



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA
DEL VIRUS DE ARN DE *LEISHMANIA*
(LRV1) Y LA SUSCEPTIBILIDAD DE
AISLADOS CLÍNICOS DE *LEISHMANIA*
BRAZILIENSIS A ESTÍMULOS DE
ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN:
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

JOVANKA GENCEL AUGUSTO

LIMA-PERÚ

2017

ASESORA:

Vanessa Karina Aдаui Sicheri, MSc., PhD.

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Un principal agradecimiento especial a mi asesora, Vanessa Adai, por haber hecho una gran diferencia durante esta etapa, por el gran trabajo en conjunto y su amistad. También, al profesor Denis Castillo, por su apoyo durante la parte experimental y excelentes sugerencias para el manuscrito final. A los integrantes del Laboratorio de Patho-Antígenos: Prof. Jorge Arévalo, por sus aportes en la formulación del proyecto y durante su ejecución, a Marlene Jara por su apoyo con la parte correspondiente a Biología Molecular y en mis consultas sobre temas relacionados al proyecto, a Javier Enciso por su ayuda en el cultivo de parásitos, y a todos los demás integrantes por crear un buen ambiente de trabajo.

También, me gustaría agradecer a Daniel Matos por su ayuda con la manipulación de roedores. A Luis Herrera, por su ayuda con la manipulación de ARN y procedimientos relacionados. A Sebastien Rafael, por el apoyo durante su periodo de trabajo en Patho-Antígenos. A Milagros Suárez, por el entrenamiento inicial sobre manejo de cultivo de *Leishmania*, y al Laboratorio de Parasitología Celular por las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones.

Con respecto al co-financiamiento del presente trabajo de investigación, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC/convenio 031-2015-FONDECYT) y a la Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD/FA3-III, programa 2014-2016).

Finalmente, a mis padres, por siempre depositar su confianza en mí y alentarme a ser mejor. A mis hermanas, por darme momentos muy bonitos fuera del trabajo,

los cuales ayudaron a poder concentrarme más durante la semana. Y a mis amigos: Alejandra Pizarro, María Claudia Janampa, Marcos Espinel, Luis Cabrera, Jose Alberto Nakamoto, Luis Herrera, Fabiola Valdivia, por siempre estar dispuestos a ayudarme y pasar momentos agradables.

TABLA DE CONTENIDOS

I.	RESUMEN	
II.	ABSTRACT	
III.	INTRODUCCIÓN	1
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	4
V.	MARCO TEÓRICO	6
VI.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
VI.I	Hipótesis	22
VI.II	Objetivos	22
VI.II.I	Objetivo General	22
VI.II.II	Objetivos Específicos	22
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
VII.I)	Población y muestra: Selección de aislados de Leishmania	24
VII.II)	Cultivo celular de Leishmania in vitro:	25
VII.II.II)	Obtención de cultivo de amastigotes axénicos	25
VII.II.III)	Curva de crecimiento de Leishmania braziliensis	26
VII.III)	Determinación de niveles relativos de transcritos virales	27
VII.III.I)	Extracción de ARN	27
VII.III.I.I)	Preparación de muestras para la extracción de ARN	27
VII.III.I.II)	Extracción de ARN por el método de Fenol-cloroformo (Trizol)	29
VII.III.I.III)	Extracción de ARN mediante GeneJet RNA Purification Kit (ThermoScientific)	30
VII.III.II)	Cuantificación de ARN (Quant-it Kit RNA-BR)	31
VII.III.III)	Electroforesis en gel de agarosa para ARN	32
VII.III.IV)	Tratamiento del ARN con DNasa	32
VII.III.V)	Transcripción reversa para obtención de cDNA	33
VII.III.VI)	PCR cuantitativo en tiempo real	35
VII.IV)	Infecciones de macrófagos	39
VII.IV.I)	Obtención de macrófagos peritoneales de ratón	39
VII.IV.II)	Obtención de amastigotes intracelulares	40
VII.IV.III)	Monitoreo de tasas de infección	42

VII.V) Ensayos de citotoxicidad en macrófagos	42
VII.V.I) Preparación de drogas y diluciones	42
VII.V.II) Ensayo de susceptibilidad a drogas en macrófagos peritoneales de ratón.....	43
VII.VI) Ensayo enzimático de actividad de tripanotión reductasa (TryR) ..	45
VII.VII) Ensayos de estrés en amastigotes intracelulares in vitro	46
VII.VIII) Plan de análisis	48
VII.IX) Lugar de estudio	49
VIII. RESULTADOS.....	50
VIII.I) Selección de aislados de <i>L. braziliensis</i>	50
VIII.II) Cultivo de <i>Leishmania</i>	52
VIII.III) Determinación de los niveles relativos de transcritos virales	53
VIII.IV) Ensayos de citotoxicidad en macrófagos	59
VIII.V) Infecciones de macrófagos	65
VIII.VI) Estandarización del ensayo enzimático de actividad de tripanotión reductasa (TryR)	67
VIII.VI.I) Estandarización del ensayo de TryR en promastigotes	67
VIII.VI.II) Estandarización del ensayo de TryR en amastigotes axénicos	69
VIII.VI.III) Estandarización del ensayo de TryR en amastigotes intracelulares ..	70
VIII.VII) Ensayos in vitro de SUSCEPTIBILIDAD A ESTÍMULOS DE estrés en amastigotes intracelulares.....	73
IX) DISCUSIÓN	101
X) CONCLUSIONES	114
XI) DIRECCIONES FUTURAS	115
XII) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
XIII) LISTA DE TABLAS	127
XIV) LISTA DE FIGURAS	129
XV) LISTA DE ABREVIATURAS	132
XVI) ANEXOS.....	136

I. RESUMEN

El virus endosimbionte de ARN, *Leishmaniavirus 1* (LRV1), ha sido identificado frecuentemente en *Leishmania braziliensis* y *L. guyanensis*, ambos agentes causales de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Nuevo Mundo. Se ha demostrado que la presencia de LRV1 en *L. guyanensis* influencia la gravedad de la enfermedad en modelos murinos. Recientemente, nuestro grupo de investigación encontró una asociación entre la presencia de LRV1 y la falla clínica al tratamiento con antimoniales, en la infección en humanos por *L. braziliensis*. Se ha hipotetizado que LRV1 le conferiría una ventaja de supervivencia a su hospedero *Leishmania*, incluyendo una sensibilidad disminuida frente a condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo. Con el objetivo de explorar esto, nos enfocamos en aislados clínicos de *L. braziliensis* con diferente condición de infección por LRV1 (LRV1-positivos o -negativos) y analizamos su susceptibilidad *in vitro* como amastigotes intracelulares a diferentes tipos de estrés.

Seleccionamos 10 aislados de *L. braziliensis* (previamente caracterizados: 5 LRV1+ y 5 LRV1-) provenientes de diversas regiones endémicas de Perú. Los niveles relativos de transcritos virales fueron estimados usando qRT-PCR, amplificando un segmento del gen que codifica la proteína de la cápside de LRV1 y, paralelamente, el gen *G6PD* de *Leishmania* para la normalización (expresado como transcritos de LRV1/G6PD). Se extrajo macrófagos peritoneales de ratón y estos fueron infectados con los parásitos en proporción de 1:10. Luego de 24 horas de infección, se expuso los amastigotes intracelulares a 3 tipos de estrés diferentes: oxidativo y nitrosativo indirecto (antimonio trivalente y pentavalente –

Sb^{III} y Sb^V) y nitrosativo directo (SNAP – un donante de óxido nítrico), por 48 horas. La concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) fue determinada usando un ensayo colorimétrico basado en la actividad de la enzima tripanotión reductasa (TryR) que es exclusiva de tripanosomátidos y el posterior análisis de regresión sigmoideal.

Los aislados LRV1+ estudiados mostraron un amplio rango de niveles de transcritos virales (de 10 a 350 transcritos virales por transcritos del parásito). Nuestros datos de susceptibilidad *in vitro* a los estímulos de estrés evaluados sugieren que los parásitos de *L.braziliensis* LRV1+ tienden a presentar una mejor tolerancia frente a estrés nitrosativo directo [SNAP – con medianas de IC₅₀ de 280.1 μM (LRV1+) vs. 73.94 μM (LRV1-)], así como a establecer una mejor infección *in vitro* en macrófagos murinos [mediana del porcentaje de infección: 78% (LRV1+) vs. 51% (LRV1-); mediana de índice de infección: 472 (LRV1+) vs. 219.5 (LRV1-)], aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los valores de IC₅₀ frente a la exposición a Sb^{III} fueron muy dispersos en los dos grupos de aislados, y no se pudo establecer ninguna asociación entre la presencia de LRV1 y la tolerancia de los aislados hacia esta droga. Asimismo, tal como fue previamente reportado, la tolerancia intrínseca de los parásitos hacia Sb^V no fue diferencialmente influenciada por la presencia de LRV1. Un posterior análisis de los porcentajes de inhibición del crecimiento alcanzados en la máxima concentración de cada droga probada para cada aislado, así como su actividad de TryR basal, tampoco reflejó diferencias significativas entre grupos.

En general, estos resultados podrían reflejar la distinta constitución genética de los parásitos (no se usaron líneas isogénicas), así como la condición de infección por LRV1.

Palabras clave.- *Leishmania*, *Leishmaniavirus*, estrés oxidativo y nitrosativo, tripanotión reductasa.

II. ABSTRACT

The endosymbiont RNA virus, *Leishmanivirus 1* (LRV1), has been frequently identified in *Leishmania braziliensis* and *L. guyanensis*, which cause both cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the New World. LRV1 presence in *L. guyanensis* was shown to influence disease severity in a murine model. Recently, we found an association of LRV1 with antimonial treatment failure in human *L. braziliensis* infection. It has been hypothesized that LRV1 may confer a survival advantage to its *Leishmania* host, including a diminished parasite sensitivity to oxidative/nitrosative stress conditions. Aiming at exploring this, we focused on *L. braziliensis* isolates with different LRV1 status (LRV1-positive or -negative) and tested their susceptibility *in vitro* as intramacrophage amastigotes, to different types of stress.

We selected 10 *L. braziliensis* clinical isolates (previously characterized as 5 LRV1+ and 5 LRV1-) coming from diverse endemic regions of Peru. Relative viral transcript levels were estimated using qRT-PCR, amplifying a segment of LRV1 capsid gene; parallel amplification of the *Leishmania G6PD* gene was used for normalization (expressed as LRV1/G6PD transcripts). Mouse peritoneal macrophages were extracted and infected with the isolates at a 1:10 ratio. After 24 hours infection, intracellular amastigotes were exposed to different types of stress: indirect oxidative and nitrosative (trivalent and pentavalent antimony – Sb^{III} and Sb^V) and direct nitrosative (SNAP – a nitric oxide donor), for 48 hours. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined using a colorimetric assay based on the activity of trypanothione reductase, an enzyme that is unique to trypanosomatids, and sigmoid regression analysis.

The studied LRV1+ isolates showed a wide range of relative viral transcript levels (from 10 to 350 viral to parasite transcripts). Our data on the *in vitro* susceptibility stress tests suggest that LRV1+ *L.braziliensis* parasites tend to present higher tolerance against direct nitrosative stress [SNAP –IC₅₀ medians were 280.1 μM (LRV1+) vs. 73.94 μM (LRV1-)], as well as a trend towards higher infection percentage [medians were: 78% (LRV1+) vs. 51% (LRV1-)] and infection index [medians were: 472 (LRV1+) vs. 219.5 (LRV1-)] in murine macrophages *in vitro*, although the differences were not statistically significant. The IC₅₀ values obtained after Sb^{III} exposure were very scattered and it was not possible to determine any association between LRV1 presence and the isolate's tolerance towards this drug. Likewise, as it was previously reported, the intrinsic parasite's tolerance to Sb^V seemed not to be differentially influenced by LRV1 presence.

A further analysis on the isolate's growth inhibition percentage reached under the maximum drug's concentration tested, and their TryR activity under no stress conditions did not reflect any statistically significant differences between groups.

Overall, these results may reflect the parasite's distinct genetic background (non-isogenic isolates were used here) as well as LRV1 status.

Keywords.- *Leishmania*, *Leishmanivirus*, oxidative and nitrosative stresses, trypanothione reductase.

III. INTRODUCCIÓN

El virus de ARN de *Leishmania* (LRV1) infecta de manera persistente a protozoarios parásitos kinetoplásticos del Nuevo Mundo. Ha sido identificado frecuentemente en *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* (Widmer *et al.*, 1989), las cuales son agentes causales de la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea, endémicas en el Perú. Se ha demostrado en estudios anteriores, empleando modelos murinos, que la presencia del virus y los niveles relativos de transcritos virales (que reflejan la replicación viral) pueden influir en el desarrollo de la enfermedad. Se encontró que los ratones infectados con cepas de *L. guyanensis* LRV1-positivas (LRV1+) presentaron un incremento en la replicación del parásito y mayor gravedad de la patología, en comparación con los ratones infectados con cepas LRV1-negativas (LRV1-) (Ives *et al.*, 2011). LRV1 podría también desempeñar un rol en ‘metástasis infecciosa’ (esto es, la capacidad de los parásitos de *Leishmania* de migrar desde el sitio de inoculación inicial a sitios distantes), dado que la carga de LRV1 fue alta en parásitos de *L. guyanensis* con capacidad metastásica derivados de lesiones secundarias (diseminadas) en hámsters (Ives *et al.*, 2011). Asimismo, nuestro grupo de investigación, en un estudio colaborativo, determinó que la presencia del virus en aislados de *L. braziliensis* está asociada con un incremento en el riesgo de falla terapéutica con antimoniales pentavalentes (Sb^V) en pacientes de Perú y Bolivia (Adaui *et al.*, 2016).

Parte de la respuesta inmune innata del hospedero contra el parásito consiste en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno -entre estas

últimas el óxido nítrico (NO). Estas moléculas efectoras de la respuesta inmune también desempeñan un rol en la actividad antileishmanial de *Sb^V*. El mecanismo de acción de *Sb^V* implica el potenciamiento de la actividad microbicida de los macrófagos a través de una mayor producción de ROS y NO (Mookerjee *et al*, 2006).

El parásito posee distintos mecanismos que le permiten protegerse contra el ambiente hostil generado dentro del macrófago. Estudios han demostrado que aquellos parásitos capaces de sobrellevar mejor el estrés oxidativo/nitrosativo están asociados con fenotipos metastásicos y más agresivos de la enfermedad (Acestor *et al*, 2006). Giudice *et al* encontraron que aquellos pacientes infectados con parásitos que presentaron resistencia *in vitro* a NO (sobrevivencia a concentraciones de 16mM de NaNO₂) tuvieron lesiones más grandes que aquellos pacientes infectados con parásitos susceptibles a NO. Asimismo, los parásitos resistentes a NO se multiplicaron mejor en macrófagos humanos *in vitro*, que aquellos susceptibles (Giudice *et al*, 2007). Adicionalmente, Souza *et al* relacionaron la resistencia *in vitro* a NO de aislados de *L. braziliensis* con la falla terapéutica a antimoniales. Encontraron que los aislados provenientes de pacientes refractarios al tratamiento con *Sb^V* eran más tolerantes a NO que los parásitos provenientes de pacientes que curaron al tratamiento. También, aquellos parásitos resistentes a NO, provenientes de pacientes que presentaron falla terapéutica, establecieron una mejor infección en macrófagos *in vitro* e indujeron una menor producción de moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) –el cual desempeña la función de activar a los macrófagos para la producción de NO (Souza *et al*, 2010). Finalmente, en modelos murinos, se

determinó que infecciones con parásitos resistentes simultáneamente a Sb^V y a NO (Sb^V -NO-R) produjeron lesiones más grandes, que curaron más lentamente que aquellas infecciones con parásitos susceptibles (Sb^V -NO-S) (Costa *et al*, 2011).

El regulador más importante del balance redox en *Leishmania* es el tripanotión (Fairlamb *et al*, 1992). Esta molécula está presente únicamente en tripanosomátidos y es análoga al glutatión encontrado en mamíferos. El tripanotión posee capacidad para neutralizar ROS y NO cuando se encuentra en estado reducido. Para ejecutar su función permanentemente, la enzima tripanotión reductasa (TryR) cataliza la conversión del tripanotión en estado oxidado a su estado reducido. Se ha demostrado que parásitos mutantes para el gen *tryR* no son capaces de establecer infecciones en macrófagos murinos (Tovar *et al*, 1998). Así, el funcionamiento correcto de esta enzima determina la supervivencia del parásito dentro de su hospedero.

En este estudio se evaluó la asociación entre la presencia del virus LRV1 y la tolerancia de aislados clínicos de *L. braziliensis* a estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo (Sb^V , antimonio trivalente - Sb^{III} , y SNAP –un donante de NO) en el modelo *in vitro* de amastigote-macrófago. Para lo cual se implementó un ensayo enzimático capaz de medir la actividad de TryR, asociándola directamente con la viabilidad celular.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Planteamiento del problema:

Se ha demostrado en estudios anteriores que la presencia del virus LRV1 en parásitos de *L. guyanensis* puede influir en el desarrollo de leishmaniasis cutánea, en modelos murinos, donde se encontró un incremento en la carga parasitaria y mayor gravedad de la patología (Ives *et al*, 2011). Asimismo, nuestro grupo de investigación, determinó que la presencia del virus en aislados clínicos de *L. braziliensis* estuvo asociada con un incremento en el riesgo de falla terapéutica con antimoniales pentavalentes (*Sb^V*) (Adaui *et al*, 2016). De modo similar, un estudio realizado en Guyana Francesa estableció que la presencia de LRV1 en aislados de *L. guyanensis* fue predictiva de falla terapéutica y recaída sintomática frente al tratamiento con pentamidina (Bourreau *et al*, 2016).

Estos hallazgos abren una nueva área de investigación sobre la biología básica y los mecanismos por los cuales LRV contribuiría a la exacerbación de la enfermedad y a falla terapéutica, lo que en el futuro podría guiar las decisiones sobre el manejo terapéutico de los pacientes afectados. La importancia del estrés oxidativo y nitrosativo en el control de la infección por *L. braziliensis* no está bien entendida hasta el momento y mucho menos el impacto de LRV1. Hace falta un mayor entendimiento del rol que cumple LRV en el curso de la leishmaniasis humana. Por este motivo, en el presente estudio se hipotetizó que los parásitos infectados por LRV1 tendrían mayor capacidad para tolerar moléculas de estrés en

el estadio de relevancia clínica de amastigote intracelular. Así, se exploró la relación entre la presencia de LRV1 en aislados de *L.braziliensis* y su tolerancia a estímulos de estrés.

