.
- Ribeiro, J. M. C., Vachereau, A., Modi, G. B. y Tesh, R. B., (1989). "A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*". Science, **243**: 212-214.
- Rivas, L. y Chang, K. (1983). "pH inside the parasitophorous vacuole of macrophages infect with *Leishmania mexicana mexicana*". Biol. Bull., **165**: 536-537.
- Rivas, L., Kahl, L., Manson, K. y McMahon-Pratt, D., (1991). "Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*". Mol. Biochem. Parasitol., **47**: 235-244.
- Rodríguez, M. C., Zamudio, F., Torres, J. A., González-Cerón, L., Possani, L. D. y Rodríguez, M. I., (1995). "Effect of cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*". Exp. Parasitol., **80**: 596-604.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M. y Gennaro, R. (1988). "Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils". J. Biol. Chem., **263**: 9573-9575.
- Russell, D. G., (1987a). "The macrophage-attachment glycoprotein gp63 in the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes". Eur. J. Biochem., **164**: 213-221.
- Russell, D. G., (1987b). "Immunity to leishmaniasis. What properties delineate a protective antigen". Ann. Ins. Pasteur, **138**: 774-781.
- Russell, D. G. y Wilhelm, H. (1986). "The involvement of gp63, the major surface glycoprotein, in the attachment of *Leishmania* promastigote to the macrophages". J. Immunol., **136**: 2613-2620.
- Russell, D. G., Xu, S. y Chakraborty, P. (1992). "Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages". J. Cell Sci., **103**: 1193-1210.
- Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J. y Beverley, S. M., (1993). "Isolation of virulence genes directing surface glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*". Proc. Natl. Acad. Sci., **90**: 8609-8613.
- Saberwal, G. y Nagaraj, R., (1994). "Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane perturbing abilities". Biochim. Biophys. Acta, **1197**: 109-131.
- Sacks, D. L., (1989). "Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes". Exp. Parasitol., **69**: 100-103.

- Sacks, D. L., Hieny, S. y Sher, A., (1985). "Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes". J. Immunol., **135**: 564-569.
- Sacks, D. L., Brodin, T. N. y Turco, S. J., (1990). "Developmental modification of phosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis". Mol. Biochem. Parasitol., **40**: 225-234.
- Sacks, D. L., Pimenta, P. F., McConville, M. J., Schneider, P. y Turco, S., (1995). "Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan". J. Exp. Med., **181**: 685-697.
- Sáenz, R. E., de Rodríguez, C. G., Johnson, C. M. y Berman, J. D., (1991). "Efficacy and toxicity of pentostam against Panamanian mucosal leishmaniasis". Am. J. Trop. Med. Hyg., **44**: 394-398.
- Samakovlis, C., Kimbrell, D. A., Kylsten, P., Engström, A. y Hultmark, D., (1990). "The immune response in *Drosophila*: Pattern of cecropin expression and biological activity". EMBO J., **9**: 2969-2976.
- Sánchez, A., Castanys, S. y Gamarro, F., (1994). "Increase of P-type ATPase activity in *Leishmania tropica* resistant to methotrexate". Biochem. Biophys. Res. Commun., **199**: 855-861.
- Sansom, M. S., Kerr, I. D. y Mellor, I. R., (1991). "Ion channels formed by amphipathic helical peptides. A molecular modelling study". Eur. Biophys. J., **20**: 229-240.
- Sawyer, J. G., Martin, N. L. y Hancock, R. E. W., (1988). "The interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*". Infect. Immun., **56**: 693-698.
- Scherer, G. F. E., (1992). "Stimulation of growth and phospholipase A₂ by peptides mastoparan and melittin and by auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid". Plant Growth Regul., **11**: 153-157.
- Schindler, P. R. G. y Teuber, M., (1975). "Action of polymixin B on bacterial membranes: morphological changes in the cytoplasm and in the outer membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B". Antimicro. Agents Chemoth., **8**: 95-104.
- Schlein, Y., (1993). "*Leishmania* and the sandflies: Interactions in the life cycle and transmission". Parasitol. Today, **9**: 255-258.
- Schlein, Y., Schnur, L. F. y Jacobson, R. L., (1990). "Released glycoconjugate of endogenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **84**: 353-355.

