

Trabajo de Fin de Grado

Utilidad de los fármacos basados en péptidos para el control de la leishmaniasis

Alumna: Elva del Cristo Vega García

Tutora: Emma Carmelo Pascual

Grado en Farmacia

Curso 2021/2022

**Departamento: Obstetricia y Ginecología,
Pediatría, Medicina Preventiva y Salud
Pública, Toxicología, Medicina Legal y
Forense y Parasitología**

| | ÍNDICE | pág. |
|---|---------------|-------------|
| Resumen | | 3 |
| Abstract | | 4 |
| Abreviaturas | | 5 |
| 1. Introducción | | 6 |
| 1.1. <i>Agente causal de la leishmaniasis y distribución geográfica</i> | | 6 |
| 1.2. <i>Ciclo biológico</i> | | 6 |
| 1.3. <i>Presentación clínica</i> | | 8 |
| 1.4. <i>Tratamiento</i> | | 9 |
| 2. Objetivos | | 11 |
| 3. Metodología | | 11 |
| 4. Resultados | | 11 |
| 4.1. <i>Propiedades de los péptidos antimicrobianos</i> | | 11 |
| 4.1.1. <i>Muerte directa</i> | | 13 |
| 4.1.2. <i>Inmunomodulación</i> | | 14 |
| 4.2. <i>Limitaciones de los AMPs</i> | | 15 |
| 4.3. <i>¿Son útiles los péptidos antimicrobianos en el tratamiento frente a la leishmaniasis?</i> | | 17 |
| 4.4. <i>¿Es posible el desarrollo de vacunas basadas en AMPs para el control de la leishmaniasis?</i> | | 19 |
| 5. Discusión | | 21 |
| 6. Conclusiones | | 23 |
| 7. Bibliografía | | 23 |

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta a una gran proporción de la población mundial, concentrándose en países desfavorecidos. Hoy en día, debido al incremento de la aparición de resistencias a los tratamientos convencionales frente a la leishmaniasis, ha sido necesaria la investigación de nuevos fármacos. Los péptidos antimicrobianos son moléculas secretadas por diferentes organismos, tales como anfibios, mamíferos, microorganismos, plantas e incluso los humanos, que han captado atención por la industria farmacéutica. Estos péptidos participan en la respuesta inmunitaria innata frente a organismos patógenos, entre los que se incluyen parásitos como *Leishmania*. Se ha observado que presentan un doble mecanismo, actividad antimicrobiana e inmunomoduladora, que junto a otras características, pueden solucionar algunos inconvenientes del tratamiento convencional, y además, se investiga la posibilidad de su empleo para el desarrollo de vacunas. En esta revisión, se recoge información sobre las propiedades que tienen estas moléculas y lo que las diferencia de los tratamientos actuales, los problemas para su uso en la práctica clínica y estudios que evidencian su actividad contra *Leishmania*.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, *Leishmania*, resistencia, catiónico, anfipático, inmunomodulador.

Abstract

Leishmaniasis is a disease that affects a large proportion of the world's population, concentrated in disadvantaged countries. Nowadays, due to the increase of resistance to conventional treatments for leishmaniasis, research into new drugs has become necessary. Antimicrobial peptides are molecules secreted by different organisms, such as amphibians, mammals, microorganisms, plants and even humans that have attracted the attention of the pharmaceutical industry. These peptides participate in innate immune response against pathogenic organisms, including parasites as *Leishmania*. It has been observed that they have a dual mechanism, antimicrobial and immunomodulatory activity which, with other characteristics, can solve some of the drawbacks of conventional treatment and, in addition, the possibility of their use in the development of vaccines is being investigated. In this review, information is collected about the properties of these molecules and their differences from current treatments, the problems for their use in clinical practice and studies that demonstrate their activity against *Leishmania*.

Key words: antimicrobial peptides, *Leishmania*, resistance, cationic, amphipathic, immunomodulator.

Abreviaturas

- **OPS:** Organización Panamericana de la Salud
- **CDC:** Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
- **AMPs:** péptidos antimicrobianos
- **CMH-II:** complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
- **PPG:** proteofosfoglicano
- **IC₅₀:** concentración inhibitoria del 50% de la población microbiana
- **Th1:** T Helper 1
- **Th2:** T Helper 2
- **hBD-2:** β -defensina 2 humana
- **INF- γ :** interferón gamma
- **IL-10:** interleucina 10
- **IL-17A:** interleucina 17A
- **Th17:** T Helper 17
- **AvBD5:** β -defensina aviar 5

1. Introducción

1.1. Agente causal de la leishmaniasis y distribución geográfica

La enfermedad denominada leishmaniasis es una de las enfermedades desatendidas, que se dan en poblaciones vulnerables desde el punto de vista socioeconómico y que no tienen posibilidad de acceder fácilmente a recursos sanitarios esenciales (1).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), existen más de 12 millones de personas infectadas de leishmaniasis, se producen entre 0,9-1,6 millones de casos nuevos al año con 20.000-30.000 muertes y 350 millones de personas están en riesgo de infectarse (1), principalmente en los países tropicales y subtropicales.

Los agentes causales son los protozoos del género *Leishmania*, y de entre todas las especies, 22 son patógenas para el humano (1). Además, estos parásitos también pueden infectar a animales, como perros o gatos.

Esta enfermedad es transmitida por vectores de los géneros *Lutzomya* en el Nuevo Mundo (países de América) y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa).

1.2. Ciclo biológico

Durante la picadura, los vectores introducen, por medio de la saliva, la forma infectiva del parásito, los promastigotes metacíclicos. Esta forma del parásito es fagocitada por las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, células de Langerhans y monocitos, así como neutrófilos y fibroblastos) (Figura 1) (2).

En el interior de la célula, los promastigotes se transforman en la forma replicativa en el mamífero, que son los amastigotes. Los amastigotes se multiplican y finalmente destruyen la célula para infectar otras. El ciclo se cierra cuando un flebótomo se alimenta de nuevo de la sangre del humano e ingiere células infectadas (Figura 1) (2).