Justificación de la Investigación

Debido a la falta de entendimiento sobre el rol tanto del estrés oxidativo y nitrosativo, así como de la presencia de LRV1 en los procesos vitales y en la virulencia del parásito *Leishmania*, este estudio intentó dilucidar la posible asociación entre la infección por LRV1 de aislados clínicos de *L. braziliensis* y una mayor capacidad de los parásitos para tolerar moléculas de estrés. Un mayor entendimiento del rol que cumple LRV en el curso de la leishmaniasis humana podría contribuir a un mejor pronóstico y seguimiento de los pacientes afectados, y debe llevar a la búsqueda de nuevas y más eficientes opciones de tratamiento (por ejemplo, una terapia combinada de un antiviral con una droga antileishmanial).

V. MARCO TEÓRICO

Leishmaniasis y sus manifestaciones clínicas en el Nuevo Mundo

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Orden Trypanosomatida: Familia Trypanosomatidae; Akhoundi *et al*, 2016) que afecta a millones de personas. Es endémica en 98 países y tiene una prevalencia estimada de 12 millones de casos, con un incremento anual de 2 millones de casos (Alvar *et al*, 2012; WHO, 2010). Asimismo, es causa de aproximadamente 80 000 muertes al año. La enfermedad en humanos es causada por la picadura de una mosca, la cual inyecta el parásito en su estadio flagelado (promastigote) al torrente sanguíneo. Allí, el parásito es rápidamente fagocitado principalmente por macrófagos, donde reside finalmente dentro del fagolisosoma en su estadio infectivo no flagelado (amastigote) (Ronet *et al*, 2011). Las manifestaciones clínicas son variables y dependen de la especie infectante de *Leishmania* así como de la respuesta inmune del hospedero humano. Se observa desde lesiones cutáneas localizadas capaces de curarse espontáneamente, hasta la diseminación metastásica a mucosas y vísceras. Sin embargo, a pesar de su prevalencia y sintomatología agresiva, la enfermedad no es controlada adecuadamente. Se tienen pocas opciones de tratamiento y no hay vacunas disponibles (Hartley *et al*, 2014).

La Leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea (LMC) son endémicas en numerosas regiones tropicales y subtropicales. En Sudamérica, las especies del subgénero *L. (Viannia)* incluyendo principalmente a *L. braziliensis* y *L.*

guyanensis generan LC, pero también son responsables de LMC en un 5-10% de los casos (Hartley *et al*, 2014). La LMC es particularmente prevalente y agresiva en infecciones por *Leishmania (Viannia) sp.* en el neotrópico. Se caracteriza por ser metastática; presenta diseminación de los parásitos y lesiones secundarias distantes especialmente en áreas nasofaríngeas. Está acompañada de destrucción de tejido y respuesta hiper-inflamatoria con infiltración de células del sistema inmune (Ronet *et al*, 2010). Hasta la fecha, se conoce poco sobre la patogénesis de la LMC, especialmente los factores involucrados en la respuesta inmune del hospedero. Esta patología está asociada a hiperactividad de la respuesta inmune mediada por células T, altos niveles de citoquinas proinflamatorias tales como IFN- γ y TNF- α (Carvalho *et al*, 2007) y quimioquinas CXCL10 (Vargas-Inchaústegui *et al*, 2010) y CCL4 (Pirmez *et al*, 1993).

Estrés oxidativo/nitrosativo como parte de la defensa del hospedero y respuesta adaptativa en *Leishmania*

Como mecanismo de defensa, el macrófago genera moléculas de estrés oxidativo y nitrosativo tras la infección por *Leishmania*, con la intención de destruir los parásitos. Entre ellas están el óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻), radicales hidroxilo (OH^{*}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hidroperóxido (ROOH) y radicales superóxido (O₂^{-*}) (Freitas *et al*, 2014). De este modo, el macrófago representa un ambiente hostil para el parásito y, por ello, este último ha desarrollado adaptaciones que permiten su supervivencia (Opperdoes y Michels, 2008). Los mecanismos por los cuales los parásitos de *Leishmania* sobreviven la

exposición a las especies altamente reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) no son entendidos completamente.

Existen diversos estudios que demuestran que aquellas cepas que generan una manifestación clínica más agresiva son capaces de resistir mejor ante el estrés oxidativo y nitrosativo generado en el ambiente del macrófago. Acestor *et al* demostraron que la resistencia al estrés oxidativo está relacionada con la metástasis de los parásitos en LMC. Se observó una relación entre la supervivencia y persistencia del parásito y su capacidad para evadir la respuesta inmune innata del hospedero (moléculas de estrés) principalmente mediante la expresión diferencial de triparredoxina peroxidasa, lo cual les permitiría controlar los niveles de peróxido de hidrógeno en el medio (Acestor *et al.*, 2006). Adicionalmente, el NO es una citotoxina que participa en la eliminación de patógenos intracelulares, incluyendo *Leishmania*. Giudice *et al* encontraron que aquellos pacientes infectados con parásitos que presentaron resistencia *in vitro* a NO (sobrevivencia a concentraciones de 16mM de NaNO₂) tuvieron lesiones más grandes que aquellos pacientes infectados con parásitos susceptibles a NO *in vitro*. Asimismo, los parásitos resistentes a NO se multiplicaron mejor en macrófagos humanos *in vitro*, que aquellos susceptibles (Giudice *et al.*, 2007). Esto sugiere que, probablemente, uno de los factores asociados a una mayor patogénesis en el humano sea la capacidad de los parásitos para sobrellevar el estrés oxidativo que ocurre en momentos iniciales de la infección. Además, se ha identificado el rol de otras enzimas del parásito en la neutralización de estas moléculas de estrés y la progresión de la enfermedad, principalmente en modelos murinos (Muleme *et al*, 2009; Romao *et al*, 2006).

Tripanotión reductasa

El regulador más importante del balance redox en *Leishmania* es el tripanotión (Fairlamb *et al*, 1992). Esta molécula está presente únicamente en tripanosomátidos y es análoga al glutatión encontrado en mamíferos. El tripanotión es una molécula compuesta por la unión de dos moléculas de glutatión mediante espermidina y permite la neutralización de NO tóxico en tripanosomátidos (Opperdoes y Michels, 2008). A partir de su descubrimiento, el metabolismo de éste comenzó a tomar importancia por ser un blanco potencial de drogas anti-*Leishmania*. Una enzima importante en este proceso es la tripanotión reductasa (TryR), flavoproteína oxidoreductasa central del sistema tiol-redox que funciona únicamente en protozoarios tripanosomátidos (Tovar *et al*, 1998). Es un homodímero cuyo peso molecular por subunidad es de 52 KDa y cataliza la transferencia de electrones de NADPH al tripanotión oxidado vía el grupo prostético FAD y un disulfuro de cisteína activo en reacciones redox, que está presente en el sitio activo de la enzima (Rai *et al*, 2009). Tovar *et al* demostraron que mutantes para el gen codificante de TryR fueron drásticamente afectados en su capacidad para sobrevivir dentro de macrófagos activados en un modelo murino de infección por *Leishmania*. Así, TryR es una enzima esencial para la supervivencia de *Leishmania* en el hospedero mamífero (Tovar *et al*, 1998). Además, Romao *et al* investigaron el rol de este sistema en la protección contra S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP), un donante de NO. Se encontró que aquellas cepas con mayor concentración de glutatión eran más resistentes a SNAP (su concentración letal media fue mayor). También, se demostró que promastigotes de *L. donovani* con un solo alelo de *tryR* tuvieron una capacidad

disminuida para sobrevivir en presencia de SNAP (Romao *et al*, 2006). Estos estudios ponen en evidencia la importancia de TryR en la supervivencia de *Leishmania* en el modelo amastigote-macrófago.

Debido a que la TryR es una enzima esencial para el parásito, existen muchos esfuerzos para encontrar inhibidores específicos de ésta. Hamilton *et al* (2003) describieron el uso de un ensayo enzimático colorimétrico con una TryR recombinante a partir de *E. coli*, con el fin de encontrar inhibidores para esta enzima. Este ensayo se basa en la reducción del sustrato tripanotión disulfuro (T[S]2) a dihidrotripanotión (T[SH]2) por la TryR, y su oxidación *in situ* mediante el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), resultando en un ensayo colorimétrico. Recientemente, Van den Bogaart *et al* (2014) usaron el protocolo antes mencionado para abordar un ensayo de viabilidad de parásitos de *Leishmania* en el estadio de relevancia clínica de amastigotes intracelulares. En este ensayo, la TryR nativa es donada por los parásitos, y su actividad, medida por la reducción de DTNB (absorbancia a 415 nm), es directamente proporcional a la viabilidad celular. Esto permite disponer de un ensayo simple y robusto para analizar la capacidad antileishmanial de distintos compuestos, de una forma rápida.

El virus ARN de *Leishmania* (LRV1) y su influencia en la leishmaniasis

Desde los años 90 se ha reportado la presencia natural de un virus citoplasmático de doble hebra de ARN (dsRNA) en los parásitos de *Leishmania* pertenecientes al subgénero *L. (Viannia)* (*L. braziliensis* y *L. guyanensis*) (Widmer *et al*, 1989), el cual es miembro de la familia *Totiviridae*. Esta familia actualmente comprende cinco géneros de virus de dsRNA: *Totivirus*, *Victorivirus*, *Giardiavirus*, *Trichomonasvirus* y *Leishmaniavirus*; de los cuales los dos primeros infectan hongos y los restantes infectan parásitos protozoarios (Gupta & Deep, 2007; Ghabrial *et al*, 2009; Goodman *et al*, 2011). En *Leishmania*, éste es denominado como *Leishmaniavirus* (también conocido como virus ARN de *Leishmania* o LRV) y es un virus icosaedro, sin envoltura y mide aproximadamente 33 nm de diámetro. Posee un genoma de aproximadamente 5.3 Kb que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y una proteína de cápside (CP) (Kwon Chung *et al*, 1998). Su transmisión es vertical, es decir, mediante división celular. No ha sido posible encontrar partículas de LRV en el medio de crecimiento de parásitos infectados y no es infeccioso en el laboratorio. Asimismo, se ha demostrado que, aunque los parásitos no infectados pueden ser infectados con LRV y aquellos parásitos infectados pueden ser super-infectados mediante electroporación, las infecciones no persisten en los parásitos cultivados (Armstrong *et al*, 1993).

En 1997, Ro *et al* transfectaron parásitos de *Leishmania guyanensis* infectados con el virus, con un vector que contenía un gen de resistencia para higromicina, así como la secuencia de LRV, con el fin de sobreexpresar los transcritos virales y

monitorear la interacción de estos con moléculas del hospedero. Sorprendentemente, la transfección de los parásitos llevó a la eliminación de la infección viral tras cultivos mayores a 6 semanas en presencia de higromicina. Sin embargo, a pesar de esfuerzos posteriores, el protocolo no ha podido ser reproducido en el laboratorio.

LRV1 infecta de manera persistente ciertas cepas de *Leishmania*. Esta infección se mantiene a través de los estadios de promastigote (en el insecto vector) y amastigote (en el hospedero mamífero) (Kwon Chung *et al*, 1998). Se cree que probablemente el parásito y el virus coexisten en armonía, ya que la replicación no controlada del virus podría dañar al parásito. Esto implicaría que el parásito y el virus mantienen un flujo de información que permite controlar la replicación viral, el cual debe estar presente durante cambios en la densidad parasitaria, así como en cambios inherentes al ciclo de desarrollo del parásito (adaptaciones bioquímicas y moleculares durante la conversión entre estadios del parásito). La ausencia de un ciclo infeccioso extracelular del virus y la reproducción principalmente asexual (clonal) del parásito ha llevado a la hipótesis de un modelo de coevolución del virus y el parásito. Esto implica que el virus no pasa por procesos de recombinación genética, de modo que se espera que la evolución de los genomas de LRV diverja en paralelo a la especiación del parásito ancestral (Macbeth y Patterson, 1998).

Recientemente en modelos animales se asoció el fenotipo agresivo de la LMC con la presencia de LRV1 en cepas de *L. guyanensis*. Ives *et al* (2011) demostraron la presencia de alta carga viral de LRV1 en parásitos con capacidad metastásica derivados de lesiones secundarias (diseminadas) en hámsters. El dsRNA del virus

es reconocido por el sistema inmune innato del hospedero a través del “Toll-like receptor 3” (TLR3), lo cual induce la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias. En un modelo murino, esta respuesta inmune mediada por TLR3 aumentó la susceptibilidad a la infección por *Leishmania*, siendo responsable de la elevada carga parasitaria, persistencia del parásito y exacerbación de la patología (elevada inflamación de la almohadilla plantar) (Zangger *et al*, 2013; Ives *et al*, 2011). Por este motivo, la presencia de LRV1 en parásitos de *Leishmania* es considerado como un potente inmunógeno en el modelo murino.

Estudios reportados en humanos no mostraron una asociación tan fuerte entre la presencia del virus y las manifestaciones clínicas cutánea diseminada o compromiso mucoso, o con el tamaño o estadio de la lesión (Ogg *et al*, 2003; Pereira *et al*, 2013; Zangger *et al*, 2014; Aduai *et al*, 2016; Bourreau *et al*, 2016). Ello indica que el desarrollo de complicaciones crónicas o metastásicas de leishmaniasis es un proceso multifactorial complejo, en el que participan varios factores asociados al parásito y al humano incluyendo la microbiota o coinfecciones con otros patógenos (ej. VIH), así como influencias ambientales (Hartley *et al*, 2014; Parmentier *et al*, 2016).

Tratamiento contra leishmaniasis: mecanismo de acción de Sb^V , factores asociados a falla terapéutica y vínculo con la presencia de LRV y la respuesta adaptativa de *Leishmania* a estímulos de estrés oxidativo/nitrosativo

Mecanismo de acción de Sb^V

El tratamiento de primera línea para leishmaniasis se basa en antimoniales pentavalentes (Sb^V). La forma pentavalente de los antimoniales es reducida a su forma trivalente (Sb^{III}) más activa tanto por los macrófagos como por los amastigotes. Así, los antimoniales son una droga con efecto dual: de un lado Sb^V potencia la actividad microbicida de los macrófagos (Mookerjee *et al*, 2006) y, de otro lado, Sb^{III} tiene actividad leishmanicida directa sobre los parásitos (Wyllie *et al*, 2004). Se ha demostrado que los antimoniales activan vías de señalización importantes de las células del sistema inmune del hospedero para inducir la producción de ROS y NO que, finalmente, matan a los parásitos intracelulares (Haldar *et al*, 2011). El estibogluconato de sodio (SSG), un compuesto orgánico de Sb^V , inhibe a la fosfatasa SHP1, lo cual favorece indirectamente la fosforilación de tirosina de PI3K. Esto beneficia la activación de las vías PI3K-PKC-Ras/Raf-ERK1/2 y PI3K-Akt-p38 MAPK para la generación de ROS y NO respectivamente (Mookerjee *et al*, 2006).

El Sb^{III} metabolizado por el macrófago ingresa al parásito por la aquagliceroporina 1 (AQP1), y el Sb^V ingresa mediante un receptor no conocido (siendo metabolizado a Sb^{III} por el amastigote) (Gourbal *et al*, 2000), siendo Sb^{III} responsable de la inhibición de la enzima tripanotión reductasa (TryR), la cual es indispensable para mantener el balance redox de *Leishmania*.

Falla terapéutica con antimoniales: rol de la especie de parásito y factores del hospedero humano

En LC la respuesta al tratamiento no es predecible. Se sabe que aislados primarios de *Leishmania* provenientes de pacientes no tratados presentan variabilidad en su susceptibilidad a *Sb^V* y las chances de un paciente con LC de responder al tratamiento disminuyen cuando hay recaídas después de un tratamiento inicial con *Sb^V* (Bryceson *et al*, 1985). Asimismo, el desarrollo de la LMC es impredecible y difícil de tratar. Frecuentemente, pacientes que sufren de esta enfermedad presentan falla al tratamiento (*Sb^V*). Los factores involucrados en la falla terapéutica no están bien entendidos. Estudios muestran que diversos factores del parásito y del hospedero humano están asociados con la falla terapéutica, entre estos: la especie infectante de *Leishmania* [siendo la infección por *Leishmania braziliensis* la que está asociada a un mayor riesgo de falla terapéutica con antimoniales en pacientes con LC en Perú; (Arévalo *et al*, 2007)]; la edad del paciente; el número de lesiones (Llanos-Cuentas *et al*, 2008); la presencia de lesiones distantes (Valencia *et al*, 2012); y coinfecciones con helmintos (O'neal *et al*, 2007; Unger *et al*, 2009). A nivel de Latinoamérica se han reportado tasas de falla terapéutica de hasta 39% en LC (Arévalo *et al*, 2007).

Falla terapéutica con antimoniales y vínculo con la presencia de LRV y la respuesta adaptativa de Leishmania a estímulos de estrés oxidativo/nitrosativo

En un estudio colaborativo reciente, el grupo de investigación en *Leishmania* del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt-UPCH exploró el rol de LRV1 en leishmaniasis tegumentaria humana. La presencia de LRV1 en aislados de *L. braziliensis* estuvo asociada significativamente con un mayor riesgo de falla terapéutica a Sb^V (Adaui *et al*, 2016). De manera similar, en un estudio paralelo realizado en Guyana Francesa, la presencia de LRV1 en aislados de *L. guyanensis* estuvo asociada con un incremento en el riesgo de falla terapéutica y recaídas sintomáticas frente al tratamiento con pentamidina (Bourreau *et al*, 2016). Estos estudios demostraron que la asociación de LRV1 con falla terapéutica no fue debida a una resistencia intrínseca del parásito a las drogas antimoniales o pentamidina. En conjunto, estos hallazgos sugieren que LRV1 interfiere con la eficacia de las drogas antileishmaniales a través de la activación perjudicial del sistema inmune del hospedero humano y a través de un efecto potenciador de la virulencia y persistencia de parásitos de *Leishmania* portadores del virus. La asociación de LRV1 con falla terapéutica encontrada en ambos estudios abre el camino para guiar futuras investigaciones en enfoques terapéuticos más efectivos para leishmaniasis tegumentaria causada por estas dos especies de *Leishmania*.

Vanaerschot *et al*. (2010) realizaron estudios en *L. donovani* donde se evaluó la capacidad de tolerancia frente a estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo de cepas tanto resistentes como sensibles al tratamiento con SSG *in vitro*. Se encontró que aquellas cepas resistentes al tratamiento con SSG presentaron mejor

capacidad para tolerar diferentes estímulos de estrés *in vitro*, lo que les permitió mayor supervivencia como promastigotes y amastigotes comparadas con las cepas sensibles a SSG. Aquí, la resistencia *in vitro* de los parásitos frente al SSG se encontró asociada a la tolerancia a estrés generado por el macrófago sobre el amastigote intracelular (Vanaerschot *et al*, 2010).