- Schlein, Y., Jacobson, R. L. y Shlomai, J., (1991). "Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector". Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **245**: 121-126.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L. y Messer, G., (1993). "*Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 9944-9948.
- Schneider, P., Rosat, J-P., Bouvier, J., Louis, J. y Bordier, C., (1992). "*Leishmania major*: Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages". Exp. Parasitol., **75**: 196-206.
- Schonwetter, B. S., Stolzenberg, E. D. y Zasloff, M. A., (1995). "Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation". Science, **267**: 1646-1648.
- Schuster, F. L. y Jacob, L. S., (1992). "Effects of magainins on ameba and cyst stages of *Acanthamoeba polyphaga*". Antimicrob. Agents Chemother., **36**: 1263-1271.
- Seebeck, T., Hemphill, A. y Lawson, D., (1990). "The cytoskeleton of trypanosomes". Parasitol. Today, **6**: 49-52.
- Seethaler, G., Chaminade, M., Vlasak, R., Ericsson, M., Griffiths, G., Toffoletto, O., Rossier, J., Stunnenberg, H. G. y Kreil, G., (1991). "Targeting of frog prodermorphin to the regulated secretory pathways by fusion to proenkephalin". J. Cell Biol., **114**: 1125-1133.
- Selsted, M. E. y Ouellette, A. J., (1995). "Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells". Trends Cell Biol., **5**: 114-119.
- Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J. y Lehrer, R. L., (1983). "Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages". J. Biol. Chem., **258**: 14485-14489.
- Selsted, M. E., Szklarek, D., Ganz, T. y Lehrer, R. I., (1985). "Activity rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*". Infec. Immun., **49**: 202-206.
- Shai, Y., (1995). "Molecular recognition between membran spanning polypeptides". Trends Biochem. Sci., **20**: 460-464.
- Shankar, A., Mitchen, T. K., Hall, L. R., Turco, S. J. y Titus, R. G., (1993). "Reversion to virulence in *Leishmania major* correlates with expression of surface lipophosphoglycan". Mol. Biochem. Parasitol., **61**: 207-216.
- Sharom, F. J., DiDiodato, G., Yu, X. y Ashbourne, K. J. D., (1995). "Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter with peptides and ionophores". J. Biol. Chem., **270**: 10334-10341.
- Sher, A. y Coffman, R. L., (1992). "Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines". Annu. Rev. Immunol., **10**: 385-409.

- Shiff, C. J., (1994). "Molluscan defence mechanisms: Immunity or population biology?". Parasitol. Today, **10**: 188-190.
- Shimoda, M., Ohki, K., Shimamoto, Y. y Kohashi, O., (1995). "Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*". Infect. Immun., **63**: 2886-2891.
- Shlomai, J. (1994). "The assembly of kinetoplast DNA". Parasitol. Today, **10**: 341-346.
- Sidén, I. y Boman, H. G., (1983). "*Escherichia coli* mutants with an altered sensitivity to cecropin D". J. Bacteriol., **154**: 170-176.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. y Bossa, F., (1993). "Novel antimicrobial peptides from skin secretions of the European frog *Rana esculenta*". FEBS Lett., **324**: 159-161.
- Sipos, D., Chandrasekhar, K., Arvidsson, K., Engström, A. y Ehrenberg, A., (1991). "Two dimensional proton-NMR studies on a hybrid peptide between cecropin A and melittin. Resonance assignments and secondary structure". Eur. J. Biochem., **199**: 285-291.
- Steiner, H., (1982). "Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*". FEBS Lett., **137**: 283-287.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H. y Boman, H. G., (1981). "Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity". Nature, **292**: 246-248.
- Steiner, H., Andreu, D. y Merrifield, R. B., (1988). "Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects". Biochim. Biophys. Acta, **939**: 260-266.
- Stenger, S., Thüring, H., Rölinghoff, M. y Bogdan, C., (1994). "Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*". J. Exp. Med., **180**: 783-793.
- Stuart, K., (1995), "RNA editing: an overview, status report, and personal perspective". En: Molecular Approaches to Parasitology, Vol. 12, pp. 243-254. Eds. J. C. Boothroy y R. Komuniecki. Wiley-Liss, Nueva York (EUA).
- Subbarao, N. K. y MacDonald, R. C., (1994). "Lipid unsaturation influences melittin-induced leakage of vesicles". Biochim. Biophys. Acta, **1189**: 101-107.
- Sun, S. C. y Faye, I., (1992). "Affinity purification and characterization of CIF, an insect immunoresponsive factor with NF- κ B-like properties". Comp. Biochem. Physiol., **103**: 225-233.
- Sun, S., Lindström, I., Boman, H. G., Faye, I. y Schmidt, O., (1990). "Hemolin: an insect immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily". Science, **250**: 1792-1732.
- Sun, S. C., Lindström, I., Lee, J-Y. y Faye, I., (1991a). "Structure and expression of the attacin