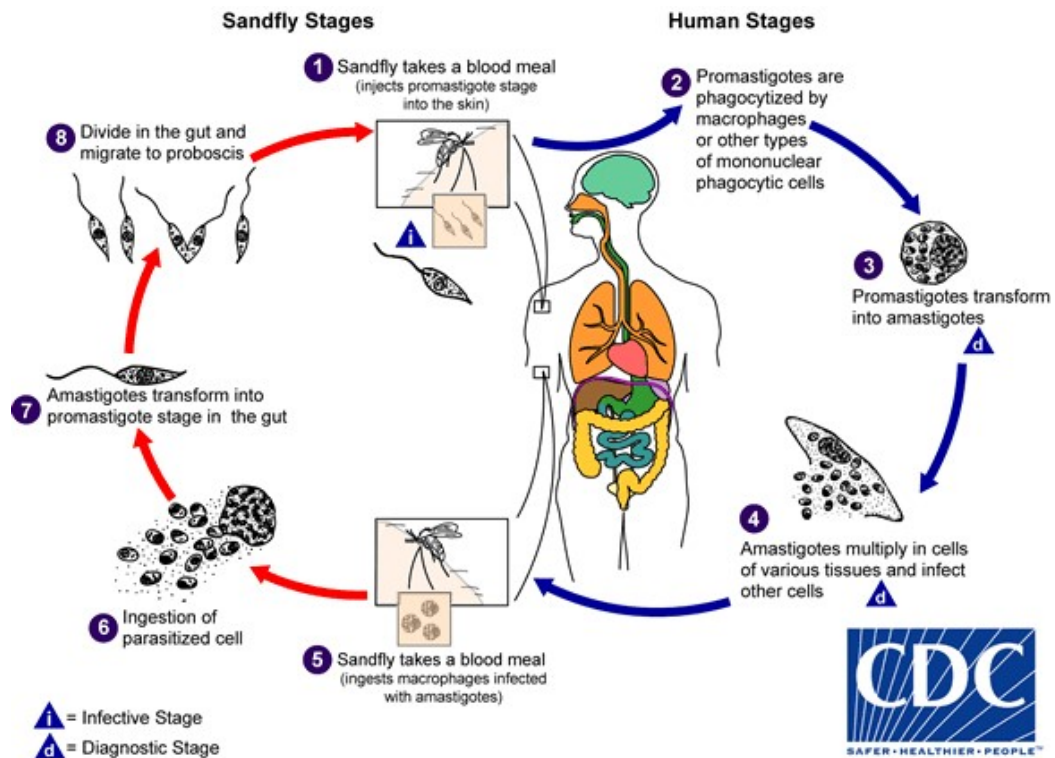


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Recogido de (2).

Por tanto, es un parásito pleomórfico, es decir, a lo largo de todo el ciclo adopta distintas formas. En este caso, se trata de promastigotes y amastigotes, los cuales tienen ciertas diferencias morfológicas, bioquímicas y de respuesta a los tratamientos antiparasitarios (sensibilidad o resistencia) (3).

Los amastigotes (Figura 2a) son formas esféricas a ovoides de entre 1 y 5 μm de largo por 1 a 2 μm de ancho, con un núcleo central grande, un kinetoplasto en forma de varilla y aflagelados (2).

Por otro lado, los promastigotes (Figura 2b) son las formas que se replican en el intestino medio del vector, y que son infectivos para el humano. Son formas alargadas, delgadas y miden entre 10 y 12 μm de longitud, tienen un núcleo central, así como un kinetoplasto y flagelo ubicados en el extremo anterior (2).

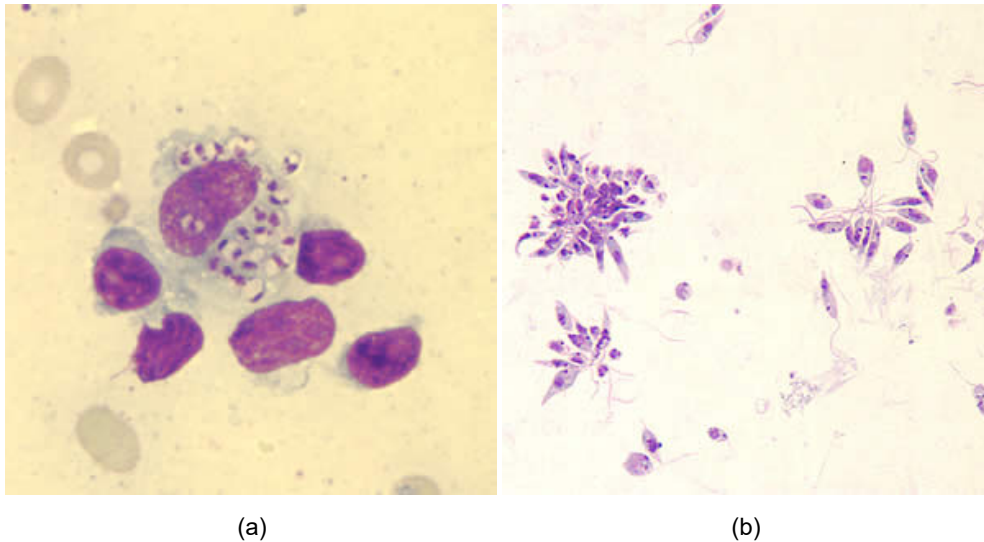


Figura 2. (a) Amastigotes de *Leishmania spp* en un raspado de tejido teñido con Giemsa. (b) Promastigotes de *Leishmania spp* en cultivo. Recogido de (2).

1.3. Presentación clínica

Las principales presentaciones de la leishmaniasis en humanos son: cutánea, mucocutánea y visceral (Tabla 1) (4). Entre los factores que condicionan qué forma de la enfermedad se manifiesta se encuentran la especie del parásito y del vector, así como la genética y el estado del sistema inmunitario del hospedador (3).

| Presentación | Inicio | Manifestaciones clínicas | Agente causal |
|--|--|---|--|
| Leishmaniasis cutánea (localizada o difusa) | Varias semanas o meses después de la exposición al vector. | A nivel cutáneo, se forman pápulas, evolucionan a nódulos y finalmente se desarrollan lesiones ulcerosas, generalmente indoloras. | Viejo Mundo: - <i>L. tropica</i> - <i>L. aethiopica</i> - <i>L. major</i> - <i>L. infantum</i> - <i>L. donovani</i> Nuevo Mundo: - Subgénero <i>Viannia</i> |
| Leishmaniasis mucocutánea | Se produce como consecuencia de la diseminación de los parásitos a partir de una lesión cutánea. | La infección inicial se manifiesta con síntomas nasales persistentes e inusuales (congestión o sangrado) y progresa a una destrucción ulcerosa de la mucosa naso-orofaríngea. | Normalmente, ocurre en el Nuevo Mundo por especies del subgénero <i>Viannia</i> (especialmente <i>L. braziliensis</i>). |

| | | | |
|---|--|--|---|
| Leishmaniasis visceral o kala-azar | Varias semanas o meses, e incluso años, de la picadura del vector. | Afecta principalmente al bazo, médula ósea e hígado. Se manifiesta como una enfermedad sistémica con fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergammaglobulinemia. | Principalmente: - <i>L. infantum</i> - <i>L. donovani</i> |
|---|--|--|---|

Tabla 1. Presentaciones clínicas de la leishmaniasis. Adaptado de (4).

1.4. Tratamiento

La terapia farmacológica para la leishmaniasis se basa en derivados antimoniales pentavalentes (Glucantime®, Pentostam®), anfotericina B, paromomicina, miltefosina, pentamidina o combinaciones de los mismos. Estos fármacos actúan mediante diferentes mecanismos, como puede ser la disrupción de la membrana, daño en el ADN del parásito, disfunción mitocondrial, deficiencia en la síntesis de proteínas o inhibición enzimática (Figura 3) (5).