Consistente con ello, un estudio realizado en Brasil demostró que aislados de *L. braziliensis* provenientes de pacientes refractarios al tratamiento con *Sb^V* fueron más resistentes a NO que parásitos aislados de pacientes que curaron al tratamiento (62.5% vs. 25% respectivamente) (Souza *et al*, 2010). También, aquellos parásitos resistentes a NO, provenientes de pacientes que presentaron falla terapéutica, establecieron una mejor infección en macrófagos *in vitro* e indujeron una menor producción de moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) –el cual desempeña la función de activar a los macrófagos para la producción de NO (Souza *et al*, 2010). Finalmente, en modelos murinos, se determinó que infecciones con parásitos resistentes a *Sb^V* y a NO (*Sb^V*-NO-R) produjeron lesiones más grandes, que curaron más lentamente que aquellas infecciones con parásitos susceptibles (*Sb^V*-NO-S) (Costa *et al*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, Acestor *et al* demostraron que parásitos con capacidad metastásica presentaron mayor actividad peroxidasa, lo cual les conferiría una mejor tolerancia al estrés oxidativo generado dentro del macrófago. Del mismo modo, Ives *et al* demostraron la presencia de LRV en parásitos principalmente metastásicos. Esto lleva a una interrogante: ¿La presencia de LRV

en parásitos de *Leishmania* tendrá alguna relación con la tolerancia de los parásitos a estrés tanto oxidativo como nitrosativo?

Otros modelos virus-parásito y su asociación con la progresión de la enfermedad

Entre aquellos parásitos infectados por virus de dsRNA, *Trichomonas vaginalis* es uno de los más estudiados debido a su dispersión y prevalencia mundial. Este es un parásito extracelular obligatorio que infecta el tracto genitourinario humano y es la causa más común de vaginitis y problemas del tracto reproductivo (Fichorova *et al*, 2012). El virus de *Trichomonas vaginalis* (TVV) parece estar más relacionado con los virus que infectan al género *Leishmania*, que a aquellos que infectan al género *Giardia* (Fraga *et al*, 2012).

Existe evidencia de que la presencia de TVV está asociada con la expresión diferencial de proteínas en el parásito, lo cual le confiere mayor virulencia. Se ha demostrado que aquellos parásitos que portan el virus tienen cambios fenotípicos en la proteína inmunogénica P270 (proteína de membrana o citoplásmica), así como cambios en su expresión (Khoshnan y Alderete, 1994). Se considera que, en general, la presencia del virus altera la cantidad y composición de proteínas totales en el parásito. Asimismo, se ha hipotetizado que el virus podría influenciar en la presencia de una reductasa en *T. vaginalis* responsable de la reducción del metronidazol (tratamiento convencional para tricomoniasis) y su consecuente sensibilidad (Heidary *et al*, 2013).

Fichorova *et al* estudiaron el rol de TVV en la respuesta inmune involucrada en la enfermedad y su asociación con la falla terapéutica. Demostraron que el virus endosimbionte, que es altamente prevalente en aislados de *Trichomonas vaginalis*,

es sentido por las células del epitelio reproductivo vía el TLR3, activando cascadas proinflamatorias que han sido implicadas previamente en parto pre-término y susceptibilidad a VIH. Asimismo, se demostró que el tratamiento con metronidazol amplificaba estas respuestas inflamatorias ya que al matar al parásito se favorece la liberación del virus y su posterior reconocimiento por el TLR3. Esto refleja la necesidad de un tratamiento antiviral junto con la terapia convencional contra la enfermedad (Fichorova *et al*, 2012).

Estos ejemplos evidencian que los virus de dsRNA que infectan protozoarios patógenos son capaces de modular procesos tanto en su hospedero protozoario como en el hospedero humano relacionado principalmente con la falla terapéutica.

Objetivo de la investigación

La importancia del estrés oxidativo y nitrosativo en el control de la infección por *L. braziliensis* no está bien entendida hasta el momento y mucho menos el impacto de LRV1. En este trabajo se hipotetiza que la presencia del virus influye en el fitness y la virulencia de las cepas de *Leishmania* portadoras, confiriéndoles mayor capacidad para sobrellevar el estrés oxidativo y nitrosativo generado en el ambiente del macrófago. Al no contar con líneas isogénicas de *L. braziliensis* LRV+ y LRV-, este estudio se enfocó en aislados clínicos de este parásito. Se propuso evaluar la asociación entre la presencia del virus LRV1 y la tolerancia de aislados clínicos de *L. braziliensis* a estímulos de estrés tanto oxidativo como nitrosativo (*Sb^V*, antimonio trivalente-*Sb^{III}* y SNAP-donante de NO). Como marcador de la viabilidad celular se determinó los niveles de tripanotión reductasa (enzima que cumple un rol esencial en el metabolismo redox y la defensa antioxidante de *Leishmania*) presentes en los aislados LRV1+ y LRV1- en ausencia y presencia de estímulos de estrés.

En este estudio no fue posible hacer correlaciones entre los resultados de tolerancia a estrés *in vitro* de los aislados de *L. braziliensis* con el resultado clínico del tratamiento (cura o falla terapéutica) de los pacientes de quienes provienen los aislados, debido a que: i) la información del desenlace clínico del tratamiento no fue documentada en varios casos, ii) los factores influyentes en la falla terapéutica en humanos son muy variados y complejos, y iii) hay el potencial que el virus LRV1 se pierda durante la axenización de los parásitos en condiciones *in vitro* (durante la manipulación de promastigotes y amastigotes axénicos) [Stephen M. Beverley, Department of Molecular Microbiology,

Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri; comunicación personal].

Finalmente, este estudio solo abordó parte de la potencial influencia de la presencia de LRV en el parásito, más no sobre el macrófago. Como se mencionó en secciones anteriores, hay evidencia de que la presencia del virus en parásitos de *Leishmania* influye en la respuesta del macrófago en la infección. Sin embargo, nuestro modelo se enfocó únicamente en el parásito.

VI. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

VI.I Hipótesis

Los aislados clínicos de *L. braziliensis* infectados naturalmente con el virus ARN de *Leishmania* (LRV1+) presentan mayor tolerancia ante estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo (evidenciado por un IC₅₀ mayor para las drogas a probar) comparado con aislados del parásito que no albergan al virus (LRV1-).

VI.II Objetivos

VI.II.I Objetivo General

- Determinar la potencial asociación entre la presencia de LRV1 y la tolerancia de aislados clínicos de *L. braziliensis*, en el estadio amastigote intracelular, a estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo.

VI.II.II Objetivos Específicos

- Seleccionar aislados de *L. braziliensis* infectados naturalmente con el virus (LRV1+) y otros que no lo tengan (LRV1-), así como cepas control susceptible (M2903) y resistente (PER104) a las dos formas de antimonio a probar.
- Confirmar la condición de infección por LRV1 y determinar los niveles relativos de transcritos virales de los aislados de *L. braziliensis*.
- Determinar la concentración citotóxica al 50% (CC₅₀) de cada droga sobre macrófagos peritoneales de ratón, con el fin de determinar la concentración de droga a usar en los ensayos de tolerancia a estrés, de

modo que no afecte a la célula hospedera en el modelo *in vitro* amastigote-macrófago.

- Determinar la razón (ratio) de infección (macrófago: amastigote axénico) a usar para obtener un porcentaje de infección mayor o igual al 80%.
- Implementar y validar un ensayo colorimétrico basado en TryR, en amastigotes intracelulares.
- Calcular la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) de los estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo sobre amastigotes intracelulares de los aislados de *L. braziliensis*.
- Analizar los datos generados, incluyendo las variables de infectividad, los valores de IC₅₀ de cada droga/estímulo para cada aislado, los porcentajes de inhibición del crecimiento de los parásitos frente a la concentración máxima de droga usada, y la actividad basal de TryR en ausencia de drogas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.I) POBLACIÓN Y MUESTRA: SELECCIÓN DE AISLADOS DE *LEISHMANIA*

Se seleccionó aislados clínicos de *L. braziliensis* peruanos, provenientes de zonas endémicas de leishmaniasis, correspondientes a dos estudios previos: LeishBolPe, un estudio epidemiológico en Bolivia y Perú (aislados del distrito de Pilcopata en la región de Paucartambo, Cusco – colectados en el año 1991) y LeishNatDrug-R, un estudio sobre la falla al tratamiento con antimoniales (Junín y Madre De Dios – colectados en los años 2001 a 2004) [ambos estudios financiados por la Comisión Europea: LeishBolPe -contrato ERBIC18CT960123- y LeishNatDrug-R -contrato ICA4CT200110076-]. La condición de infección por LRV1 de los aislados fue determinada previamente (Adaui *et al*, 2016) y confirmada en este estudio. Estos aislados son mantenidos en el criobanco del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Tripanosomátidos, en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTA_{vH})-UPCH. Se analizó 5 aislados LRV1+ y 5 aislados LRV1-. Asimismo, se incluyó una cepa control susceptible y otra resistente natural para Sb^V y Sb^{III}.

VII.II) CULTIVO CELULAR DE *LEISHMANIA IN VITRO*:

VII.II.I) *Cultivo de promastigotes*

Se descongeló un vial de la cepa a trabajar y se colocó los parásitos en medio bifásico: agar sangre y medio líquido M199 (Sigma) a pH 7.4 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowhittaker), 1% de L-glutamina (L-Glut) y antibióticos (100U/mL penicilina y 100µg/ml estreptomina, Biowhittaker) [medio completo]. Se requieren entre 2 a 4 pasajes en este medio para la adaptación de los parásitos. Finalmente, se diluyeron los parásitos a una concentración de 5×10^6 parásitos/mL en medio monofásico [(medio completo M199 pH 7.4 (10% SFB + L-Glut + antibióticos)]. Se cultivaron los parásitos por 4 días en la incubadora a 23 °C.

VII.II.II) *Obtención de cultivo de amastigotes axénicos*

Para la transformación de promastigotes de fase estacionaria a “amastigotes-like” axénicos se siguieron los siguientes pasos: A los 4 días del cultivo en medio monofásico, se centrifugaron los parásitos a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Se resuspendió el pellet en medio completo M199 a pH 5.5 + 20% SFB + L-Glut + antibióticos (en las proporciones arriba mencionadas). Se colocaron los parásitos en la incubadora a una temperatura de 34°C y ambiente húmedo al 5% de CO₂, por 4 días. Esta temperatura (simula la temperatura de la piel corporal, lo cual es importante en ensayos con *Leishmania* que tienen tropismo cutáneo tales como *L. braziliensis*) y el pH ácido del medio indujeron la transformación de

promastigotes a formas “amastigote-like” axénicos, los cuales poseen mayor infectividad en comparación con promastigotes de fase estacionaria (Puentes *et al*, 2000).

VII.II.III) Curva de crecimiento de Leishmania braziliensis

Para el desarrollo de la curva de crecimiento se sembró 5×10^6 parásitos/mL de la cepa de referencia M2903 en 5 mL de medio monofásico (M199 completo, 10% SFB y 1% L-Glut) en 2 frascos de 25 mL. Cumplidas 24 horas de la siembra de los parásitos, se procedió a tomar una alícuota de 100 μ L del cultivo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se expuso a vórtex para disgregar los parásitos y se hicieron diluciones 1/10 y 1/100 en solución salina a pH 7 para un mejor conteo de los parásitos. Se tomó 10 μ L de la dilución de preferencia (ésto asegura que no haya saturación de parásitos por cuadrante, lo cual dificulta la estimación real del número de parásitos presente), y se colocó en una cámara de Neubauer. Seguido a ésto, se contó el número de parásitos presente por cuadrante, en los cuatro cuadrantes de la cámara. Para el cálculo del número de parásitos en el cultivo, se sacó el promedio de los 4 cuadrantes contados, multiplicando este número por el factor de dilución (10 ó 100 dependiendo de la dilución empleada) y por el factor de la cámara de Neubauer (10^4). Este procedimiento se repitió cada 24 horas por 7 días.

VII.III) DETERMINACIÓN DE NIVELES RELATIVOS DE TRANSCRITOS VIRALES

Los niveles relativos de transcritos virales de LRV1 fueron medidos usando transcripción reversa seguida de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

VII.III.I) EXTRACCIÓN DE ARN

VII.III.I. I) Preparación de muestras para la extracción de ARN

Se cosechó un número aproximado entre 10^7 y 10^8 promastigotes de *Leishmania* en fase estacionaria (en esta fase del ciclo de crecimiento/diferenciación del parásito se ha reportado la mayor cantidad de transcritos virales; Chung *et al*, 1998) de cada cepa a utilizar. Los parásitos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C (Eppendorf 5417R). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó en PBS frío 3 veces si los parásitos estuvieron en medio bifásico; o 1 vez si estuvieron en medio monofásico. Se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS frío y se transfirió el contenido a tubos para microcentrífuga libres de RNAsas. Se realizó una última centrifugación a velocidad máxima (14000 rpm) por 10 minutos, a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en Trizol (Invitrogen) o en un buffer de lisis para ARN (Kit GeneJet RNA Purification Kit, Thermo Scientific), dependiendo del método de extracción a usar.

Si se usó Trizol, para cada pellet se añadió 1 mL de Trizol y se pipeteó hasta homogenizar la muestra. Si se usó el buffer de lisis del Kit, se añadió 20 μ L de β -mercaptoetanol 14.3 M previamente, por cada 1 mL de buffer de lisis. El pellet se

resuspendió en 600 μ L de buffer de lisis con β -mercaptoetanol. Esta muestra homogenizada se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Las muestras se guardaron hasta 1 mes a -70 °C o se procedió inmediatamente con la extracción de ARN.

Para la cuantificación de los niveles relativos de transcritos virales en amastigotes axénicos se transformó un cultivo de promastigotes a amastigotes axénicos (como descrito en la sección VII.II.II) y se cosechó un número aproximado entre 10^7 y 10^8 , los cuales fueron manipulados como se describe en párrafos anteriores de esta sección, manteniendo siempre una temperatura de 4°C , para preservar la integridad de los ácidos nucleicos.

Para la cuantificación de los niveles relativos de transcritos virales en el estadio amastigote intracelular, con el mismo cultivo de amastigotes axénicos se infectó macrófagos peritoneales de ratón en un ratio de 1:10, como se describe en la sección VII.IV.II, en frascos de 50 mL. Después de 48 horas de infección se eliminó el sobrenadante, se agregó 4 mL de medio M199 completo pH 7.4 frío, se realizó un lavado de la superficie del frasco para eliminar las células no adheridas y se descartó este medio. Luego, se agregó nuevamente 4 mL de medio M199 completo fresco frío y se hizo un raspado en toda la superficie del frasco donde están adheridos los macrófagos con un Cell Scrapper (Corning) varias veces. Con ayuda de una jeringa con aguja # 26G x $\frac{1}{2}$ " se tomó el volumen de medio del frasco y transfirió a un tubo Falcon de 15 mL. Aquí se realizó pipeteo "up and down" (tomar y botar) con la jeringa con el fin de romper por fuerza mecánica los macrófagos para liberar su contenido (amastigotes). Luego se quitó la aguja, se la

cambió por una 29G x ½” y se repitió el procedimiento 4 veces. La aguja 29G es más fina y por lo tanto no daña a los amastigotes liberados de los macrófagos. Se repitió este procedimiento añadiendo 4 mL más de medio al frasco de cultivo de los macrófagos. Una vez obtenidas todas las células, el contenido del tubo Falcon de 15 mL se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomó el precipitado para el resto de procedimientos.

VII.III. I. II) Extracción de ARN por el método de Fenol-cloroformo (Trizol)

Una vez descongelados los lisados de las muestras, se añadió 0.2 ml de cloroformo por 1 mL de Trizol. Se agitó vigorosamente por 18 seg y se dejó incubar los tubos a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego, se centrifugó a 13000 r.p.m. por 15 min a 4°C. Con este paso, la mezcla bifásica es separada en una fase inferior orgánica (fenol/cloroformo) de color rojo, donde quedan las proteínas; una interfase blanquecina (correspondiente al ADN) y una fase superior acuosa incolora donde permanece el ARN. El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un tubo limpio (libre de RNAsas, esterilizado por autoclave). El ARN se precipitó con un volumen de isopropanol de 0.5 mL por cada 1 mL de Trizol y se mezcló por inversión. Se dejó la mezcla a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. por 10 min a 4°C. El precipitado conteniendo el ARN se lavó con 1 ml de una solución de etanol al 75% por cada 1 mL de Trizol. Se mezcló bien con pequeños golpes. Se centrifugó a 7,500 r.p.m. por 5 min a 4°C. El etanol se eliminó por decantación. El ARN se secó brevemente (5-10 min) a

temperatura ambiente (y con papel toalla), y luego se resuspendió en 10-30 μ l de agua grado molecular (dependiendo si se observó el pellet o no, y del tamaño del pellet) y se incubó por 10 min a 55-60°C para una completa disolución del mismo. El ARN se conservó a -80 °C.

VII.III.I.III) Extracción de ARN mediante GeneJet RNA Purification Kit (ThermoScientific)

Una vez descongeladas las muestras, se añadió 450 μ L de etanol absoluto al lisado de células y se mezcló por pipeteo. Se transfirió hasta 700 μ L del lisado a la columna de purificación, insertada en un tubo de colección (1). Se centrifugó la columna por 1 minuto a velocidad mayor o igual a 11000 rpm (2). Se descartó el líquido filtrado y se puso la columna nuevamente en el tubo de colección (3). Se repitieron los pasos 1, 2 y 3 hasta que todo el lisado haya sido transferido a la columna y centrifugado. Se descartó el tubo de colección que contenía el filtrado de la última centrifugación. Se posicionó la columna en un nuevo tubo de colección de 2 mL. Se añadió 700 μ L de buffer de lavado 1 (Wash Buffer 1, suplementado con etanol) a la columna de purificación. Se centrifugó por 1 minuto a velocidad mayor o igual a 11000 rpm. Se descartó el filtrado y se puso la columna nuevamente en el tubo de colección. Se añadió 600 μ L de buffer de lavado 2 (Wash Buffer 2, suplementado con etanol) a la columna de purificación. Se centrifugó por 1 minuto a velocidad mayor o igual a 11000 rpm. Se descartó el filtrado y puso la columna nuevamente en el tubo de colección. Se añadió 250 μ L de buffer de lavado 2 a la columna de purificación. Se centrifugó por 2 minutos a

velocidad mayor o igual a 11000 rpm. Para evitar la presencia de residuos de la solución en la columna, se descartó el filtrado y centrifugó a máxima velocidad por un minuto. Se descartó el filtrado y se puso la columna en un tubo de 1.5 mL estéril para microcentrífuga, libre de RNAsas (incluido en el Kit). Se añadió de 20-50 µl de agua libre de nucleasas (50 µl para números de parásitos mayores a 10^8) al centro de la membrana de la columna. Se centrifugó por 1 minuto a velocidad mayor o igual a 11000 rpm para eluir el ARN. Se descartó la columna de purificación. El ARN se conservó a -80°C .