- genes in *Hyalophora cecropia*". Eur. J. Biochem., **196**: 247-254.
- Sun, S. C., Asling, B. y Faye I., (1991b). "Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gen in a giant silk moth, *Hyalophora cecropia*". J. Biol. Chem., **266**: 6644-6649.
- Sundar, S., Rosenkaimer, F., Lesser, M. L. y Murray, H. W. (1995). "Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis". J. Infect. Dis., **171**: 992-996.
- Talamàs-Rohana, P., Wright, S. D., Lennartz, M. R. y Russell, D. G., (1990). "Lipophosphoglycan of *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150⁹⁵ and LFA family of leukocyte integrins". J. Immunol., **144**: 4817-4824.
- Ter Kuile, B. H. y Opperdoes, F. R., (1992). "A chemostat study on proline uptake and metabolism of *Leishmania donovani*". J. Protozool., **39**: 555-558.
- Ter Kuile, B. H. y Opperdoes, F. R., (1993). "Uptake and turnover of glucose in *Leishmania donovani*". Mol. Biochem. Parasitol., **60**: 313-321.
- Terwilliger, T. C., Weissman, L. y Eisenberg, D., (1982). "The structure of melittin in the crystals form I and its implications for mellitin's lytic and surface activities". Biophys. J., **37**: 353-361.
- Thakur, C. P., (1986). "Harmful effect of hogh stibogluconate treatment of kala-azar in India". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **80**: 672-673.
- Thakur, C. P., Kumar, M. y Pandey, A. K., (1991). "Evaluation of efficacy of longer durations of therapy of fresh cases of kala-azar with sodium stibogluconate". Indian J. Med. Res., **93**: 103-110.
- Theodos, C. M., Ribeiro, J. M. y Titus, R. G., (1991). "Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice". Infect. Immun., **59**: 1592-1598.
- Thomas, J. R., McConville, M. J., Thomas-Oates, J. E., Homans, S. W., Ferguson, M. A. J., Gorin, P. A. J., Greis, K. D. y Turco, S. J., (1992). "Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*". J. Biol. Chem., **267**: 6829-6833.
- Tisch, D., Sharoni, Y., Danilenko, M. y Aviram, I., (1995). "The assembly of neutrophil NADPH oxidase: effects of mastoparan and its synthetic analogues". Biochem. J., **310**: 715-719.
- Titus, R. G., Sherry, B. y Cerami, A., (1989). "Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis". J. Exp. Med., **170**: 2097-2104.
- Tolson, D. L., Turco, S. J., Beecroft, R. P. y Pearson, T. W., (1989). "Immunochemical and cell surface arrangement of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies". Mol. Biochem. Parasitol., **35**: 109-118.