También presentan una serie de inconvenientes que han hecho que se investiguen otros agentes que actúen contra nuevas dianas terapéuticas y puedan ser útiles en el tratamiento de la leishmaniasis. Entre dichas limitaciones se encuentran la aparición de resistencia, el alto coste, la dificultad en la administración (la mayoría se administran por vía parenteral) y la duración del tratamiento (Figura 3) (5).

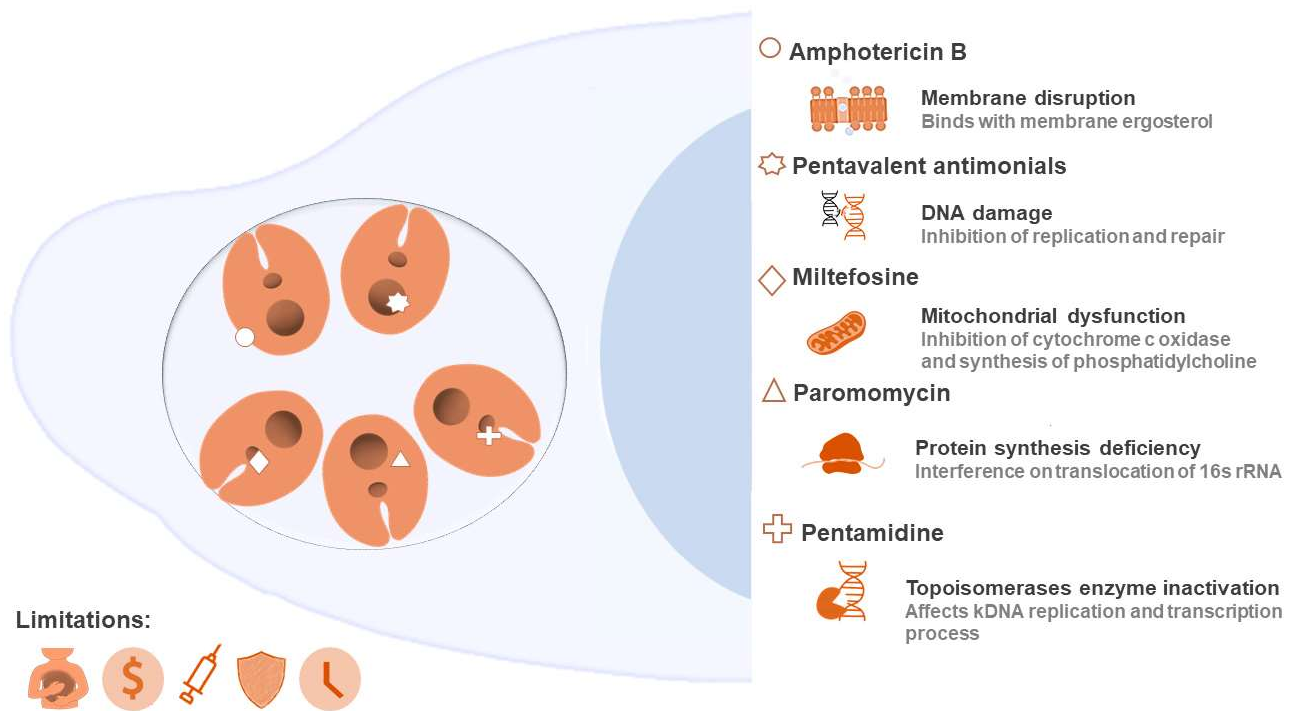


Figura 3. Dianas celulares y limitaciones de la quimioterapia convencional contra la leishmaniasis. Recogido de (5).

En los últimos años, se está investigando la utilidad de los péptidos antimicrobianos para el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas. Estos péptidos han ganado interés como consecuencia del surgimiento de resistencias por parte de los agentes infecciosos. Por ejemplo, se ha demostrado que el empleo de algunos péptidos antimicrobianos reduce la probabilidad de la inducción de resistencia bacteriana, debido a un doble mecanismo (antimicrobiano e inmunomodulador), en comparación con los fármacos que únicamente poseen actividad antimicrobiana (6). Por esta razón, se están realizando diversos estudios para dilucidar la actividad de estos fármacos y conocer qué beneficios podrían conllevar su aplicación.

2. Objetivos

- Conocer las características de los péptidos antimicrobianos y su potencial para el empleo como agentes farmacológicos.
- Analizar la utilidad de los péptidos antimicrobianos para el control de la leishmaniasis, para el tratamiento farmacológico o como posible componente para el desarrollo de vacunas frente a *Leishmania*.

3. Metodología

El desarrollo del trabajo se ha basado en la búsqueda de información y la revisión bibliográfica acerca de los péptidos contra la leishmaniasis en bases de datos, como PubMed o el PuntoQ que proporciona la Universidad de La Laguna.

Para ello, se realizó la búsqueda con palabras clave como *antimicrobial peptides*, *Leishmania*, *leishmaniasis*, *leishmanicidal activity*, *in vitro*, *in vivo*, *vaccines* e *immunomodulator* en PubMed y PuntoQ, así como en las páginas oficiales del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y la Organización Panamericana de la Salud, entre el 25 de febrero y el 26 de mayo de 2022.

4. Resultados

4.1. Propiedades de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son proteínas de pequeño tamaño (5-100 aminoácidos) que participan en la respuesta inmunitaria innata y son secretados por varios organismos, tales como anfibios, artrópodos, aves, plantas, microorganismos como las bacterias e incluso mamíferos. En los mamíferos, las células que producen dichas moléculas son las células inmunitarias (por ejemplo: fagocitos) y las células epiteliales del tejido gastrointestinal (7).

Los AMPs presentan distintas propiedades químicas: catiónicos y anfipáticos. Además, se pueden clasificar según la estructura secundaria: α -hélice (la más común), lámina β y péptidos extendidos o flexibles (8).

En general, los AMPs son activos frente a una gran diversidad de organismos, como bacterias, hongos, virus, y otros, incluyendo los parásitos. También pueden ser utilizados como agentes antitumorales (8). En primer lugar, se utilizaron para combatir la multirresistencia a antibióticos, ya que no se ven afectados por los mecanismos convencionales de resistencia (7). En este sentido, se han usado en combinación con antibióticos, consiguiendo la disminución de la dosis y efectos adversos, además de lograr efectos sinérgicos o aditivos, que reducen la aparición de resistencia (3). Por ejemplo, en un estudio realizado por Wu *et al.*, se demostró la actividad sinérgica y aditiva entre el péptido DP7 (derivado de bactenecina-A2) y diferentes antibióticos (vancomicina, azitromicina y amoxicilina) contra bacterias multirresistentes, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *A. baumannii* (9).