VII.III.II) Cuantificación de ARN (Quant-it Kit RNA-BR)

Se utilizó el kit de cuantificación de ARN de rango amplio (Quant-it Kit RNA-BR). Para preparar la solución de trabajo se mezcló 199 µL del buffer con 1 µL de fluoróforo en cada tubo y se homogenizó mediante vórtex. Luego, se eliminó 1 µL de la mezcla si se iba a añadir muestra; o se eliminó 10 µL de la mezcla si se iba a colocar el estándar. Finalmente, se agregó la muestra (1µL) o estándar (10 µL) dependiendo del rótulo del tubo. Se homogenizó bien mediante vórtex e incubó en oscuridad por 10 minutos todos los tubos antes de realizar las mediciones.

Se usó el equipo Qubit para realizar las cuantificaciones.

VII.III.III) Electroforesis en gel de agarosa para ARN

Finalmente, se cuantificó el ARN y se hizo el control de integridad de este mediante electroforesis en gel de agarosa. Se usó como buffer de corrida al buffer MOPS 0.5X (MOPS 0.2M, acetato de sodio 50mM y EDTA 10mM, pH 7) y se preparó un gel de 30 mL de agarosa al 1.5% (en buffer MOPS 1X, 3 μ L de REDGel-BIORAD-alternativa al bromuro de etidio que tiñe las moléculas en el gel y permite su detección). La corrida duró 45 minutos, a 100 Voltios (con una corrida inicial a 5 Voltios por 10 minutos para asegurar que las muestras ingresen al gel). Se empleó 1 μ L de buffer de carga (60% formamida deionizada, 1.15M formaldehído, 100 μ g/ml de azul de bromofenol en buffer MOPS 1.25x) por cada muestra, las cuales fueron previamente calentadas a 65°C por 10 minutos para desnaturalizar al ARN.

VII.III.IV) Tratamiento del ARN con DNAsa

El Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) usado contiene 3 reactivos: La enzima DNAsa, el buffer y una solución de stop. Se prepararon reacciones de 10 μ L en tubos de PCR estériles (libres de RNAsas), siguiendo las siguientes especificaciones (Tabla 1):

Componente	Concentración Inicial	Volumen	Concentración Final
ARN	Ideal: 180 ng/ μ L	6 μ L (puede ir de 1-8 μ L)	1 μ g
RQI RNase-DNase buffer	10X	1 μ L	1X
RQI RNase-free DNase	1 U/ μ L	1 μ L	1 Unidad por 1 μ g de ARN
H ₂ O	-	2 μ L (Hasta 10 μ L)	-
Total Rx	-	10 μ L	-

Tabla 1.- Componentes de reacción de tratamiento de ARN con DNAsa

Después de agregar todos los componentes en microtubos de PCR (previamente expuestos a luz UV), se llevó los tubos al termociclador, a una temperatura de 37 °C por 30 minutos. Una vez terminado el tiempo, se añadió 1 μ L de la solución de Stop a cada tubo, para terminar la reacción. Se colocó nuevamente los tubos en el termociclador a 65 °C por 10 minutos para inactivar la DNAsa. Finalmente, se añadió todo o una porción del ARN tratado a una reacción de transcripción reversa.

VII.III.V) Transcripción reversa para obtención de cDNA

Para este procedimiento se usó el Kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” (Roche). Primero se generó stocks de ARN a concentración 100 ng/ μ L. Luego, se añadió los siguientes componentes a tubos de PCR estériles libres de RNAsas (Tabla 2):

Componente	Volumen	Concentración Final
ARN total	Hasta 11 μL	1 μg (1000 ng) de ARN total
Primers (random hexamers) 600 pmol/ μL (vial 6)	2 μL	60 μM
TRT Reaction Buffer, 5 \times conc. (vial 2)	4 μL	1X (8 mM MgCl_2)
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ μl (vial 3)	0.5 μL	20 U
Mix de deoxinucleótidos Mix, 10 mM cada uno (vial 4)	2 μL	1mM cada uno
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/ μl (vial1)	0.5 μL	10 U
Agua, grado PCR (vial 7 o 9)	Hasta completar 20 μL	-
REACCIÓN FINAL	20μL	-

Tabla 2.-Componentes de reacción de transcripción reversa

Se mezcló los componentes en el tubo cuidadosamente. Se centrifugó brevemente el tubo para coleccionar las muestras en el fondo del tubo. Luego se colocaron los tubos en el termociclador con la tapa calentada (para evitar evaporación).

El ciclamiento de acuerdo a los primers usados (random hexámeros) y tamaño del ARN diana (> 4 kb) fue de 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C. El cDNA obtenido se almacenó a 4 °C por 1-2 horas o, por tiempos mayores, a -20 °C. Se incluyeron controles conteniendo la misma cantidad de

ARN, pero sin transcriptasa reversa, para excluir contaminación con ADN genómico.

VII.III.VI) PCR cuantitativo en tiempo real

Se empleó el instrumento LightCycler 480 (Roche) y el protocolo de “Fast Start DNA Master SYBR Green” (Roche). Se realizó la amplificación de dos genes en paralelo: el gen codificante para la proteína de la cápside de LRV1 y el gen codificante para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*) del parásito *Leishmania*. Después de la reacción de transcripción reversa, se tomó 18 µL de esta reacción (aproximadamente 1µg de cDNA) y se disolvió en 162 µL de agua grado molecular; para crear una dilución 1/10 del cDNA. Luego, se tomó 10 µL de la dilución 1/10 y se disolvió en 90 µL de H₂O; para obtener diluciones 1/100 del cDNA de cada muestra.

Con el fin de cuantificar la cantidad relativa de transcritos virales y de *G6PD* (resultados expresados como transcritos LRV1/*G6PD*), se preparó una curva estándar para cada gen a amplificar. Las curvas estándar cubren el rango de 10 copias a 1 millón de copias por reacción, para ambos casos. Para la construcción del estándar de LRV1 (preparado por Marlene Jara en una investigación previa de nuestro grupo –datos no publicados), el cDNA de la cepa *Leishmania guyanensis* MHOM/BR/75/M4147 (LRV1+) fue amplificado usando los primers descritos por Ogg *et al*: LRVF 5'-GAG TGG GAG TCC CCC ACA T-3' y LRVR 5'-TGG ATA CAA CCA GAC GAT TGC T-3' (Ogg *et al*, 2003). Los productos de PCR fueron clonados en el sistema pGEM®-T Easy Vector System (Promega). El plásmido fue aislado con el Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) y

luego linearizado con la enzima de restricción *ApaI*. Una vez linearizado, fue purificado y usado para la preparación de las curvas estándar. Para obtener la curva estándar para el gen *G6PD* se procedió del mismo modo; se usó un plásmido pGEM-T Easy conteniendo la secuencia completa del ORF de *G6PD* de especies de *L. (Viannia)* (el plásmido fue gentilmente proporcionado por Lucile Maria Floeter-Winter, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil) y los primers Forward: 5'-TTGATCACTGGTACATGCATTAAG-3' y Reverse: 5'-CTCGTCCAGAATGCAGCAC-3', los cuales amplifican un segmento de 101 pb del gen *G6PD* (Moreno *et al*, 2008; Jara *et al*, 2013).

Para obtener los 6 puntos de cada curva, se tomó alícuotas de 10 µL de los estándares de ADN correspondientes al gen de la cápside de LRV1 o a *G6PD* y se diluyó en 90 µl de agua grado molecular. Éste correspondió al primer punto de la curva (1 millón de copias). A partir de éste, se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 10, para obtener los 5 puntos restantes de la curva. Se usaron los mismos volúmenes y concentraciones de cada componente para los análisis de LRV como para *G6PD*. También, las condiciones de ciclamiento fueron las mismas para las dos reacciones.

Componente	Volumen	Concentración final
DNA Master SYBR Green I (2X)	12.5 µL	1X
Primer Forward	0.5 µL	0.4 µM
Primer Reverse	0.5 µL	0.4 µM
ADN molde*	5 µL	Se reemplaza con 5 µL de agua en control negativo**
H ₂ O grado PCR	6.5 µL	-
Rx Total	25 µL	-

Tabla 3.- Componentes de reacción de PCR en tiempo real. *El ADN molde proviene de una dilución 1/100 del producto de la reacción de transcripción reversa (RT). Se añade luego de haber preparado el Master Mix. **Control Negativo: para detectar contaminación con ADN. Se reemplaza el ADN molde por agua grado PCR.

Etapa		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización Inicial del ADN y Activación de Fast Start DNA polymerase		3 minutos	95 °C
PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	15 segundos	95 °C
	Hibridización (Annealing)	20 segundos	62 °C
	Extensión/cuantificación de fluorescencia	10 segundos***	72 °C

Tabla 4.- Condiciones de ciclamiento de reacción de PCR en tiempo real.

***Tiempo de extensión: ([pb amplicón]/ 25) segundos ó 1 min/kb.

Una vez que se tuvo preparado el Master Mix, se pipeteó despacio para homogenizar. Se dispensó 20 µL de la mezcla a cada pozo a usar en la placa de PCR en tiempo real. Luego, se añadió 5 µL de cDNA de muestra, controles positivos, controles sin RT, y diluciones de curva estándar en los pozos respectivos. Para el blanco se añadió 5 µL de H₂O.

Una vez que se llenó la placa, se cubrió con las láminas sellantes para placas de PCR. Se centrifugó brevemente la placa para asegurar que el contenido de los pozos esté al fondo. Para la cuantificación de la fluorescencia emitida se hizo uso del equipo LightCycler 480 (Roche).

La generación de los productos de PCR fue detectada mediante la señal de fluorescencia emitida por el fluoróforo SYBR Green, el cual se intercala en la doble hélice del ADN. Durante el PCR, el incremento en la fluorescencia emitida

es directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble hebra generado. Los datos obtenidos del número de ciclo de PCR en que la fluorescencia de una muestra supera la señal de fondo o “Cq” (del inglés “quantification cycle” – nomenclatura estándar equivalente al Ct o ciclo umbral) fueron convertidos a niveles relativos de transcritos gracias a las curvas estándar generadas de número de copias, tanto para LRV como para *G6PD*.

VII.IV) INFECCIONES DE MACRÓFAGOS

VII.IV.I) Obtención de macrófagos peritoneales de ratón

Para este procedimiento es necesario tener material de disección esterilizado, una jeringa con agujas 21G y 26G NIPRO, placa Petri estéril expuesta a -20°C hasta el momento de la extracción de los macrófagos (aproximadamente 30 minutos). Se aplicó el método de asfixia para sacrificar los ratones y así evitar hemorragias. Inmediatamente después, se los puso sobre la tabla de disección y se fijaron sus extremidades con agujas ancladas a la tabla. Se roció alcohol en cada ratón para evitar contaminación de la muestra a ser extraída. Se procedió a realizar un corte superficial (solo la piel) en la zona abdominal, para poder acceder al peritoneo. Se desprendió la piel del músculo con ayuda de las tijeras y pinzas. Una vez que se accedió al peritoneo, se inyectó 4 mL de medio M199 completo pH7.4 (10% SFB, 1% L-Glut) refrigerado, con la aguja 26G (para evitar crear un orificio por donde el medio pueda escaparse). Se hizo masajes al peritoneo para desprender las células residentes. Finalmente, se absorbió el medio con la jeringa con aguja 21G. Las células fueron colocadas en la placa Petri fría (la que estuvo mantenida a -

20°C), dentro de la cabina de flujo laminar, para ser dispensadas luego en placas de 96 pozos.

VII.IV.II) Obtención de amastigotes intracelulares

Los macrófagos peritoneales fueron extraídos de ratones BALB/c (de 7 a 8 semanas de edad) usando medio completo M199 a pH 7.4 (10% SFB, L-Glut y antibióticos), como se describió en la sección anterior (VII.IV.I), e incubados a 37°C y 5% CO₂ .

En una placa de 96 pozos se colocaron laminillas de 4x4 mm (previamente esterilizadas) en cada pozo, con el fin de que los macrófagos a sembrar se adhieran en ellas y sea posible la visualización de las células en el microscopio al finalizar el experimento. Se sembró en cada pozo 100 µL del medio que contenía a los macrófagos. Simultáneamente, se tomó una alícuota de 95 µL del medio con macrófagos y 5µL de Rojo neutro (colorante). Se mezcló bien en un tubo Eppendorf de 1.5 mL e incubó a 37 °C por 15 minutos. Pasado este tiempo, se leyó en una cámara de Neubauer la cantidad de células que hayan tomado el colorante (rojas y rosadas), para estimar la cantidad de macrófagos sembrados por pozo. Después de haberse cumplido una hora de incubación de la placa, se realizaron dos lavados con medio simple a los pozos que contenían macrófagos, con el fin de eliminar células que no se hayan adherido a las laminillas. Finalmente, se agregó 100 µL de medio M199 completo fresco (M199 pH 7.4 + 10%SFB + 1% Glutamina) a cada pozo y se dejó incubar por 24 horas.

Al día siguiente de la extracción de los macrófagos, se realizó la infección con el cultivo de amastigotes axénicos obtenido previamente. Primero, se cambió el medio de cultivo de la placa usando 50 μL de medio completo fresco en cada pozo. Se incubaron las células a 34 °C hasta el momento de la infección. Luego, los amastigotes axénicos en cultivo se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min a 21 °C. Se lavó el precipitado de parásitos con medio simple M199 a pH 7.4 y se resuspendió cada pellet con medio completo M199 (10% SFB, L-Glut y antibióticos) a pH 7.4. Se tomó una alícuota de 100 μL para el recuento de células, y evaluación de la viabilidad y morfología de los parásitos. Los tubos cónicos conteniendo los parásitos se agitaron suavemente mediante vórtex para disgregar los parásitos. Se realizaron diluciones del cultivo de amastigotes axénicos en medio completo pH 7.4 para obtener un ratio 7:1 de parásito:macrófago, añadiendo un volumen final de 50 μL de la dilución preparada a cada pozo (volumen final en el pozo de 100 μL). Una vez completadas las infecciones, se colocaron las placas a 34 °C. Luego de 4 horas de incubación, se realizaron 2 lavados con medio simple a cada pozo con el fin de eliminar aquellos parásitos que no hayan sido fagocitados por los macrófagos. Se repuso 100 μL de medio completo al finalizar los lavados. Las placas se colocaron nuevamente en la incubadora a 34°C y 5% CO_2 .

VII.IV.III) Monitoreo de tasas de infección

Se realizó el monitoreo de las tasas de infección a las 24, 48, 72 y/o 96 horas después de la infección, dependiendo del experimento. Se eliminó el medio de cada pozo y las células fueron fijadas en las laminillas con metanol por 4 minutos. Luego, fueron teñidas con GIEMSA (10%) por 11 minutos. Finalmente, se realizaron 2 lavados con agua, y se dejó secar por al menos 5 horas. Una vez secas, las laminillas fueron montadas con entellán en una lámina portaobjeto con el lado que contiene a las células hacia abajo.

La cinética de infección de macrófagos se evaluó contando 100 células, para determinar: El porcentaje de macrófagos infectados (A) y el número promedio de amastigotes por macrófago infectado (B), lo que permitió calcular el índice de infección (AxB).

VII.V) ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN MACRÓFAGOS

VII.V.I) Preparación de drogas y diluciones

Las drogas usadas fueron: tartrato de antimonio y potasio trihidratado (Sb^{III} -SIGMA), antimoniato de meglumina (Sb^V -Glucantime) y S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP-SIGMA); así como la droga de referencia Anfotericina B (SIGMA). El stock de Sb^{III} fue preparado en agua a una concentración final de 4 mg/mL. El stock de Anfotericina B fue preparado en DMSO a una concentración final de 1mM (la concentración final de DMSO en los pozos conteniendo la

concentración más alta de droga probada no superó el 1%). El stock de *Sb^V* (antimoniato de meglumina-Glucantime ampollas) viene listo a una concentración de 300 mg/mL y fue proporcionado por el Dr. Alejandro Llanos Cuentas (Jefe del Grupo Clínico de Estudios de Leishmaniasis y Malaria, IMTA^vH-UPCH). El stock de SNAP fue preparado inmediatamente antes de su uso en los ensayos, en M199 completo a una concentración de 6.059 mM. Todos los stocks de drogas fueron filtrados para asegurar su esterilidad y almacenados a -20°C. Para cada ensayo, cada compuesto es diluido a la concentración apropiada usando medio M199 completo. Se realizaron 7 diluciones seriadas (diluciones 1/2) para cada droga a probar.

VII.V.II) Ensayo de susceptibilidad a drogas en macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales de ratón fueron obtenidos como se describió en la sección V.IV.II de Materiales y Métodos. Una vez obtenidos, se sembró los macrófagos en placas de 96 pozos (100 µL por pozo) y se incubó 1 hora a 37°C y 5% CO₂. Simultáneamente, se tomó una alícuota de 95 µL de medio con macrófagos y 5µL de rojo neutro (colorante). Se mezcló bien e incubó a 37 °C por 15 minutos. Pasado este tiempo, se leyó en una cámara de Neubauer la cantidad de células que habían tomado el colorante (rojas y rosadas), para estimar la cantidad de macrófagos sembrados por pozo. Después de haberse cumplido una hora de incubación de la placa, se realizaron dos lavados con medio simple a los pozos que contenían macrófagos, con el fin de eliminar células que no se habían adherido al fondo de la placa. Finalmente, se agregó 100 µL de medio completo

fresco (M199 + 10%SFB + 1% Glutamina) a cada pozo y se dejó incubar por 24 horas.

Al día siguiente, se inocularon las drogas a analizar. Primero, se eliminó el medio de cada pozo y se reemplazó con 90 μ L de medio M199 completo fresco. La placa se puso nuevamente en la incubadora (37°C, 5% CO₂) hasta el momento de añadir las drogas. Se realizaron las diluciones de las drogas (en medio M199 completo) de tal manera que se tenga que añadir 10 μ L de cada dilución a cada pozo para obtener la concentración final deseada. A los pozos control (sin droga), se les añadió 10 μ L de medio completo. Se dejó incubar las placas a 37°C por 48 horas.

Al cuarto día del experimento, se registraron los resultados. Se añadió 20 μ L de solución estéril de bromuro de 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazolio (MTT) en PBS (concentración de 5 mg/mL) a cada pozo y se dejó incubar por 4 horas a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO₂. En este tiempo, aquellas células vivas metabolizaron el MTT, mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, el cual fue reducido a cristales insolubles de formazán. Cumplidas las 4 horas, se lisó las células con una solución de “stop” (10% SDS: 50% isopropanol, en agua) y se dejó incubar por media hora a temperatura ambiente y en un lugar sin luz, lo cual permite solubilizar los cristales formados, para luego medir la absorbancia en un espectrofotómetro (570nm).

La determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀) de cada una de las drogas usadas sobre macrófagos peritoneales de ratón se realizó mediante el análisis de regresión sigmoideal usando el programa GraphPad Prism 5 (los resultados son expresados como porcentaje de reducción en absorbancia

comparado con los pozos control). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

VII.VI) ENSAYO ENZIMÁTICO DE ACTIVIDAD DE TRIPANOTIÓN

REDUCTASA (TRYR)

El ensayo fue estandarizado en lisados de promastigotes, amastigotes axénicos y macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania braziliensis*, así como en macrófagos solos para verificar la especificidad del ensayo para *Leishmania*. Después de un lavado con PBS para remover componentes que podrían interferir con el ensayo, las muestras fueron lisadas tras una incubación por 15 min con un buffer de lisis (200 μ L/pozo) que contuvo EDTA (1 mM), HEPES (40 mM), Tris (50 mM, pH7.5) y Triton X-100 (2% vol/vol). El buffer contuvo además un inhibidor de proteasas (fenilmetanosulfonil fluoruro, a una concentración final de 1mM, inhibidor de serina proteasas) para evitar la degradación de las proteínas por proteasas endógenas. La actividad de tripanotión reductasa se midió en 75 μ L de los lisados obtenidos, dispensados en pozos de placas de 96 pozos. Secuencialmente se añadió nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH-25 μ L/pozo), tripanotión disulfuro (T[S]₂- 75 μ L/pozo), y 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB-25 μ L/pozo) para lograr concentraciones finales de 200, 75 y 100 μ M respectivamente. Se tuvo un blanco por cada muestra, que consistió en el lisado de la muestra y los componentes de la reacción mencionados, donde el sustrato T[S]₂ fue reemplazado por buffer Tris (0.05 M) a pH 7.5. Luego de una incubación de hasta 8 horas a 27°C para promastigotes y a 33°C para amastigotes axénicos e intracelulares, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412nm. La densidad óptica obtenida para el blanco fue sustraída de la señal para

cada muestra, logrando obtener la actividad de tripanotión reductasa responsable de la producción de 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB²⁻) (Van den Bogaart *et al*, 2014).

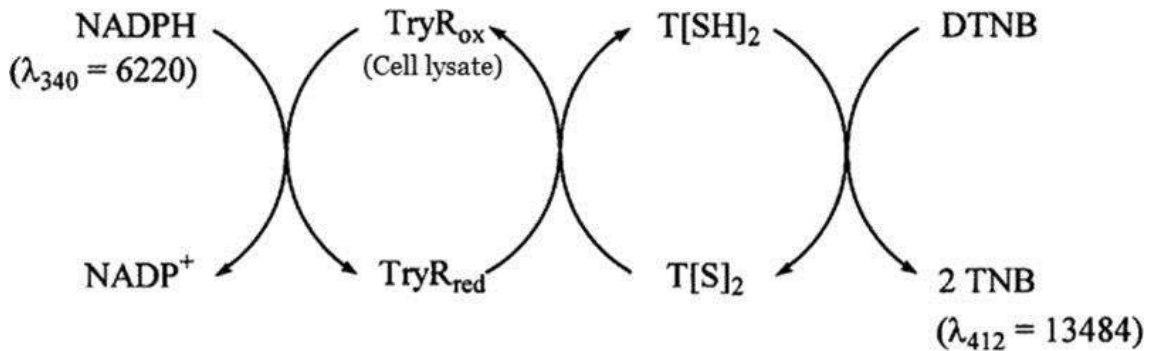


Figura 1.- Esquema de la reacción acoplada de DTNB para la determinación de la actividad de tripanotión reductasa (Van den Bogaart *et al*, 2014). Los

lisados de macrófagos infectados con amastigotes de *L. braziliensis* contendrán, en mayor o menor proporción, a la enzima tripanotión reductasa. Ésta será responsable de la reducción del sustrato, tripanotión disulfuro, el cual en su forma reducida podrá reducir al DTNB, produciendo un compuesto coloreado cuya absorbancia será registrada a 412 nm. Para que la reacción sea sostenible, el NADPH se encargará de reducir los grupos disulfuro de la enzima tripanotión reductasa y así, ésta pueda ejercer su función.

VII.VII) ENSAYOS DE ESTRÉS EN AMASTIGOTES INTRACELULARES *IN VITRO*

Para este ensayo se procedió de la misma manera descrita en la sección de “obtención de amastigotes intracelulares” (VII.IV.II). A las 24 horas de realizada la infección con el cultivo de amastigotes axénicos, se cambió el medio de cada pozo agregando 90 µL de medio completo fresco a pH 7.4. Es importante tomar una laminilla, fijar las células con metanol y teñirla con GIEMSA (10%) para la

determinación del nivel inicial de infección. Si éste es igual o mayor al 80%, entonces los cultivos infectados podrán ser expuestos a las drogas. La placa se puso nuevamente en la incubadora (34°C, 5% CO₂) hasta el momento de añadir las drogas. Se realizaron las diluciones de las drogas (en medio M199 completo) de tal manera que se tenga que añadir 10 µL de cada dilución a cada pozo para obtener la concentración final deseada (diluciones realizadas como se describió en la sección VII.V.I). Cada dilución se aplicó por triplicado. A los pozos control (sin droga) se les añadió 10 µL de medio completo. Se dejó incubar la placa por 48 horas. Se incluyó en cada ensayo la cepa de referencia *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, la cual es sensible a estibogluconato de sodio (SSG) y antimoniato de meglumina (siendo ambas presentaciones de *Sb^V* utilizadas en el tratamiento de pacientes con leishmaniasis).

Habiéndose cumplido 48 horas de incubación, se procedió de la manera indicada en la sección de ensayo enzimático de actividad de TryR (VII.VI). El ensayo fue ejecutado en lisados de macrófagos infectados con amastigotes de aislados de *Leishmania braziliensis*. Los resultados de absorbancia fueron usados para calcular la concentración inhibitoria media (IC₅₀) por análisis de regresión sigmoideal usando el programa GraphPad Prism 5 (los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción en absorbancia comparado con los pozos control, habiendo considerado 3 réplicas técnicas para cada concentración de droga por aislado).

VII.VIII) PLAN DE ANÁLISIS

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se agrupó los datos de IC₅₀ frente a los diferentes tipos de estrés analizados, así como los datos de infectividad *in vitro* de los aislados/cepas de *L. braziliensis* estudiados y su actividad basal de TryR, de acuerdo a su condición de infección por LRV1 (LRV1+ vs. LRV1-). También, debido a que los datos de IC₅₀ no son estimados puntuales sino variables continuas, es menos evidente una diferencia entre grupos, por lo que se decidió trabajar con el % de inhibición del crecimiento a una única concentración de drogas. Debido a que el tamaño de muestra de cada grupo es bajo, se usó la prueba de Mann-Whitney para el análisis estadístico de los datos, la cual es una prueba no paramétrica que compara medianas. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Ensayo	Variable dependiente	Variables Independientes	Pruebas estadísticas
Tolerancia a estímulos de estrés	Concentración letal media (IC_{50}) o porcentaje de inhibición del crecimiento a la concentración máxima de droga utilizada	Tipo de cepa/aislado (LRV1+ o LRV1-)	Test de Mann-Whitney.
Infectividad	Índice de infección o porcentaje de infección	Tipo de cepa/aislado (LRV1+ o LRV1-)	Test de Mann-Whitney.
Capacidad “redox”	Actividad basal de TryR	Tipo de cepa/aislado (LRV1+ o LRV1-)	Test de Mann-Whitney

Tabla 5.- Descripción de las variables analizadas por cada ensayo realizado y sus respectivas pruebas estadísticas.

VII.IX) LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Tripanosomátidos del IMTAvH-UPCH, y en el Laboratorio de Patho-Antígenos (LID- Facultad de Ciencias y Filosofía, UPCH).

Además, se utilizó la infraestructura de la Unidad de Epidemiología Molecular (UEM -3er piso de la Escuela de Posgrado VAC- parte del IMTAvH) para el análisis molecular de LRV1 y el Laboratorio de Parasitología Celular (LID- Facultad de Ciencias y Filosofía, UPCH) para los ensayos con macrófagos.

VIII. RESULTADOS

VIII.I) SELECCIÓN DE AISLADOS DE *L. BRAZILIENSIS*

Se escogió aislados clínicos de *L. braziliensis* peruanos, provenientes de zonas endémicas para leishmaniasis, cuya condición de infección por LRV1 se había determinado previamente en un estudio colaborativo (Adaui *et al*, 2016). Asimismo, se incluyó una cepa control susceptible y otra tolerante (resistente natural) para las dos formas de antimonio evaluadas (Sb^V y Sb^{III}) (Tabla 6).

<i>Zona de procedencia</i>	<i>Cepa/Aislado clínico</i>	<i>LRVI</i>	<i>Sb^{III}</i>	<i>Sb^V</i>	<i>SNAP</i>
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC1565	-	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC2177	-	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC2125	-	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC2123	-	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC1580	-	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC1568	+	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC2176	+	ND	ND	ND
Paucartambo, Cusco	MHOM/PE/91/LC2043	+	ND	ND	ND
Madre de Dios	MHOM/PE/03/PER191*	+	ND	ND	ND
	MHOM/PE/01/LH2033	+	ND	6+	ND
Junín	(PER014)				
Control susceptible	MHOM/BR/75/M2903	-	0	1	ND
(Cepa de referencia)					
Control tolerante	MHOM/PE/02/PER104	-	6+	6+	ND
(Madre de Dios)					

Tabla 6.- Selección de aislados de *L.braziliensis*. *Susceptibilidad a antimoniales obtenida en el modelo *in vitro* de amastigote-macrófago por Yardley *et al* (2006); datos expresados como “índice de actividad” (I.A.), esto es, el ratio del valor ED₅₀ (dosis efectiva 50%) del aislado en estudio con respecto al ED₅₀ de la cepa de referencia M2903. Aislados con un I.A. de 0–2 fueron considerados susceptibles a Sb^V o Sb^{III} (0, más sensible que la cepa M2903), mientras que aislados con un I.A. ≥ 3 fueron considerados resistentes (6+, muy resistente). ND,

no determinado. *Aislado analizado para la presencia de LRV1 en el presente estudio; los demás aislados: Aداui *et al*, 2016.

VIII.II) CULTIVO DE *LEISHMANIA*

Con el fin de determinar el comportamiento de los parásitos de *Leishmania braziliensis* en cultivo *in vitro*, se realizó una curva de crecimiento. Se comenzó el ensayo con una concentración de parásitos de 5×10^6 /mL de la cepa de referencia *L.braziliensis* M2903, en dos cultivos independientes. Se realizó conteos de los parásitos de cada cultivo por 7 días, a la misma hora. Esto nos permitió obtener una curva de crecimiento, donde se identificó a los días 2 y 3 como fase logarítmica de crecimiento; y los días 4 y 5, fase estacionaria.

Esto es importante para los experimentos posteriores, ya que la mayoría de ellos requiere cultivos de parásitos en fase logarítmica o estacionaria, según sea el caso.

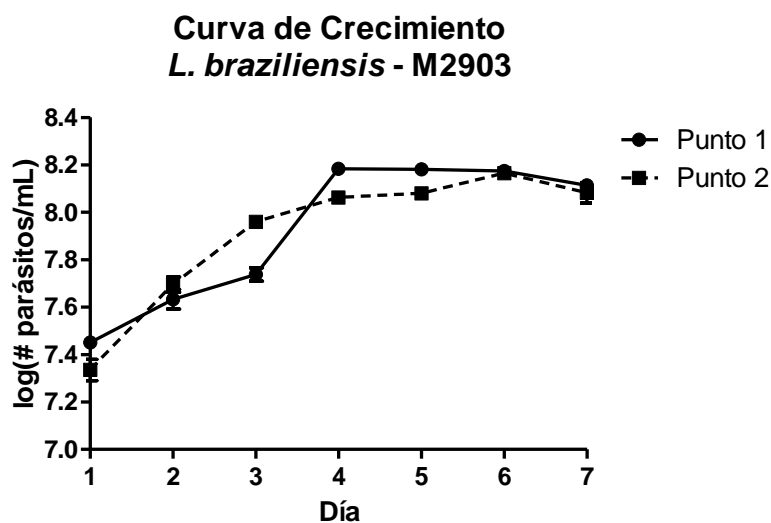


Figura 2.- Curva de crecimiento de *Leishmania braziliensis* M2903. El ensayo comenzó con una concentración de 5×10^6 parásitos/mL, en dos cultivos independientes (Punto 1 y punto 2). Se hizo el conteo de parásitos por 7 días. Se identificó a los días 2 y 3 como fase logarítmica de crecimiento. Los días 4 y 5 correspondieron a la fase estacionaria de crecimiento de los parásitos, así como los días 6 y 7 corresponden a la fase estacionaria tardía.

VIII.III) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES RELATIVOS DE TRANSCRITOS

VIRALES

Para la verificación de la presencia de LRV1 en los aislados escogidos y la determinación de la cantidad relativa de transcritos virales, se extrajo ARN a partir de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria (estadio que presenta una mayor replicación viral en comparación con la fase logarítmica; Chung *et al*, 1998) de aislados tanto LRV1+ como LRV1- usando Trizol o el Kit de extracción GeneJet RNA Extraction (ThermoScientific).

Cepa/aislado	Cantidad de ARN (ng/ μ L) por método de extracción	
	Trizol	GeneJet RNA extraction kit
LC1568	92.6	306
LC2043	218	386
LC1565	56.9	337
LH2177	11	248
LH2033	319	>1200
M2903	70.9	315

Tabla 7.- Cuantificación de ARN extraído con dos métodos distintos (Trizol vs. Kit de extracción GeneJet RNA Extraction-Thermo Scientific)

Una vez obtenidos los datos de cuantificación del ARN extraído bajo los dos métodos, se decidió usar el Kit de extracción GeneJet RNA Extraction Kit para los ensayos posteriores debido a que se obtuvo mayor rendimiento. Asimismo, se evaluó la integridad del ARN purificado por electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Se observaron las 3 bandas mayores de rRNA características de *Leishmania* (SSU, LSU- α , LSU- β) correspondientes a moléculas de 15–21S (Martínez-Calvillo *et al*, 2001), así como el *smear* correspondiente a los mRNA (Figura 3, carril 2), lo que confirmó la óptima calidad del ARN extraído.

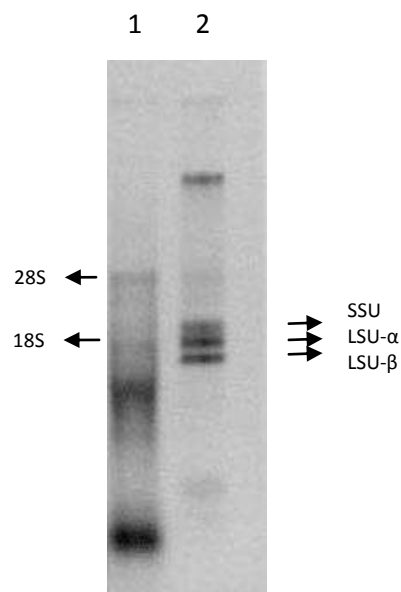


Figura 3.- Gel de agarosa en condiciones desnaturizantes al 1.5% para determinar la integridad del ARN extraído. Carril 1: ARN de cerdo extraído mediante el método de fenol-cloroformo (Trizol), a una concentración de 3 µg. Usado como control de ARN eucariote (proporcionado por el Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis – LID, UPCH). Carril 2: ARN de la cepa M2903 de *L.braziliensis*, extraído mediante el Kit de extracción GeneJet RNA Extraction (ThermoScientific), a una concentración de 3.15 µg.

Una vez extraído, el ARN fue sometido a transcripción reversa usando primers random hexámeros, los cuales consisten en una mezcla de oligonucleótidos que representa todas las posibles secuencias de hexámeros, asegurando una cobertura de todas las regiones del ARN. Una vez obtenido el cDNA, éste se expuso a 30 ciclos de PCR usando primers (Forward: 5'-GAG TGG GAG TCC CCC ACA T-

3', Reverse: 5'-TGG ATA CAA CCA GAC GAT TGC T-3') que amplifican un segmento de 71 nucleótidos (174-244, como se observa en la secuencia presentada debajo-en amarillo está representado el lugar de unión de los primers) del gen de la cápside de LRV1 (Ogg *et al*, 2003).

>gi|414478|gb|U01899.1|LRU01899 *Leishmania* RNA virus 1-4 major capsid protein gene, complete cds, and putative RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds

```
GCGAATTCAAACGAGATGCCTAAGAGTTTGGATTTCGCTAGCTGTCCGG
ATGGTAGTGTTACCTGTGGTCCACCACGGTAAAGCATTAAAGGGCTAGC
CTTAACCTCACTGGAATTGAATGAAAGTGGGAGATCAGTGGCCTCCAA
CGGTTGGACTGACTGGACGGGGGGTAATCGAGTGGGAGTCCCCCACAT
CCTACATTTATGTAGTTCCTCACGATCCACAGCAATCGTCTGGTTGTAT
CCAGGTACTGCCGCGAGCGTAAGGGAGTGTTTTGGCAGACACAATCC
AATATGCTGACTACGGTCGGTGTGGAGGATCCGAAACGTAAGCAAGTT
TCTTGTTACTATT
```

En paralelo, se amplificó el gen *G6PD*, un gen de copia única de *Leishmania* como gen de referencia. Una vez que se tuvo los datos de niveles relativos de transcrito para cada gen, se determinó el ratio de transcritos virales sobre transcritos del parásito (Tabla 8).

<i>Aislado</i>	<i>Ratio LRV/G6PD</i>	<i>Clasificación niveles relativos transcritos virales</i>
LH2033 (+)	77.44	Media
LC2043 (+)	79.38	Media
LC1568 (+)	21.59	Baja
LC2176 (+)	349.41	Alta
PER191 (+)	10.08	Muy Baja
*M4147 (+)	305.98	Alta
M2903 (-)	-	LRV1-
LC1565 (-)	-	LRV1-
LC2177 (-)	-	LRV1 -
LC2123 (-)	-	LRV1-
LC2125 (-)	-	LRV1-
LC1580 (-)	-	LRV1-
PER104 (-)	-	LRV1-

Tabla 8.- Niveles relativos de transcritos virales en aislados de *L.braziliensis* determinados por el método de qRT-PCR. Los niveles de transcritos de LRV1 fueron cuantificados y normalizados relativos al gen de *Leishmania G6PD* analizado. Se clasificó los niveles relativos de transcritos de LRV/G6PD en 4 categorías: Alta (101-500 transcritos), Media (51-100 transcritos), Baja (21-50 transcritos), Muy baja (1-20 transcritos). *Se incluyó la cepa de *L. guyanensis* M4147 como control positivo para LRV1 (Ives *et al*, 2011).