- Tosteson, M. T. y Tostesin, D. C., (1981). "The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers". Biophys. J., **36**: 109-116.
- Trinchieri, G., (1995). "Interleukine-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity". Annu. Rev. Immunol., **13**: 251-276.
- Tryselius, Y., Samakovlis, C., Kimbrell, D. A. y Hultmark, D., (1992). "*Cec C*, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila pupae*". Eur. J. Biochem., **204**: 395-399.
- Turco, S. J., (1990). "The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule". Exp. Parasitol., **79**: 241-245.
- Turco, S. J. y Sacks, D. L., (1991). "Expression of stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes". Mol. Biochem. Parasitol., **45**: 91-100.
- Turco, S. J. y Descoteaux, A., (1992). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites". Annu. Rev. Microbiol., **46**: 65-94.
- Turco, S. J., Wilkerson, M. A. y Clawson, D. R., (1984). "Expression of an unusual acidic glycoconjugate in *Leishmania donovani*". J. Biol. Chem., **259**: 3883-3889.
- Turco, S. J., Hull, S. R., Orlandi Jr., P. A., Sheperd, S. D., Homans, S. W., Dwek, R. A. y Radermacher, T. W., (1987). "Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan". Biochemistry, **26**: 6233-6238.
- Turco, S. J., Orlandi Jr., P. A., Homans, S. W., Ferguson, M. A. J., Dwek, R. A. y Rademacher, T. W., (1989). "Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan". J. Biol. Chem., **264**: 6711-6715.
- Tzinia, A. K. y Soteriadou, K. P., (1991). "Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*". Mol. Biochem. Parasitol., **47**: 83-90.
- Ubach i Cartategui, J., (1996). "Síntesi i estudis estructura-activitat de pèptids antibacterians derivats de cecropina-A i melitina". Tesis Doctoral: Departament de Química Orgànica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona.
- Urrutia, R., Cruciani, R. A., Barker, J. L. y Kachar, B., (1989). "Self aggregation of magainin 2 into fibers". FEBS Lett., **247**: 17-21.
- Vaara, M., (1992). "Agents that increase the permeability of the outer membrane". Microbiol. Rev., **56**: 395-411.
- Vaara, M. y Vaara, T., (1994). "Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane". Antimicrob. Agents Chemother., **38**: 2498-2501.
- Valore, E. V., Martin, E., Harwigg, S. S. y Ganz, T. (1996). "Intramolecular inhibition of human

- defensin HNP-1 by its propiece". J.Clin. Invest., **97**: 1624-1629.
- Vanden-Bossche, H., (1985). "Biochemical targets for antifungal azole derivates: hypothesis on the mode of action". Curr. Top. Med. Mycol., **1**: 313-351.
- Van der Blik, A. M. y Borst, P., (1989). "Multidrug resistance". Adv. Cancer Res., **52**: 165-203.
- Velasco, M., Díaz-Guerra, M. J. M., Díaz-Achirica, P., Andreu, D., Rivas, L. y Boscá, L., (1997). J. Immunol., en prensa.
- Vercesi, A. E. y Docampo, R., (1992). "Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effect of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 en mitochondrial membrane potential *in situ*". Biochem. J., **284**: 463-467.
- Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffman, M. E., Gadelha, F. R. y Docampo, R., (1991). "Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* *in situ*". J. Biol. Chem., **266**: 14431-14434.
- Vieira, L., Lavan, A., Dagger, F. y Cabantchik, Z. I., (1994). "The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes". J. Biol. Chem., **269**: 16254-16259.
- Vioukov, V. N., (1987). "Control of transmission". En: The Leishmaniases in Biology and Medicine. Vol., II. pp. 909-929. Eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick. Academic Press, Londres.
- Voorheis, H. P., Gale, J. S., Owen, M. J. y Edwards, W., (1979). "The isolation and partial characterization of the plasma membrane from *Trypanosoma brucei*". Biochem. J., **180**: 11-24.
- Vouldoukis, I., Shai, Y., Nicolas, P. y Mor, A., (1996). "Broad spectrum antibiotic activity of skin-PYY". FEBS Lett., **380**: 237-240.
- Wade, D., Boman, A., Wählin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G. y Merrifield, R. B., (1990). "All D-amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**: 4761-4765.
- Walsh, C., Bradley, M. y Nadeau, K., (1991). "Molecular studies on trypanotione reductase, a target for antiparasitic drugs". TIBS, **16**: 305-309.
- Wang, Z-E., Reiner, S. L., Zheng, S., Dalton, D. K. y Locksley, R. M., (1994). "CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon γ -deficient mice infected with *Leishmania major*". J. Exp. Med., **179**: 1367-1371.
- Wassef, M. K., Fioretti, T. B. y Dwyer, D. M., (1985). "Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes". Lipids, **20**: 108-115.