Asimismo, se ha extendido esta investigación a su posible actividad antiparasitaria, debido a que los métodos de control de vectores presentan muchas dificultades y existen problemas con el tratamiento farmacológico, como la aparición de toxicidad, la necesidad de administrar altas dosis para que el tratamiento sea efectivo y la inducción de resistencia (8). En la Tabla 2, se exponen algunos ejemplos de parásitos y los AMPs que han mostrado actividad contra los mismos (7).

| Parásito | Enfermedad | AMPs activos |
|-------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | Enfermedad de Chagas | Melitina, defensinas, temporinas |
| <i>Plasmodium spp.</i> | Malaria | Cecropinas, catelicidinas, defensinas |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> | Criptosporidiosis | Defensinas, magainina |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | Amebosis intestinal | CM11 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Toxoplasmosis | Defensinas |

Tabla 2. Ejemplos de AMPs activos en enfermedades parasitarias. Adaptado de (7).

Los principales mecanismos por los que los AMPs llevan a cabo su acción son: la muerte directa (disrupción de la membrana y acción contra dianas intracelulares) y la inmunomodulación (Figura 4) (8).

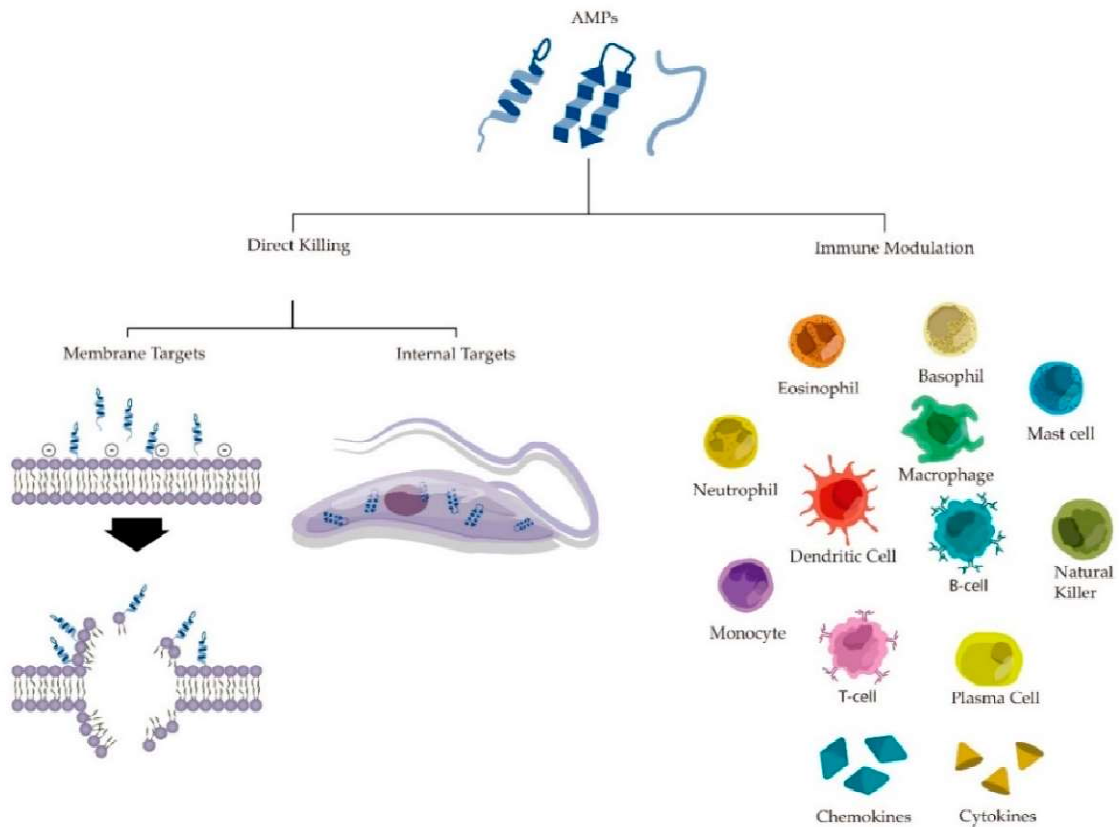


Figura 4. Mecanismo de acción de los AMPs antiprotozoarios. Recogido de (8).

4.1.1. Muerte directa

En primer lugar, como el péptido posee carga positiva, es atraído por la carga negativa de la membrana del parásito mediante una diferencia de potencial electrostático e interactúa con la bicapa lipídica (Figura 5). De esta manera, se orientan los residuos de aminoácidos hidrofóbicos y el péptido antimicrobiano es capaz de insertarse en la membrana y dañarla (10).

Por tanto, se conoce que los AMPs llevan a cabo este mecanismo mediante la disipación del potencial electroquímico, la inducción de la asimetría de la bicapa lipídica y la pérdida de componentes intracelulares. En este sentido, también pueden inhibir procesos celulares, como la transcripción o la síntesis de proteínas (10).

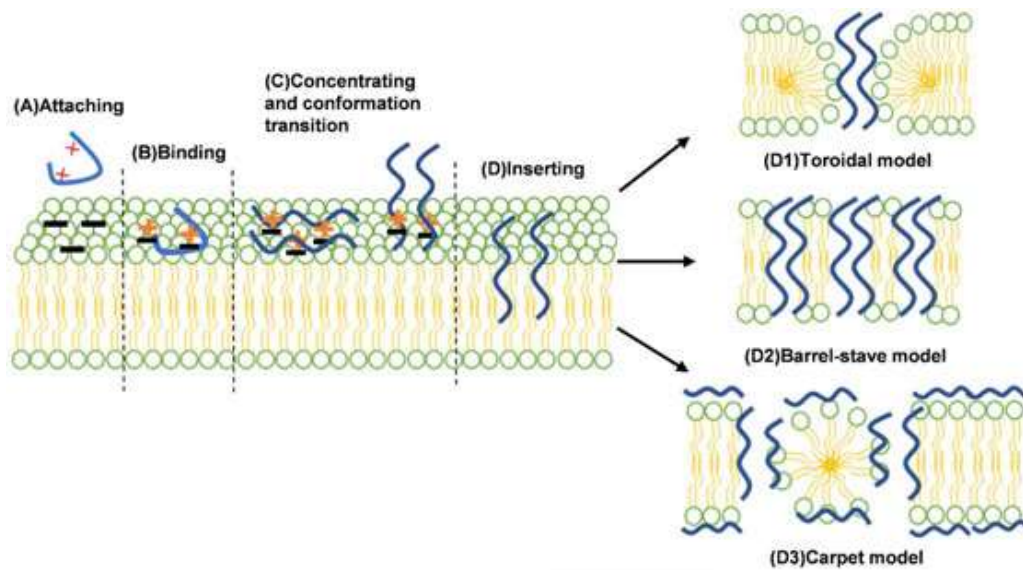


Figura 5. Interacción entre los péptidos antimicrobianos y las membranas bacterianas. Recogido de (10).