Con el fin de determinar que la infección viral por LRV1 se mantiene durante el ciclo de crecimiento/diferenciación de su hospedero *L. braziliensis*, se analizó la cantidad relativa de transcritos LRV1/G6PD en los estadios relevantes de

promastigote (fase estacionaria) y amastigote intracelular, así como en la preparación de amastigotes axénicos generados *in vitro* (usados para la infección de macrófagos a fin de obtener los amastigotes intracelulares) de la cepa LC2176 (Tabla 9). Se escogió esta cepa por presentar la mayor cantidad relativa de transcritos virales de la muestra de estudio (Tabla 8).

<i>Estadio</i>	<i>Transcritos LRV1</i>	<i>Transcritos G6PD</i>	<i>LRV1/G6PD</i>	<i>LRV1/célula</i>
Promastigote	6'350,000.0	33,700.0	188.4	114.30
Amastigote Axénico	1'570,000.0	23,500.0	66.8	48.20
Amastigote Intracelular	53,000.0	3.2	16,562.5	10.84

Tabla 9.- Niveles de transcritos de LRV1 y G6PD en los estadios analizados de la cepa *L. braziliensis* LC2176. Para la estimación aproximada de LRV1/célula se partió de la premisa de un número de parásitos de 10^7 (tras conteo al microscopio de números aproximados entre 5×10^6 y 5×10^7), al cual se le calculó un equivalente en ARN (cantidad respectiva de ARN obtenida (ng) en 30 μ L de agua tras la extracción). Considerando que se usó 5 μ L de cDNA (dilución 1/100 – 2.5 ng) para qRT-PCR, se calculó la cantidad de parásitos equivalente a esta cantidad de ácidos nucleicos, la cual fue luego dividida del número de transcritos de LRV1 obtenidos.

Una vez obtenidos los resultados, se verificó que la infección viral en *L. braziliensis* se mantiene durante el crecimiento y diferenciación de los parásitos *in vitro* incluyendo el estadio de amastigote intracelular de relevancia clínica y de interés en este estudio para la evaluación de la susceptibilidad a los estímulos de estrés.

VIII.IV) ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN MACRÓFAGOS

Con el fin de determinar las concentraciones máximas de las drogas a usar en los ensayos de estrés *in vitro* en el modelo amastigote-macrófago, se evaluó primero la toxicidad de las mismas sobre la célula hospedera (macrófagos). Yardley *et al* (2006) realizaron experimentos de susceptibilidad frente a antimoniales en el modelo *in vitro* de amastigote-macrófago, usando concentraciones de Triostam (Sb^{III}) y estibogluconato de sodio o SSG (Sb^V) en los rangos de 1.1 – 30 $\mu\text{g/mL}$ y 2.9-80 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sin embargo, en este trabajo se usó dos formas distintas de estas drogas: tartrato trihidratado de potasio y antimonio (Sb^{III}) y Glucantime (Sb^V). Teniendo esta información, se decidió explorar inicialmente concentraciones de 2-128 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^{III} y 5-320 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V . Debido a que se obtuvo porcentajes de inhibición del crecimiento celular mayores a 90% por encima de 8 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^{III} , se probó concentraciones inferiores de esta droga a partir de esta concentración. Por el contrario, para Sb^V se encontró que a la concentración más alta probada (320 $\mu\text{g/mL}$) no había toxicidad (datos no mostrados); por este motivo se decidió probar concentraciones de esta droga

superiores a ésta. En el caso de la droga de referencia Amfotericina-B, las concentraciones ensayadas fueron de 1.25-10 μ M gracias a información previa de ensayos realizados en el laboratorio. Para el caso del SNAP (donante de NO), Souza *et al* (2010) reportaron el uso de NaNO₂ (otro donante de NO) en concentraciones de 0.25 mM hasta 16 mM en parásitos de *L. braziliensis*. Por otro lado, Romao *et al* (1999) obtuvieron un 69% de supervivencia de macrófagos peritoneales de ratón con una concentración de SNAP de 1 mM. En el presente estudio se probó concentraciones de SNAP entre 0.093 mM – 6 mM. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad de drogas sobre macrófagos peritoneales murinos se muestran en las Figuras 4–7.

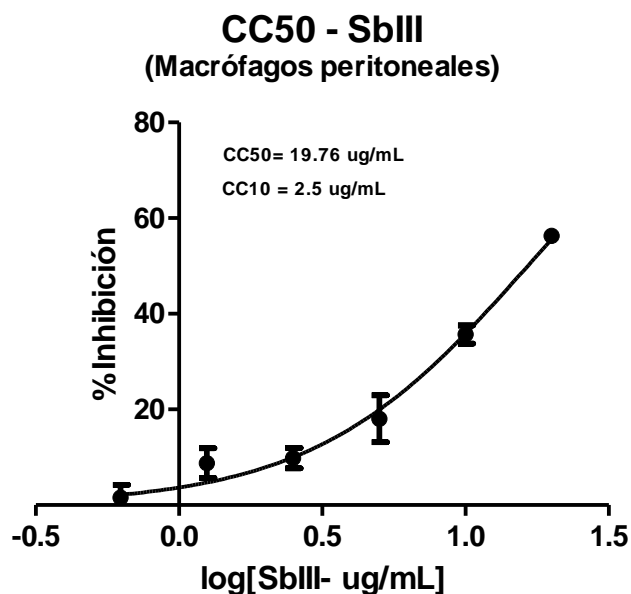


Figura 4.- Citotoxicidad de Sb^{III} sobre macrófagos peritoneales de ratón. Se probó concentraciones de 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 μg de tartrato trihidratado de potasio y antimonio (Sb^{III})/mL sobre macrófagos peritoneales de ratón. Los resultados fueron registrados a las 48 horas de exposición a la droga. Los datos de absorbancia fueron normalizados para obtener el porcentaje de inhibición, siendo la absorbancia registrada para los pozos de macrófagos no expuestos a la droga el 0% (no inhibición), y una absorbancia de 0 considerada como el 100% de inhibición (ninguna célula viva). Se obtuvo valores de concentración citotóxica media y décima de 19.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

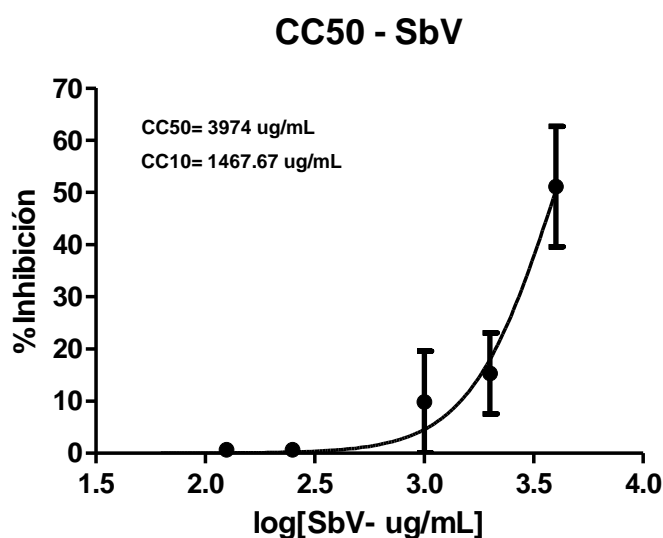


Figura 5.- Citotoxicidad de Sb^V sobre macrófagos peritoneales de ratón. Se probó concentraciones de 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 μg de antimoniato de meglumina (Sb^V)/mL sobre macrófagos peritoneales de ratón. Los resultados fueron registrados a las 48 horas de exposición a la droga. Los datos de absorbancia fueron normalizados para obtener el porcentaje de inhibición, siendo la absorbancia registrada para los pozos de macrófagos no expuestos a la droga el 0% (no inhibición), y una absorbancia de 0 considerada como el 100% de inhibición (ninguna célula viva). Se obtuvo valores de concentración citotóxica media y décima de 3974 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1467.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

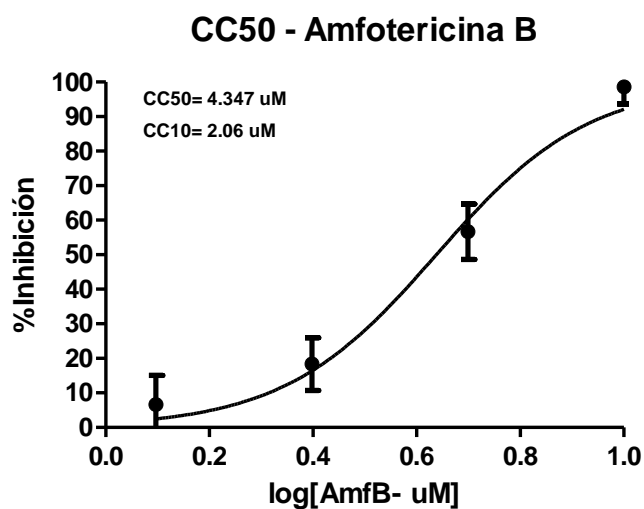


Figura 6.- Citotoxicidad de Amfotericina-B sobre macrófagos peritoneales de ratón. Se probó concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 μM de Amfotericina-B sobre macrófagos peritoneales de ratón. Los resultados fueron registrados a las 48 horas de exposición a la droga. Los datos de absorbancia fueron normalizados para obtener el porcentaje de inhibición, siendo la absorbancia registrada para los pozos de macrófagos no expuestos a la droga el 0% (no inhibición), y una absorbancia de 0 considerada como el 100% de inhibición (ninguna célula viva). Se obtuvo valores de concentración citotóxica media y décima de 4.4 μM y 2.1 μM respectivamente.

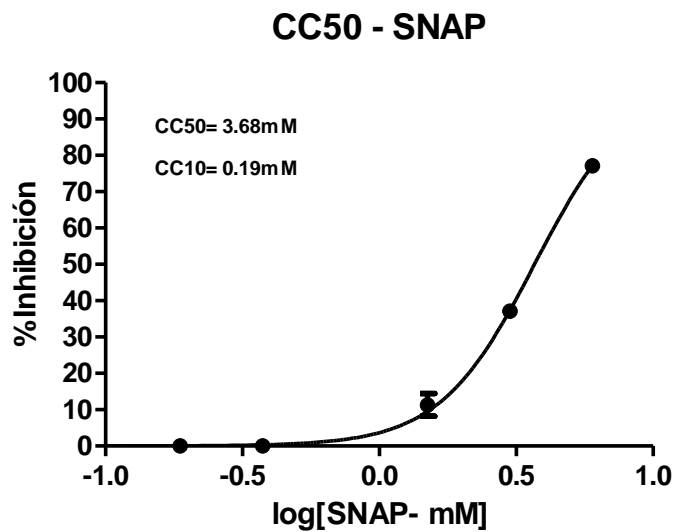


Figura 7.- Citotoxicidad de SNAP sobre macrófagos peritoneales de ratón. Se probó concentraciones de 0.093, 0.185, 0.375, 0.75, 1.5, 3 y 6 mM de SNAP sobre macrófagos peritoneales de ratón. Los resultados fueron registrados a las 48 horas de exposición a la droga. Los datos de absorbancia fueron normalizados para obtener el porcentaje de inhibición, siendo la absorbancia registrada para los pozos de macrófagos no expuestos a la droga el 0% (no inhibición), y una absorbancia de 0 considerada como el 100% de inhibición (ninguna célula viva). Se obtuvo valores de concentración citotóxica media y décima de 3.7 mM y 0.2 mM respectivamente.

Una vez obtenidos estos resultados, se decidió usar concentraciones máximas entre el CC10 y CC50 para cada droga a probar sobre amastigotes intracelulares. El rango de drogas a usar para *Sb^{III}* fue de de 1.25-20 µg/mL; para *Sb^V* se usó un rango de concentraciones entre 6.25-100 µg/mL debido a que éste no presentó toxicidad sobre macrófagos y basados en el rango máximo de 80 µg/mL usado por

Yardley *et al* (2006) previamente. Para el donante de óxido nítrico (SNAP) se usó un rango de concentraciones entre 18.75-300 μ M.

VIII.V) INFECCIONES DE MACRÓFAGOS

Para determinar el ratio de infección óptimo que permita obtener un porcentaje de infección de macrófagos cercano al 80% (necesario para poder evaluar el efecto anti-*Leishmania* de las drogas/estímulos de estrés), se probó distintos ratios de infección con la cepa de referencia *L. braziliensis* M2903 (Figura 8, Tabla 10).

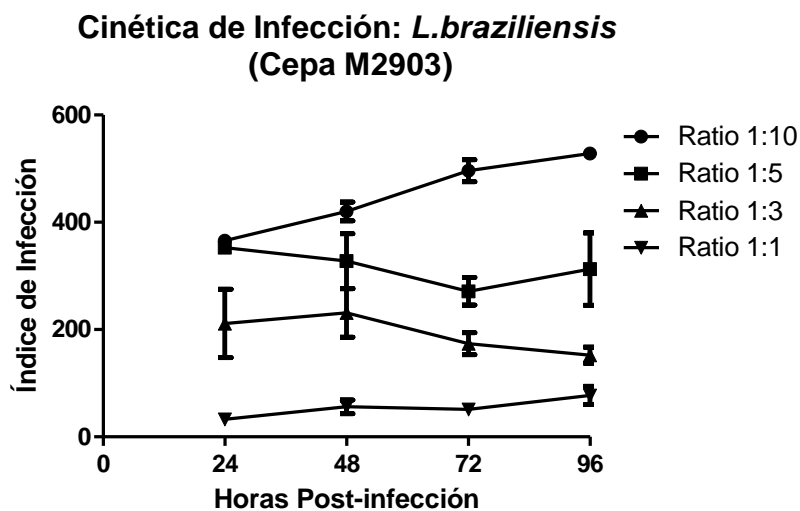


Figura 8.- Cinética de infección de la cepa de referencia *L. braziliensis* M2903. Se enfrentó macrófagos peritoneales de ratón a amastigotes axénicos de *L. braziliensis* (cepa M2903) en ratios 1:10, 1:5, 1:3 y 1:1. Los resultados fueron registrados a las 24, 48, 72 y 96 horas después de realizada la infección. Se calculó el porcentaje de macrófagos infectados (A) y el número promedio de amastigotes por macrófago infectado (B), para obtener el Índice de infección (AxB) en cada tiempo medido.

Tiempo →		24 h	48h	72h	96h
Ratio↓					
Ratio 1:10	A	76.1	77.8	77.5	78.0
	B	4.8	5.4	6.4	6.9
	AxB	365.6	420.3	496.3	539.0
Ratio 1:5	A	69.5	61.6	54.2	53.0
	B	5.1	5.3	5.0	5.9
	AxB	352.5	327.7	271.3	312.5
Ratio 1:3	A	51.5	47.0	38.0	25.7
	B	4.0	4.9	4.6	6.0
	AxB	211.3	231.1	173.5	152.3
Ratio 1:1	A	14.0	22.0	15.3	14.3
	B	2.4	2.5	3.4	5.3
	AxB	33.0	56.0	51.0	77.3

Tabla 10.- Cinética de infección de la cepa de referencia *L.braziliensis* M2903.

Se muestran los datos promedio de 3 réplicas técnicas de los parámetros: Porcentaje de macrófagos infectados (A), número promedio de amastigotes por macrófago (B), e Índice de infección (AxB) para cada ratio de infección y tiempo analizado.

A partir de estos resultados, se decidió usar el ratio de infección 1:10 para los experimentos posteriores, ya que con este se obtuvo un mayor porcentaje de infección (cerca a 80%), así como mayor número de amastigotes por macrófago (lo que resulta en un mayor índice de infección) y que aumenta en el tiempo, lo cual indica que hay replicación de los parásitos.

VIII.VI) ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO ENZIMÁTICO DE ACTIVIDAD DE TRIPANOTIÓN REDUCTASA (TRYR)

Esta reacción combina la reducción de tripanotión disulfuro ($T[S]_2$) catalizada por la tripanotión reductasa (proveniente de los parásitos de *Leishmania*) con su regeneración *in situ* a través del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), resultando en un ensayo colorimétrico.

VIII.VI.1) Estandarización del ensayo de TryR en promastigotes

Para demostrar que el método a utilizar funciona y es específico para *Leishmania*, se sembró una cantidad creciente de promastigotes en cada pozo, así como macrófagos peritoneales de ratón. Se determinó que la actividad de esta enzima es dosis-dependiente, es decir, la absorbancia registrada resultado de la reducción de DTNB mediada por TryR aumentó de la mano con el número de parásitos (Figura 9). Asimismo, se determinó que esta reacción es específica de *Leishmania* ya que no se obtuvo señal de respuesta con macrófagos peritoneales de ratón (Figura 10).

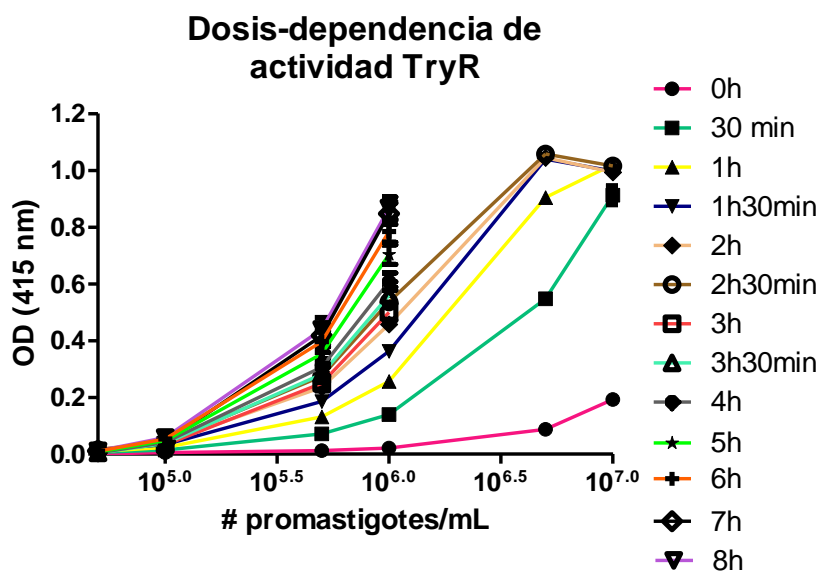


Figura 9.- Actividad de TryR dosis-dependiente. La reducción de DTNB mediada por la enzima TryR es dosis dependiente en lisados de promastigotes de *L. braziliensis* (M2903). Los parásitos fueron sembrados en concentraciones entre 5×10^4 y 1×10^7 parásitos/mL. La reducción de DTNB mediada por TryR fue registrada hasta las 8 horas de reacción.