- Webb, J. R., Button, L. L. y McMaster, W. R., (1991). "Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani*". Mol. Biochem. Parasitol., **48**: 173-184.
- Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Muller, W. Moncada, S. y Liew, F. Y., (1995). "Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase". Nature, **375**: 408-411.
- Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W. y Zasloff, M., (1989a). "Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**: 6597-6601.
- Westerhoff, H. V., Hendler, R. W., Zasloff, M. y Juretic, D., (1989b). "Interactions between a new class of eukaryotic antimicrobial agents and isolated rat liver mitochondria". Biochim. Biophys. Acta., **975**: 361-369.
- Westerhoff, H. V., Zasloff, M., Rosner, J. L., Hendler, R. W., De Waal, A., Vaz Gomes, A., Jongsma, P. M., Riethorst, A. y Juretic, D., (1995). "Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes". Eur. J. Biochem., **228**: 257-264.
- White, S. H., Wimley, W. C. y Selsted, M. E., (1995). "Structure, function, and membrane integration of defensins". Curr. Op. Struct. Biol., **5**: 521-527.
- Wimley, W. C., Selsted, M. E. y White, S. H., (1994). "Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores". Prot. Sci., **3**: 1362-1373.
- Wu, W-K. y Tesh, R. B., (1990). "Selection of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) lines susceptible and refractory to *Leishmania major* infection". Am. J. Trop. Med. Hyg., **42**: 320-328.
- Wyler, D. J., Sypek, J. P. y McDonald, J. A., (1985). "*In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment". Infect. Immun., **49**: 305-311.
- Xanthopoulos, K. G., Lee, J-Y., Gan, R., Kockum, K., Faye, I. y Boman, H. G., (1988). "The structure the gene for the cecropin B an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia*". Eur. J. Biochem., **172**: 371-376.
- Xie, Q. W., Whisnant, R. y Nathan, C., (1993). "Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide". J. Exp. Med., **177**: 1779-1784.
- Xu, D. y Liew, F. Y., (1995). "Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania major*". Immunology, **84**: 173-176.
- Xu, D., McSorley, S. J., Chatfield, S. N., Dougan, G. y Liew, F. Y., (1995). "Protection against

- Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA⁻ AroD⁻). Immunology, **85**: 1-7.
- Yang, D. M., Fairweather, N., Button, L. L., McMaster, W. R., Kahl, L. P. y Liew, F. Y., (1990). "Oral *Salmonella typhimurium* (AroA⁻) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T-helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis". J. Immunol. **145**: 2281-2285.
- Yang, D. M., Rogers, M. V. y Liew, F. Y., (1991). "Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*". Immunology, **72**: 3-9.
- Zarley, J. H., Britigan, B. E. y Wilson, M. E., (1991). "Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat-shock". J. Clin. Invest. **88**: 1511-1521.
- Zasloff, M., (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**: 5449-5453.
- Zasloff, M., (1994). "Antibacterial molecules from frogs, sharks and man". En: Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect Host Defense. pp. 31-41. Eds., Jules A. Hoffman, Charles A. Janeway, Jr., y Shunji Natori. R.G. Landes Company (Austin).
- Zilberstein, D., (1993). "Transport of nutrients and ions across membranes of trypanosomatid parasites". Adv. Parasitol. **32**: 261-291.
- Zilberstein, D. y Dwyer, D. M., (1988). "Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*". Biochem. J. **256**: 13-21.
- Zilberstein, D. y Gepstein, A., (1993). "Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH". Mol. Biochem. Parasitol. **61**: 197-205.
- Zilberstein, D. y Shapira, M., (1994). "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites". Annu. Rev. Microbiol. **48**: 449-470.
- Zilberstein, D., Dwyer, D. M., Matthaiei, S. y Horuk, R., (1986). "Identification and biochemical characterization of the plasma membrane glucose transporter of *Leishmania donovani*". J. Biol. Chem. **261**: 15053-15057.
- Zilberstein, D., Sheppard, H. W. y Dwyer, D. M., (1987). "The plasma membrane H⁺-ATPase of *Leishmania donovani* promastigotes". En: Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoan Infections. Eds. K. P. Chang y D. Snary. Vol. H11, pp. 183-188. Springer, Berlin. (NATO ASI Series).
- Zilberstein, D., Philosoph, H. y Gepstein, A., (1989). "Maintenance of cytoplasmic pH and proton

motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*". Mol. Biochem. Parasitol., **45**: 175-178.