Existen diferentes modelos por los que estos péptidos pueden llevar a cabo la muerte directa, que son: el modelo toroidal, el modelo de barril y el modelo de alfombra (8).

4.1.2. *Inmunomodulación*

Este mecanismo se basa en la modulación de diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria: activación, quimiotaxis, así como, diferenciación y maduración de las células dendríticas, macrófagos y monocitos, además de mejorar la actividad fagocítica, la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) y la señalización de ciertos receptores (por ejemplo: receptores *Toll Like*) en dichas células. Todo esto resulta en una mejora de la presentación de los antígenos, y por ende, en la respuesta contra la infección. También son capaces de promover la degranulación de los mastocitos, establecer un control de la angiogénesis y en la proliferación de queratinocitos para favorecer la cicatrización de heridas (Figura 6) (8,11).

Asimismo, la mayoría de los AMPs actúan mediante la activación del sistema inmunitario; en cambio, algunos de ellos pueden actuar mediante el mecanismo contrario, inhibiendo la respuesta inflamatoria suprimiendo la acción de las citocinas proinflamatorias (Figura 6) (8,11). Este mecanismo de regulación de la inflamación representa una ventaja frente a otros fármacos que estimulan la respuesta inmunitaria, ya que se reduce la posibilidad de producir una inflamación excesiva (11).

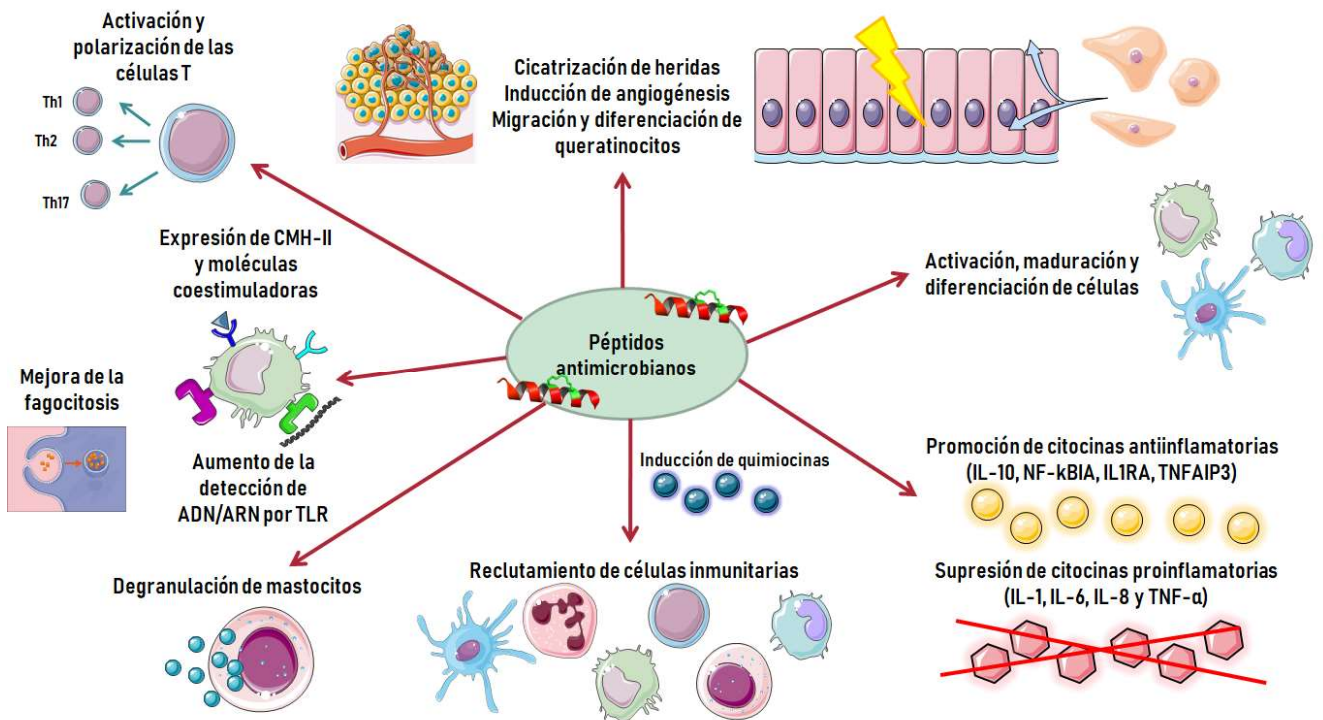


Figura 6. Actividad inmunomoduladora de los AMPs en las infecciones. Elaboración propia a partir de (11). Imágenes recogidas de: Servier Medical Art [Internet] [consultado 15 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://smart.servier.com/>

4.2. Limitaciones de los AMPs

A pesar de las ventajas que presenta la utilización de estos péptidos como agentes antimicrobianos, poseen una serie de características que limitan su empleo *in vitro* e *in vivo* (Tabla 3).

| Limitaciones | Causas | Soluciones |
|--------------------------------------|---|--|
| Inducción de resistencia | <p>Expresión por los amastigotes y promastigotes de metaloproteasas de superficie (leishmanolisina o Gp63), capaces de destruir los AMPs.</p> <p>Resistencia intrínseca de los amastigotes a los AMPs por estar libres de proteofosfoglicano (PPG).</p> | |
| Biodisponibilidad | <p>Problemas de estabilidad por la susceptibilidad de los AMPs a las proteasas.</p> <p>Poca capacidad de penetración en la mucosa intestinal.</p> | <p>Sustitución de los L-aminoácidos por D-aminoácidos.</p> <p>Amidación de la región C-terminal.</p> <p>Síntesis de péptido-miméticos, más pequeños y menos sensibles a las proteasas.</p> |
| Condiciones del medio | <p>Sensibilidad a los cambios de pH y a las concentraciones fisiológicas de sales. Aún así, a cada péptido le afecta de manera distinta.</p> | |
| Citotoxicidad | <p>Las modificaciones para aumentar la actividad de los péptidos, como aumento de la carga positiva o aumento excesivo de hidrofobicidad, pueden incrementar la actividad tóxica.</p> | |
| Penetración en los macrófagos | <p>Para que el péptido ejerza su acción sobre las formas intramacrofágicas debe ser capaz de atravesar la membrana celular.</p> | <p>Incorporación de los AMPs a determinados vehículos: nanopartículas mesoporosas. Pueden aumentar la toxicidad.</p> |

Coste

La síntesis de estos péptidos supone un alto coste, siendo una limitación para su utilización a gran escala en las poblaciones más afectadas por la leishmaniasis.

Tabla 3. Limitaciones de los AMPs. Adaptado de (3, 12-16).

4.3. ¿Son útiles los péptidos antimicrobianos en el tratamiento frente a la leishmaniasis?