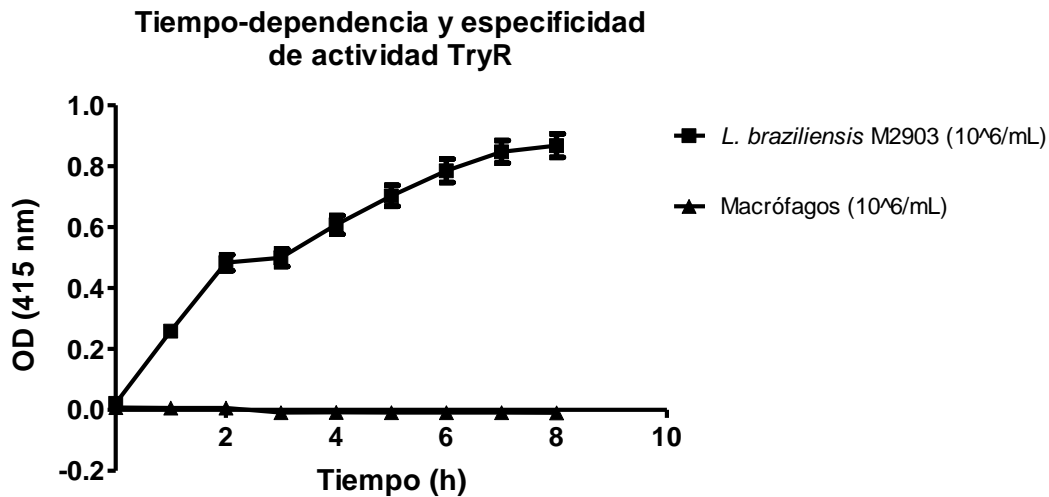


Figura 10.- Tiempo-dependencia y especificidad de la actividad TryR. Cinética de actividad de TryR en lisados de parásitos y células hospedadas. Cantidades iguales (1×10^6 células/mL) de promastigotes de *Leishmania* (*L.braziliensis*, M2903) y macrófagos peritoneales de ratón fueron sembrados y la reducción de DTNB mediada por la actividad de TryR fue medida en intervalos de una hora.

VIII.VI.II) Estandarización del ensayo de TryR en amastigotes axénicos

Se sembró 75 μ L de cultivo de amastigotes axénicos conteniendo 130000, 180000 y 260000 amastigotes/pozo. Después del lisado de las células con un buffer de lisis que contiene un inhibidor de proteasas (PMSF) para evitar la degradación de la enzima tripanotión reductasa, se añadió secuencialmente los componentes de la reacción NADPH, el sustrato TS₂ (o buffer Tris 0.05M para los pozos blanco) y DTNB. Se determinó que la actividad de esta enzima es dosis-dependiente, es

decir, la absorbancia registrada resultado de la reducción de DTNB mediada por TryR aumentó de la mano con el número de parásitos.

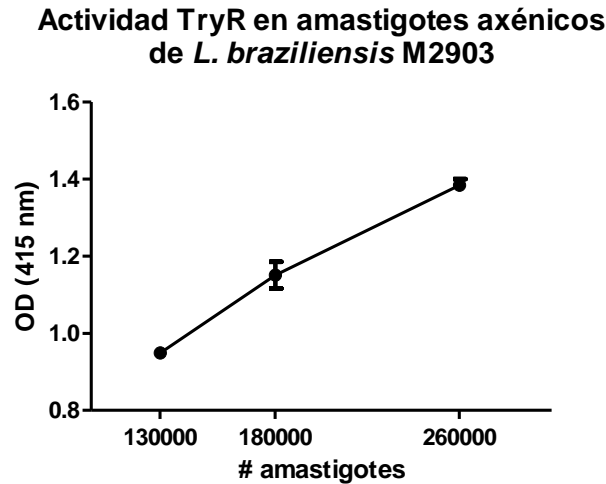


Figura 11.- Actividad de TryR dosis-dependiente en amastigotes axénicos. La reducción de DTNB mediada por la enzima TryR es dosis dependiente en lisados de amastigotes axénicos de *L. braziliensis* (M2903).

VIII.VI.III) Estandarización del ensayo de TryR en amastigotes intracelulares

Se realizó infecciones de macrófagos peritoneales de ratón con el aislado clínico LC2176 de *L.braziliensis* en ratios 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10 (macrófago: parásitos). Se registró la cinética de infección para cada ratio a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección, bajo los métodos de microscopía y de actividad de TryR con el fin de dar validez a este último ensayo. En los resultados se observa una tendencia de aumento de absorbancia, así como de índice de infección para todos los ratios de infección probados, conforme aumenta el tiempo post-infección (Figuras 12–15).

**Cinética de Infección: *L.braziliensis*
(Cepa LC2176) - Ensayo tryR**

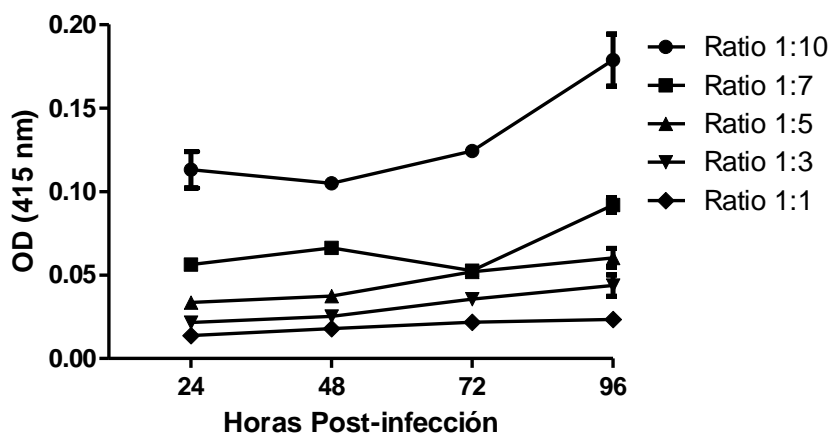


Figura 12.- Cinética de Infección con el ensayo de actividad de TryR. Cinética de actividad de TryR en lisados de parásitos y células hospederas. Las ratios de infección usados fueron 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10. La reducción de DTNB mediada por la actividad de TryR fue medida a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección.

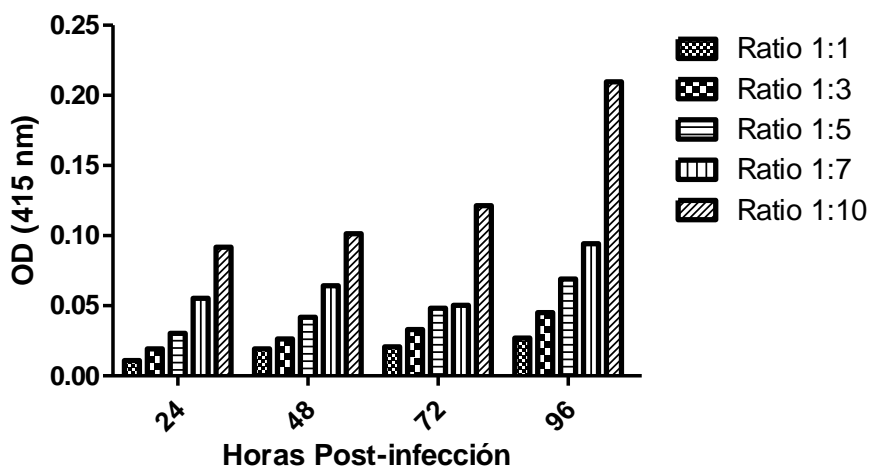


Figura 13.- Cinética de Infección con el ensayo de actividad de TryR (gráfico de barras). Cinética de actividad de TryR en lisados de parásitos y células hospederas. Las ratios de infección usados fueron 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10. La

reducción de DTNB mediada por la actividad de TryR fue medida a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección.

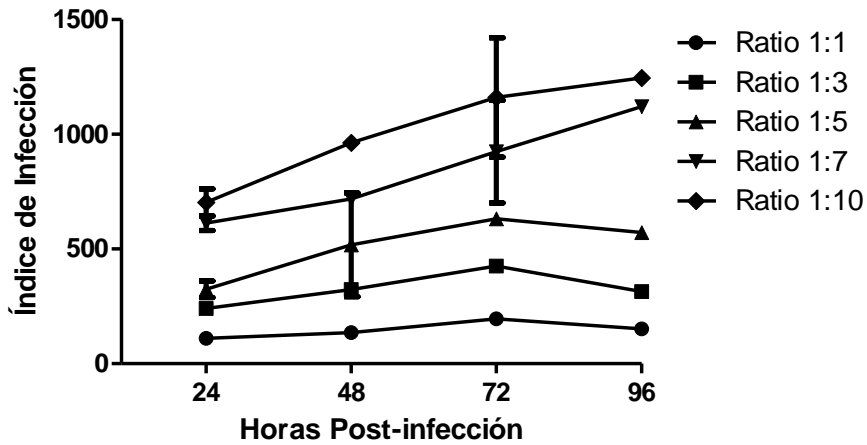


Figura 14.- Cinética de Infección con ensayo de microscopía. Índice de infección para los ratios de infección usados (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10) registrados a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección.

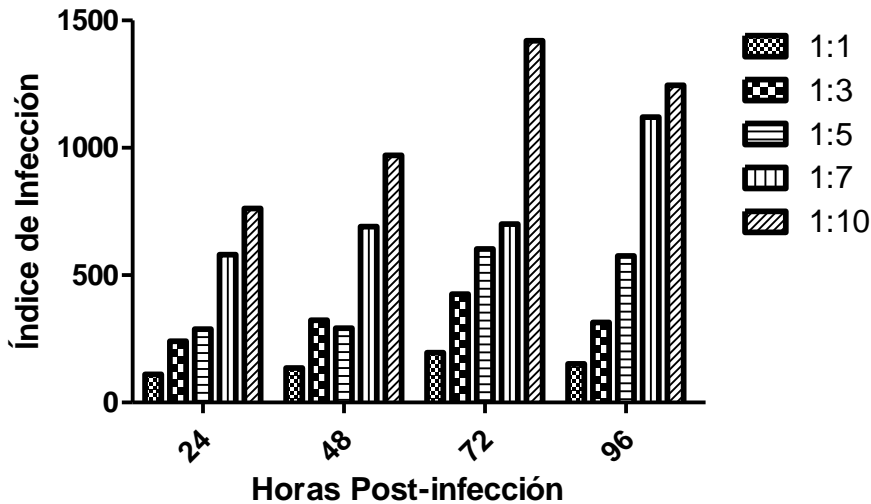


Figura 15.- Cinética de Infección con ensayo de microscopía (gráfico de barras). Índice de infección para los ratios de infección usados (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10) registrados a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección.

VIII.VII) ENSAYOS *IN VITRO* DE SUSCEPTIBILIDAD A ESTÍMULOS DE ESTRÉS EN AMASTIGOTES INTRACELULARES

Con el fin de determinar si existe alguna diferencia en las tolerancias de los aislados de *L. braziliensis* infectados con LRV1 *versus* los no infectados frente a los estímulos de estrés, se analizó la susceptibilidad de 10 aislados de *L. braziliensis* (5 LRV1+ y 5 LRV1-) a las 3 drogas de interés (Sb^V, Sb^{III} y SNAP) (Tabla 11). Se analizó también las cepas PER104 y M2903 como cepas controles de fenotipo resistente y susceptible, respectivamente, a los dos tipos de antimonio probados (en base a los resultados reportados por Yardley *et al*, 2006). Asimismo, se registró la actividad basal de TryR, y porcentajes de infección en macrófagos murinos alcanzados por cada aislado (no expuesto a drogas) en el momento final del ensayo (72h post-infección) (Tabla 11).

<i>AI SLADO</i>	<i>LRV1/ G6PD</i>	<i>IC₅₀- SB^{III}</i>	<i>%INH- SB^{III}</i>	<i>IC₅₀- SB^V</i>	<i>%INH -SB^V</i>	<i>IC₅₀- SNAP</i>	<i>%INH SNAP</i>	<i>ACTIVIDAD TRYR</i>	<i>%INFECCIÓN</i>	<i>#AMASTIGOTES/ MACRÓFAGO</i>	<i>ÍNDICE DE INFECCIÓN</i>
LC2176 (LRV1+)	349.41	>20.00 µg/mL	16.80	65 µg/mL	56.70	144.9 µM	58.36	0.0349	97	11.95	1160.00
LC1568 (LRV1+)	21.59	>20.00 µg/mL	0.00	>100 µg/mL	44.10	292.6 µM	51.00	0.0231	78	4.15	324.00
LC2043 (LRV1+)	79.38	5.70µg /mL	68.00	>100 µg/mL	2.50	280.1 µM	52.18	0.1025	94	7.50	712.00
LH2033 (LRV1+)	77.44	>20.00 µg/mL	26.50	>100 µg/mL	0.00	>300 µM	16.10	0.0704	69	5.14	355.00
PER191 (LRV1+)	10.08	3.69 µg/mL	74.16	>100 µg/mL	17.00	23.6 µM	76.10	0.0836	75	6.29	472.00
LC1565 (LRV1-)	-	16.00 µg/mL	59.80	>100 µg/mL	26.50	73.9 µM	71.30	0.1875	20	8.80	176.00
LC2177 (LRV1-)	-	>20.00 µg/mL	41.10	>100 µg/mL	27.30	73.4 µM	81.70	0.0282	89	10.75	957.00
LC1580 (LRV1-)	-	>20.00 µg/mL	35.00	>100 µg/mL	24.50	>300 µM	31.00	0.0493	20	5.00	100.00

<i>AI SLADO</i>	<i>LRV1/ G6PD</i>	<i>IC₅₀- SB^{III}</i>	<i>%INH- SB^{III}</i>	<i>IC₅₀- SB^V</i>	<i>%INH -SB^V</i>	<i>IC₅₀- SNAP</i>	<i>%INH SNAP</i>	<i>ACTIVIDAD TRYR</i>	<i>%INFECCIÓN</i>	<i>#AMASTIGOTES/ MACRÓFAGO</i>	<i>ÍNDICE DE INFECCIÓN</i>
LC2123 (LRV1-)	-	0.6 μg/mL	80.90	>100 μg/mL	22.6	>300 μM	0.00	0.1157	90	10.6	765.00
LC2125 (LRV1-)	-	1.26 μg/mL	87.80	92 μg/mL	54.40	50.9 μM	80.89	0.0205	51	4.20	219.50
PER104 (LRV1-)	-	>20.00 μg/mL	15.85	>100 μg/mL	12.50	>300 μM	9.00	0.0422	51	2.78	142.00
M2903	-	7.33 μg/mL	54.90	>100 μg/mL	44.00	300.0 μM	50.00	0.0212	76	5.90	448.00

Tabla 11.- Susceptibilidad de aislados de *L.braziliensis* a estímulos de estrés, su capacidad redox y de infección en macrófagos murinos. Los valores de IC₅₀ de cada aislado (5LRV1+, 5LRV1-, la cepa control tolerante-PER104), así como de la cepa de referencia M2903, frente a las 3 drogas usadas fueron calculados por regresión sigmoideal. Para cada aislado se tuvo láminas control que permitieron estimar el porcentaje e índice de infección en macrófagos murinos tras su lectura al microscopio. Los valores de % de inhibición obtenido para cada aislado (5LRV1+, 5LRV1-, la cepa control tolerante-PER104 y cepa de referencia M2903) a la máxima concentración de cada droga probada fueron calculados en base a la actividad de TryR, así como la actividad basal de la misma (en ausencia de drog

Una vez obtenidos estos resultados, se intentó determinar si existía una diferencia significativa al agrupar los datos de IC₅₀ de los aislados LRV1+ y LRV1- (Figuras 16–24; Tablas 12–19). Debido a que muchos de los aislados presentaron valores de IC₅₀ mayores a la concentración máxima de droga probada, se atribuyó a todos ellos el valor máximo (Ej. IC₅₀ Sb^V = 100 µg/mL) para facilitar el análisis de los datos y su gráfica.

SNAP. Los resultados indican una tendencia (aunque no una diferencia estadísticamente significativa) a presentar valores de IC₅₀ mayores para aquellos aislados LRV1+ comparados con los aislados LRV1-, para la droga SNAP (Figura 16 y Tabla 12). También, se observa una tendencia de aquellos aislados infectados por el virus (LRV1+) a presentar menores porcentajes de inhibición en la máxima concentración de droga probada (300 µM) que los no infectados (LRV1-), aunque sin diferencias significativas (Figuras 17 y 18, y tablas 13 y 14).

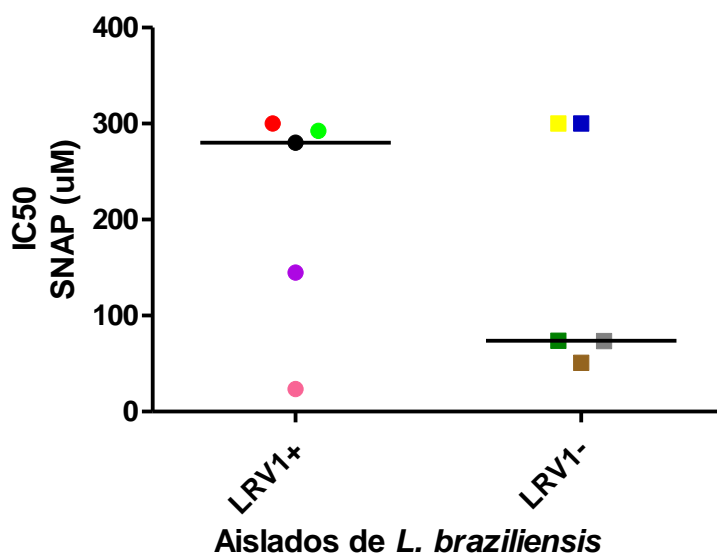


Figura 16.- Comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a SNAP. Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 mostraron una tendencia que no fue estadísticamente significativa a tener más tolerancia frente a SNAP que aquellos aislados no infectados. La tolerancia de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- a SNAP fue analizada usando el ensayo de TryR. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. $p= 1.0$, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (μM)	Rango (μM)	Rango Inter cuartílico (μM)
LRV1+	280.10	23.61-300.00	84.26-296.30
LRV1-	73.94	50.89-300.00	62.13-300.00

Tabla 12.- Estadísticos descriptivos de la comparación de la tolerancia (IC_{50}) de aislados LRV1+ y LRV1- frente a SNAP.

Aislado	% de inhibición de crecimiento a 300 μM
LC2176(LRV1+)	58.36 %
LC1568(LRV1+)	51.00 %
LH2033(LRV1+)	16.10 %
LC2043(LRV1+)	52.18 %
PER191(LRV1+)	76.10 %
LC2125 (LRV1-)	80.89 %
LC1580(LRV1-)	31.00 %
LC2123(LRV1-)	0.00 %
LC2177(LRV1-)	81.70 %
LC1565(LRV1-)	71.30 %
<i>M2903</i>	50.00 %
<i>(control susceptible)</i>	
<i>PER104</i>	9 %
<i>(control tolerante)</i>	

Tabla 13.- Porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado con la máxima concentración de SNAP probada (300 μ M) para cada cepa analizada.