Un ejemplo de esta utilidad se observa en el estudio llevado a cabo por Khalili *et al*, en el que se evaluó la actividad *in vitro* del péptido CM11 (un híbrido de cecropina y melitina) frente a amastigotes y promastigotes de *Leishmania major*, en comparación con la actividad de Glucantime® (antimoniato de meglumina). Este último se utilizó como control a una concentración de 123,50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (17).

Por un lado, en el ensayo contra los promastigotes, se observó que a bajas concentraciones del péptido (8 μM) ya se mostraban cambios morfológicos en los parásitos, y a medida que aumentaba la concentración (64-128 μM), CM11 produjo la disrupción de la membrana. Además, se demostró que reducía la supervivencia parasitaria bajo un efecto dosis-dependiente y se calculó la IC_{50} , siendo ésta de 6,92 μM . Por otro lado, se determinó el efecto frente a los amastigotes, siendo también dosis-dependiente con una IC_{50} de 9,015 μM . Con estos resultados, se evidenció que los promastigotes son más sensibles a la acción de los péptidos que los amastigotes, ya que se necesita una concentración menor para la reducción de su viabilidad (17).

Asimismo, se evaluó la actividad citotóxica de CM11, y se concluyó que no era significativa a concentraciones de 8 y 16 μM , siendo este rango el necesario para la acción anti-leishmania. En cambio, a concentraciones mayores (64 μM), sí se disminuyó la viabilidad de los macrófagos murinos con una IC_{50} de 44,49 μM (17).

Otro aspecto importante es la diferencia en la actividad de los AMPs contra las formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania*. Un estudio realizado por Zahedifard *et al.* valora las diferencias en la actividad contra las distintas formas del parásito y la repercusión de la modificación de la estructura de los péptidos, tanto en la actividad como en la aparición de efectos adversos (18).

Este ensayo se realizó con el péptido Brevinina-2R, un miembro de la familia de las defensinas, y su conjugado con ácido láurico (L-Brevinina-2R), y se investigó su acción contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania major*. En este caso, Brevinina-2R inhibió el crecimiento de los promastigotes a una concentración de 500 µg/mL, mientras que no limitó el crecimiento de los amastigotes. En cambio, L-Brevinina-2R impidió el crecimiento de los promastigotes a una concentración menor que la Brevinina-2R, que fue de 40-50 µg/mL, y también pudo inhibir el crecimiento de los amastigotes a una concentración de 10-20 µg/mL (18).

La actividad dual de la L-Brevinina-2R probablemente se deba a la conjugación con el ácido láurico, que le ofrece mayor hidrofobicidad al péptido, por lo que aumenta su actividad y capacidad de actuar contra los promastigotes y amastigotes. Sin embargo, esta propiedad también le confiere la capacidad de producir un efecto adverso grave, que es la citotoxicidad dosis-dependiente, mientras que la Brevinina-2R no lo presenta. La L-Brevinina-2R produjo hemólisis en células sanguíneas cultivadas a una concentración de 250 µg/mL, siendo una concentración notablemente mayor a la concentración a la que produce la inhibición de los parásitos (18).

Asimismo, como L-Brevinina-2R fue el péptido que tuvo mayor efectividad contra la etapa promastigote y probablemente fuera el único péptido que podía afectar a la etapa de amastigote, se probó en modelos animales. En este ensayo, se observó que no producía ningún efecto adverso, como sensibilidad, dificultad para caminar o dolor en las almohadillas en los ratones Balb/c estudiados. Además, se evidenció la reducción de la carga parasitaria en ratones tratados con el péptido L-Brevinina-2R (18).

Por tanto, merece la pena destacar que la actividad antiparasitaria de los AMPs no solo depende del péptido y sus características (mecanismo de acción,

hidrofobicidad, carga, estereoquímica, etc.), sino también de la composición de la membrana de los parásitos o la forma del ciclo biológico en la que se encuentre (17).

4.4. ¿Es posible el desarrollo de vacunas basadas en AMPs para el control de la leishmaniasis?

Los AMPs poseen actividades inmunomoduladoras que se pueden aplicar para diversas funciones terapéuticas, como inmunoterapia frente al cáncer, tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, promoción de la cicatrización o como adyuvantes de vacunas (Figura 7) (11).

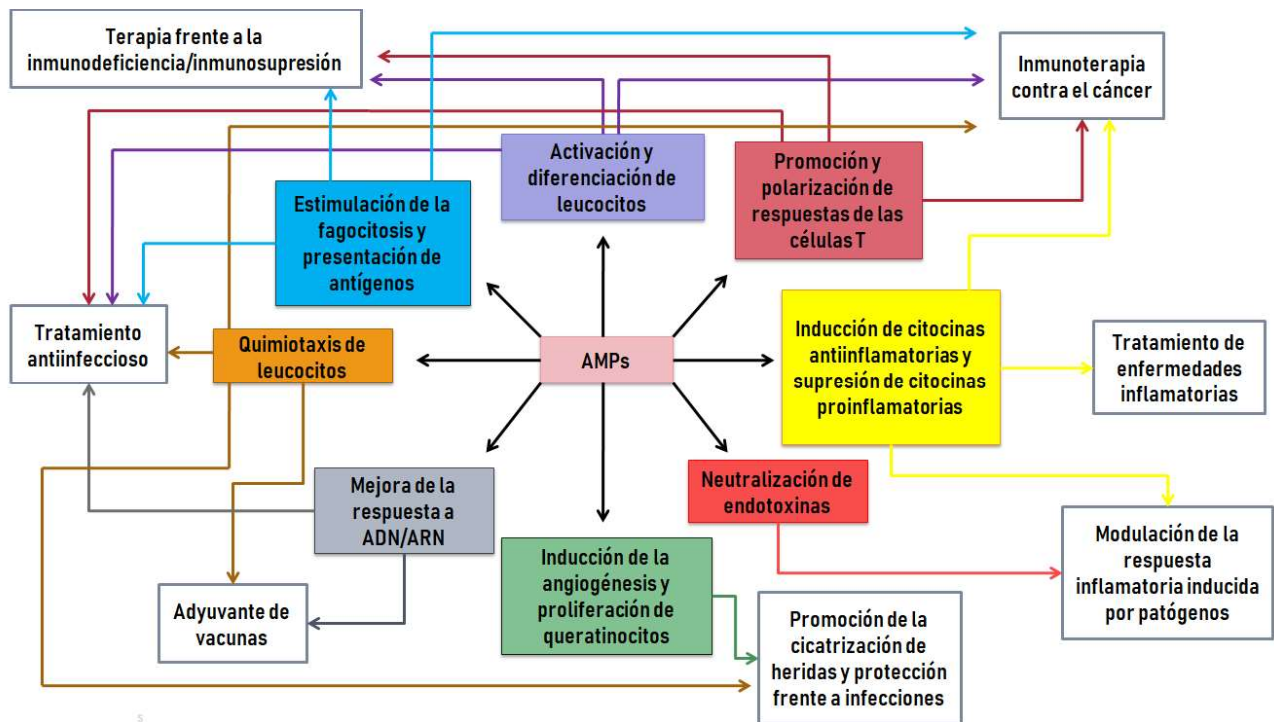


Figura 7. Aplicaciones terapéuticas de los AMPs gracias a su actividad inmunomoduladora. Elaboración propia a partir de (11). Las casillas con colores representan las actividades inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos y las casillas en blanco son las posibles aplicaciones de dichas actividades. Para su interpretación, se relaciona la actividad inmunomoduladora, mediante una flecha del mismo color, con la aplicación correspondiente.

En cuanto al empleo de estos péptidos como adyuvantes, se sabe que pueden reclutar linfocitos T y células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas), y polarizar al sistema inmunitario hasta una respuesta de tipo Th1 (respuesta celular) o Th2 (respuesta humoral) (11). Por ejemplo, en un estudio desarrollado por Kim *et al.*, se probó la actividad inmunomoduladora

de β -defensina 2 humana (hBD-2) como adyuvante en una vacuna contra el virus MERS-CoV, utilizándose la proteína S del virus como antígeno. La administración del antígeno conjugado con hBD-2 a células THP-1 similares a macrófagos, promovió y mejoró la expresión génica de quimiocinas y citocinas relacionadas con la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, en comparación con las células tratadas con el antígeno solo. Además, tras la inyección de la vacuna a ratones, existía un título mayor de anticuerpos en el suero de los ratones tratados con dicha conjugación, y en concreto, el título de IgG específico contra la proteína S (19).

Por otro lado, también se determinó la eficacia con la que los anticuerpos se unían al receptor de la proteína S en células Huh-7 y en la línea celular Vero E6 sensible a MERS-CoV, y se demostró que inhibían de manera eficiente dichos receptores. Asimismo, hubo un incremento de la inhibición de la carga vírica en los ratones inmunizados con la proteína S conjugada con hBD-2, en comparación con los tratados con el antígeno solo, concluyéndose que hBD-2 promueve una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por el virus (19).

Sin embargo, la producción de anticuerpos no es eficaz para el control de la infección por parte de los parásitos del género *Leishmania*. La liberación de citocinas y quimiocinas puede desencadenar una gran cantidad de procesos, entre ellos, una respuesta de tipo T helper 1 (Th1), que sí promueve la cura de la leishmaniasis, pero aún no se ha obtenido demasiada información sobre ello.

En 2020 se realizó un estudio por Hong *et al.*, en el que utilizó una β -defensina aviar, la AvBD5, y se investigó su efecto sobre los macrófagos de gallina. Se observó que la AvBD5 condujo a que los macrófagos expresaran diferentes citocinas, como INF- γ , IL-10 o IL-17A, que daban lugar a una respuesta de tipo Th1, Th2 y Th17 respectivamente (20). Esto podría ser un comienzo para investigar más profundamente el potencial de los AMPs como componentes para el desarrollo de vacunas basadas en péptidos contra la leishmaniasis.

5. Discusión

La leishmaniasis es una enfermedad de creciente importancia, ya que afecta a una gran parte de la población mundial, que además, presentan recursos limitados. A esto se suma el problema del incremento de resistencias y la manifestación de efectos adversos a los fármacos que se utilizan normalmente para luchar contra la leishmaniasis. Por estas razones, se ha comenzado a investigar nuevos agentes que pudieran servir como alternativa al tratamiento convencional, como son los péptidos antimicrobianos. Estas moléculas han sido elegidas debido a que han demostrado actividad frente a bacterias multirresistentes, y han sido utilizadas en combinación con antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por dichas bacterias, evidenciando el efecto antimicrobiano tanto en solitario como en combinación. Asimismo, se ha querido descubrir si dicha actividad se puede ampliar a enfermedades parasitarias, viéndose que algunos péptidos han sido activos frente a parásitos que producen enfermedades importantes para la Salud Pública, como la malaria o la enfermedad de Chagas.

Tras esta revisión, se ha demostrado que algunos AMPs presentan ventajas para tratar la leishmaniasis en el ámbito farmacológico. Por ejemplo, en el estudio de Khalili *et al.*, se observa que se necesitan dosis menores para poder controlar el desarrollo de los parásitos, y por ende, la infección, en comparación con el tratamiento convencional. Además, presentan menor riesgo de aparición de efectos adversos, debido a que la concentración a la que produce citotoxicidad es mucho mayor que la requerida para la acción antiparasitaria.

Por otro lado, se demostró en el estudio llevado a cabo por Zahedifard *et al.* que algunas modificaciones en la estructura mejoran la actividad frente a los parásitos y se podría aumentar la sensibilidad de los amastigotes a los AMPs, debido a que, como se encuentran en el medio intracelular, es más complicado que el péptido ejerza su acción. Se debe tener en cuenta este aspecto, ya que los amastigotes son las formas que se encuentran en el humano y contra las que los fármacos deberían ser capaces de actuar.

En este sentido, cabe destacar el comportamiento de los péptidos en el organismo. Estos fármacos presentan problemas en la farmacocinética; son

sensibles a las condiciones fisiológicas por la presencia de proteasas, sales y cambios en el pH, y además, en algunas ocasiones se necesita un vehículo para que puedan penetrar en las células del hospedador y mejorar su estabilidad *in vivo*. Estas complicaciones pueden derivar a que los péptidos no puedan ejercer su actividad de manera satisfactoria, ya que probablemente no lleguen en cantidad suficiente al lugar de acción. Pese a esto, se ha visto que cabe la posibilidad de sintetizar unos péptidos análogos de los AMPs, más pequeños y con mejores características farmacocinéticas, o bien, realizar modificaciones en los propios péptidos para que sean más resistentes a las condiciones *in vivo*.

Ahora bien, la modificación de la estructura de los péptidos es un arma de doble filo, dado que se incrementa el coste de estas moléculas. Este hecho hace que sea más difícil que la población diana pueda acceder a este tipo de tratamiento, ya que la mayoría se trata de poblaciones con recursos muy limitados, y esto dificulta a su vez el control de la enfermedad.

Finalmente, no se han encontrado evidencias ni estudios que manifiesten que el tratamiento con estos péptidos cure la infección por *Leishmania* gracias a su actividad antimicrobiana, debido a que únicamente limitan la proliferación de los parásitos. No obstante, se ha observado que los AMPs poseen cualidades, como la inmunomodulación, que podrían contribuir a la cura de la leishmaniasis. Este tipo de mecanismo les confiere la capacidad de tener múltiples aplicaciones en el ámbito de la inmunoterapia, entre ellas, el empleo como adyuvantes de vacunas. Esta aplicación demuestra que estos péptidos pueden promover respuestas de tipo inmunitario, como la producción de anticuerpos, que pueden ser útiles para el control de determinadas infecciones.

No existen estudios en los que se demuestre la actividad de los AMPs como componente principal de las vacunas, pero se sabe que, entre todas las posibles actividades de modulación sobre el sistema inmunitario, son capaces de polarizar las respuestas de tipo T helper hacia T helper 1, como se observa en el estudio realizado por Hong *et al.* Este tipo de respuesta sí podría participar en la cura de la leishmaniasis, aunque aún no se han realizado

estudios que hagan que sea posible llegar a esta conclusión de manera indiscutible.

6. Conclusiones

- Los péptidos antimicrobianos se han convertido en moléculas interesantes para la investigación de nuevos agentes farmacológicos, ya que poseen características aptas para el desarrollo de fármacos frente a diferentes agentes infecciosos, debido a su actividad antimicrobiana e inmunomoduladora. Sin embargo, no han mostrado una farmacocinética favorable para su utilización *in vivo*, lo que hace que su uso en organismos animales, y a su vez, en humanos, sea un reto aún por resolver.
- Los péptidos antimicrobianos han demostrado ser capaces de disminuir la supervivencia de *Leishmania*, por lo que serían útiles para el tratamiento de la enfermedad, pero esta actividad no es suficiente para su control. Por el contrario, se ha probado que su actividad inmunomoduladora podría ser una vía adecuada para el desarrollo de vacunas y acercarse a una posible cura de la leishmaniasis, aunque se necesitan más estudios al respecto.

7. Bibliografía

1. Pan American Health Organization [Sede Web] [consultado 28 de abril de 2022] Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
2. Centers for disease control and prevention [Sede Web] [actualizado 14 de diciembre de 2017; consultado 28 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
3. Zahedifard F, Rafati S. Prospects for antimicrobial peptide-based immunotherapy approaches in *Leishmania* control. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet] 2018 [consultado 25 de febrero de 2022]; 16(6):461-469. doi: 10.1080/14787210.2018.1483720
4. Centers for disease control and prevention [Sede Web] [actualizado 24 de febrero de 2022; consultado 2 de marzo de 2022]. Disponible en:

https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html#tx

5. Robles-Loaiza A, Pinos-Tamayo E, Mendes B, Teixeira C, Alves C, Gomes P, Almeida J. Peptides to tackle leishmaniasis: current status and future directions. *Int J Mol Sci* [Internet] 2021 [consultado 28 de febrero de 2022]; 22(9):4400. doi: 10.3390/ijms22094400
6. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* [Internet] 2005 [consultado 26 de mayo de 2022]; 77(4):451-9. doi: 10.1189/jlb.0704380
7. El-Dirany R, Shahrour H, Dirany Z, Abdel-Sater F, González-Gaitano G, Brandenburg K, Martínez de Tejada G, Nguewa P. Activity of antimicrobial peptides (AMPs) against *Leishmania* and other parasites: an overview. *Biomolecules* [Internet] 2021 [consultado 9 de marzo de 2022]; 11(7):984. doi: 10.3390/biom11070984
8. Sabiá Júnior E, Santos Menezes L, Silva de Araújo I, Ferroni Schwartz E. Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against protozoan parasites. *Toxins* [Internet] 2019 [consultado 28 de febrero de 2022]; 11(10):563. doi: 10.3390/toxins11100563
9. Wu X, Li Z, Li X, Tian Y, Fan Y, Yu C, Zhou B, Liu Y, Xiang R, Yang L. Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Drug Des Devel Ther* [Internet] 2017 [consultado 16 de mayo de 2022]; 11:939-946. doi: 10.2147/DDDT.S107195
10. Wang J, Dou X, Song J, Lyu Y, Zhu X, Xu L, Li W, Shan A. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Med Res Rev* [Internet] 2018 [consultado 9 de marzo de 2022]; 39:831-859. doi: 10.1002/med.21542
11. Martell E, González-García M, Ständker L, Otero-González A. Host defense peptides as immunomodulators: the other side of the coin. *Peptides* [Internet] 2021 [consultado 28 de abril de 2022]; 146:170644. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170644
12. Lynn MA, Kindrachuk J, Marr AK, Jenssen H, Panté N, Elliott MR, Napper S, Hancock RE, McMAster WR. Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role

- of leishmanolysin in parasite survival. PLoS Negl Trop Dis [Internet] 2011 [consultado 26 de mayo de 2022]; 5(5):e1141. doi: 10.1371/journal.pntd.0001141
13. Eggimann G, Sweeney K, Bolt H, Rozatian N, Cobb S, Denny P. The role of phosphoglycans in the susceptibility of *Leishmania mexicana* to the temporin family of anti-microbial peptides. Molecules [Internet] 2015 [consultado 12 de marzo de 2022]; 20:2775-2785. doi: 10.3390/molecules20022775
 14. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. AAPS J [Internet] 2015 [consultado 26 de mayo de 2022]; 17(1):134-143. doi: 10.1208/s12248-014-9687-3
 15. Lee J, Yang S, Lee S, Jung H, Shin S, Hahm K, Kim J. Salt-resistant homodimeric bactenecin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. FEBS J [Internet] 2008 [consultado 16 de abril de 2022]; 275(15):3911-20. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06536.x
 16. Braun K, Pochert A, Lindén M, Davoudi M, Schmidtchen A, Nordström R, Malmsten M. Membrane interactions of mesoporous silica nanoparticles as carriers of antimicrobial peptides. J Colloid Interface Sci [Internet] 2016 [consultado 30 de abril de 2022]; 475:161-170. doi: 10.1016/j.jcis.2016.05.002
 17. Khalili S, Ebrahimzade E, Mohebbi M, Shayan P, Mohamadi-Yeganeh S, Moghaddam MM, Elikae S, Akhoundi B, Sharifi-Yazdi MK. Investigation of the antimicrobial activity of a short cationic peptide against promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MHRO/IR/75/ER): an *in vitro* study. Exp Parasitol [Internet] 2019 [consultado 14 de mayo de 2022]; 196:48-54. doi: 10.1016/j.exppara.2018.11.006
 18. Zahedifard F, Lee H, Hwan No J, Salimi M, Seyed N, Asoodeh A, Rafati S. Anti-leishmanial activity of Brevinin 2R and its Lauric acid conjugate type against *L. major*: *in vitro* mechanism of actions and *in vivo* treatment potentials. PLoS Negl Trop Dis [Internet] 2019 [consultado 26 de marzo de 2022]; 13(2):e0007217. doi: 10.1371/journal.pntd.0007217
 19. Kim J, Lin Yang Y, Jang SH, Jang YS. Human β -defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating

the induction of antigen-specific immunity. *Virologia* [Internet] 2018 [consultado 3 de mayo de 2022]; 15(1):124. doi: 10.1186/s12985-018-1035-2

20. Hong Y, Lee J, Hao Vu T, Lee S, Lillehoj H, Ho Hong Y. Immunomodulatory effects of avian β -defensin 5 in chicken macrophage cell line. *Res Vet Sci* [Internet] 2020 [consultado 16 de abril de 2022]; 132:81-87. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.06.002