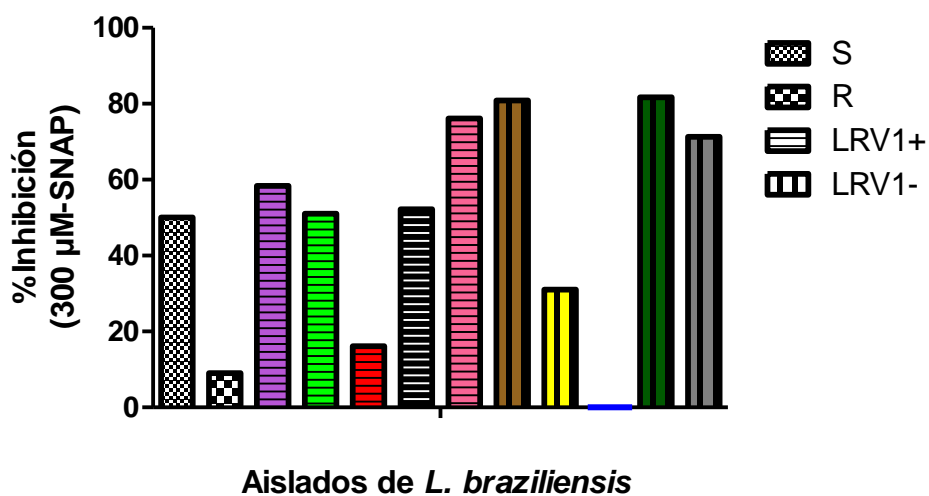


Figura 17.- Porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados de *L.braziliensis* alcanzado en la máxima concentración (300 μM) de SNAP probada. S: cepa control sensible-M2903. R: cepa control resistente: PER104. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

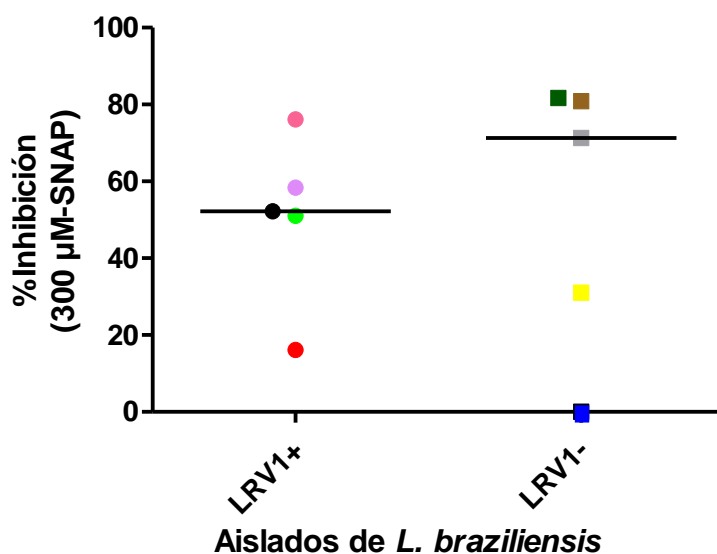


Figura 18.- Comparación del % de inhibición del crecimiento de aislados LRV1+ y LRV1- alcanzado en la máxima concentración (300 µg/mL) de SNAP probada. Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa a presentar un % de inhibición más bajo frente a 300 µM de SNAP que aquellos aislados no infectados. Este % de inhibición del crecimiento de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- fue calculado usando los datos del ensayo de TryR. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. $p= 0.69$, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (% Inhibición)	Rango (% Inhibición)	Rango Inter cuartílico (% Inhibición)
LRV1+	52.18	16.10-76.10	33.55-67.23
LRV1-	71.30	0.00-81.70	15.50-81.30

Tabla 14.- Estadísticos descriptivos de la comparación del % de inhibición del crecimiento de los aislados LRV1+ y LRV1- frente a 300 μ M de SNAP.

Sb^{III}. Con respecto a Sb^{III}, los datos de IC₅₀ obtenidos se superponen entre los dos grupos de aislados, por lo que es menos evidente una diferencia (Figura 19 y Tabla 15). Por este motivo, se analizó el porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado a la máxima concentración de droga probada (20 µg/mL) y se comparó entre grupos (LRV1+ vs. LRV1-), sin encontrar diferencias significativas (Figuras 20 y 21, y tablas 16 y 17).

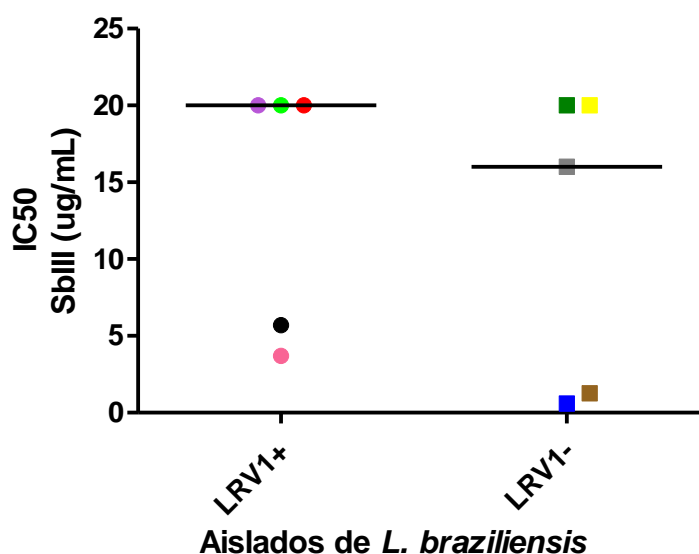


Figura 19.- Comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a Sb^{III}. Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa a tener más resistencia frente a Sb^{III} que aquellos aislados no infectados. La tolerancia de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- a Sb^{III} fue analizada usando el ensayo de TryR. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. p= 0.50, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores:

aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	Rango ($\mu\text{g/mL}$)	Rango Inter cuartílico($\mu\text{g/mL}$)
LRV1+	20.00	3.69-20.00	4.69-20.00
LRV1-	16.00	0.60-20.00	0.93-20.00

Tabla 15.- Estadísticos descriptivos de la comparación de la tolerancia (IC_{50}) de aislados LRV1+ y LRV1- frente a Sb^{III} .

Aislado	% de inhibición de crecimiento a 20 µg/mL
LC2176(LRV1+)	16.80 %
LC1568(LRV1+)	0.00 %
LH2033(LRV1+)	26.50 %
LC2043(LRV1+)	68.00 %
PER191(LRV1+)	74.16 %
LC2125 (LRV1-)	87.80 %
LC1580(LRV1-)	35.00 %
LC2123(LRV1-)	80.90 %
LC2177(LRV1-)	41.10 %
LC1565(LRV1-)	59.80 %
<i>M2903</i>	<i>54.90 %</i>
<i>(control susceptible)</i>	
<i>PER104</i>	<i>15.85 %</i>
<i>(control tolerante)</i>	

Tabla 16.- Porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado con la máxima concentración de Sb^{III} probada (20 µg/mL) para cada cepa analizada.

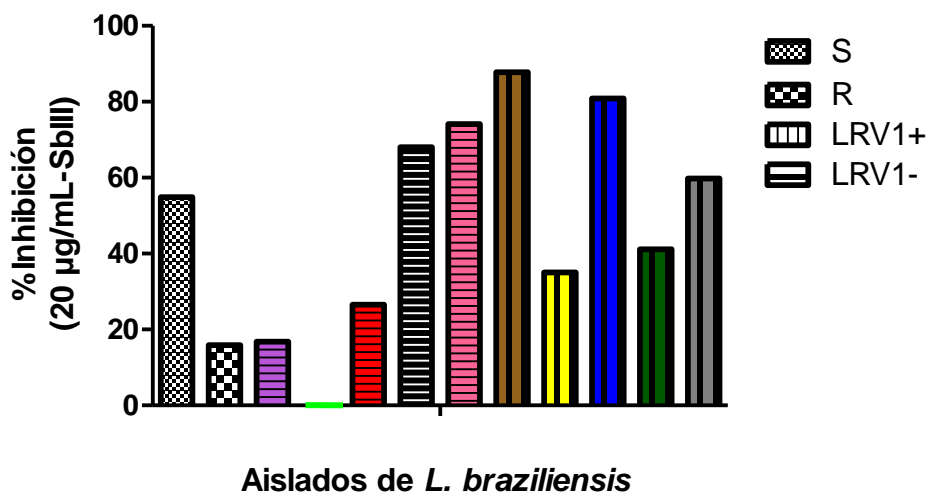


Figura 20.- Porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados de *L.braziliensis* alcanzado en la máxima concentración (20 µg/mL) de Sb^{III} probada. S: cepa control sensible-M2903. R: cepa control resistente: PER104. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

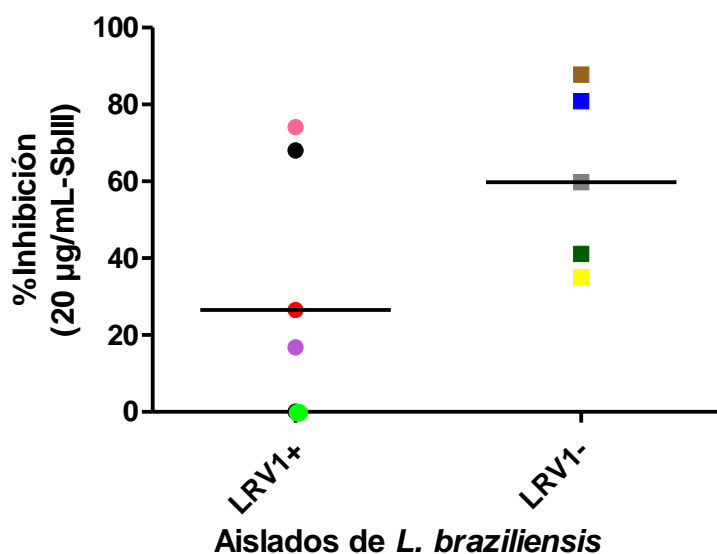


Figura 21.- Comparación del % de inhibición del crecimiento de aislados LRV1+ y LRV1- alcanzado en la máxima concentración (20 µg/mL) de Sb^{III} probada. Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa a presentar un % de inhibición más bajo frente a 20 µg/mL de Sb^{III} que aquellos aislados no infectados. Este % de inhibición del crecimiento de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- fue calculado usando los datos del ensayo de TryR. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. $p= 0.22$, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (% inhibición)	Rango (% inhibición)	Rango Inter cuartílico (% inhibición)
LRV1+	26.50	0.00-74.16	8.40-71.08
LRV1-	59.80	35.00-87.80	38.05-84.35

Tabla 17.- Estadísticos descriptivos de la comparación del % de inhibición del crecimiento de los aislados LRV1+ y LRV1- frente a 20 µg/mL de Sb^{III}.

Sb^V. Finalmente, para Sb^V, los aislados mostraron ser tolerantes a las concentraciones de droga usadas, sin diferencias significativas entre grupos (Figura 22). Debido a que la mayoría de los IC₅₀ obtenidos frente a Sb^V fueron mayores a la concentración máxima probada (100 µg/mL), e incluso la cepa control susceptible (M2903) presentó este comportamiento, se decidió analizar el porcentaje de inhibición del crecimiento de parásitos alcanzado a esta concentración de droga para cada cepa. Se encontró que la cepa control susceptible presentó un 44% de inhibición a 100 µg/mL de Sb^V mientras que la cepa control resistente (PER104) presentó un 12.5% de inhibición a esta concentración, lo cual corresponde con su estatus de susceptibilidad y tolerancia, respectivamente. Los aislados LRV1+ en conjunto mostraron una tendencia a presentar menores % de inhibición del crecimiento (mediana: 17%) que aquellos

LRV1- (mediana: 26.5%) (Tablas 18 y 19; Figuras 23 y 24), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

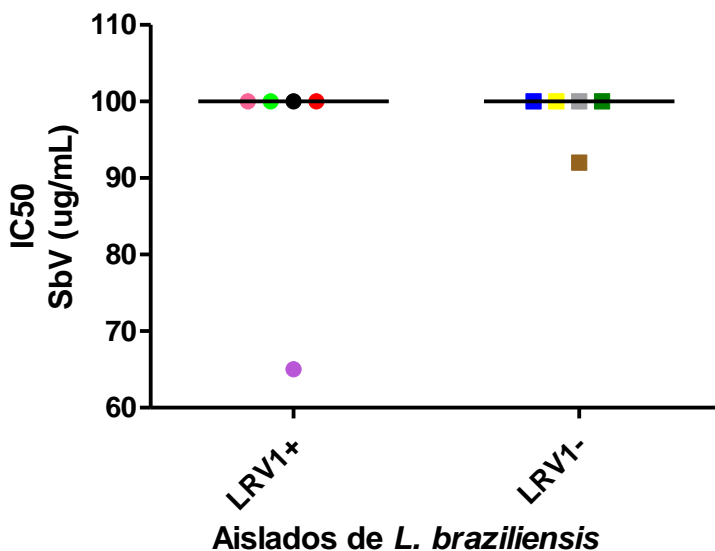


Figura 22.- Comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a Sb^V. Aislados de *L.braziliensis* infectados o no por LRV1 fueron tolerantes a las concentraciones de Sb^V probadas en el ensayo. Sólo 2 de los aislados tuvieron un IC₅₀ menor que la máxima concentración evaluada (LC2176, LRV1+, IC₅₀=65 µg/mL, y LC2125, LRV1-, IC₅₀=92). La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislado	% de inhibición de crecimiento a 100 µg/mL
LC2176(LRV1+)	56.7%
LC1568(LRV1+)	44.1%
LH2033(LRV1+)	0.0%
LC2043(LRV1+)	2.5%
PER191(LRV1+)	17.0%
LC2125 (LRV1-)	54.4%
LC1580(LRV1-)	24.5%
LC2123(LRV1-)	22.6%
LC2177(LRV1-)	27.3%
LC1565(LRV1-)	26.5%
<i>M2903</i>	44.0%
<i>(control susceptible)</i>	
<i>PER104</i>	12.5%
<i>(control tolerante)</i>	

Tabla 18.- Porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado con la máxima concentración de Sb^V probada (100 µg/mL) para cada aislado/cepa analizada.

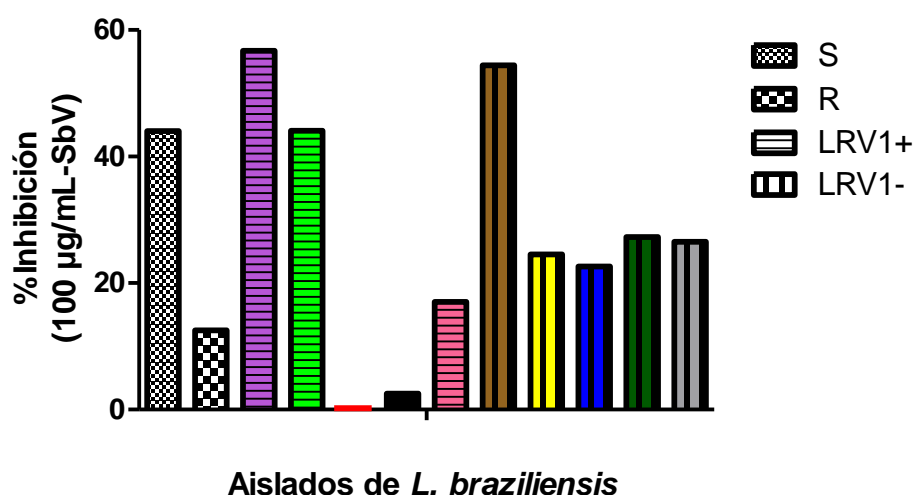


Figura 23.- Porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados de *L.braziliensis* alcanzado en la máxima concentración (100 µg/mL) de Sb^V probada. S: cepa control sensible-M2903. R: cepa control resistente: PER104. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

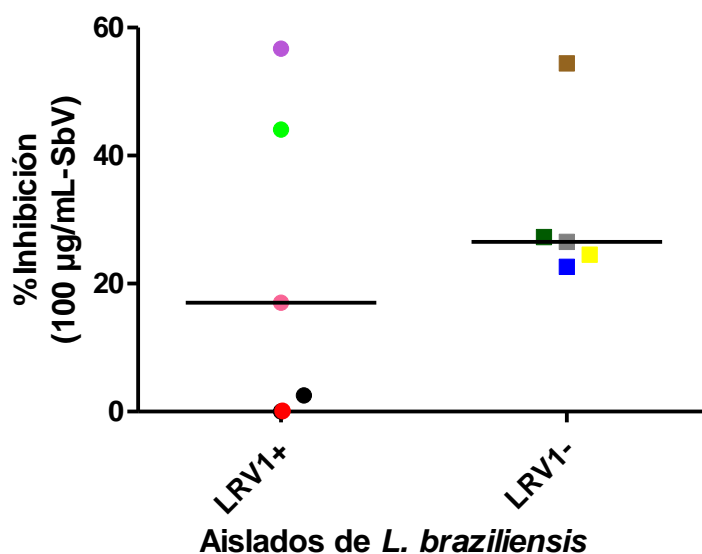


Figura 24.- Comparación del % de inhibición del crecimiento de aislados LRV1+ y LRV1- alcanzado en la máxima concentración (100 µg/mL) de Sb^V probada. Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa a presentar un % de inhibición más bajo frente a 100 µg/mL de Sb^V que aquellos aislados no infectados. Este % de inhibición del crecimiento de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- fue calculado usando los datos del ensayo de TryR. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. $p= 0.54$, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (% inhibición)	Rango (% inhibición)	Rango Inter cuartílico (% inhibición)
LRV1+	17.00	0.00-56.70	1.25-50.40
LRV1-	26.50	22.60-54.40	23.55-54.40

Tabla 19.- Estadísticos descriptivos de la comparación del % de inhibición del crecimiento de los aislados LRV1+ y LRV1- frente a 100 µg/mL de Sb^V.

Actividad basal de Tripanotión reductasa

De acuerdo a la ley de Lambert-Beer, la absorbancia medida es igual al coeficiente de extinción de un compuesto (e), multiplicado por la longitud de la trayectoria (l) y la concentración del compuesto en la muestra (c).

$$\text{Abs} = e c l$$

Basándonos en este principio, considerando al coeficiente de extinción molar del TNB²⁻: $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ellman, 1958) y la longitud de trayectoria igual a 1 cm, determinamos la cantidad de producto resultante en el ensayo de TryR, en condiciones de no exposición a drogas, para cada aislado. Para estimar la actividad de la enzima en la reacción, se normalizó estos datos por el Índice de infección, el cual representa el número de amastigotes intracelulares viables y replicativos presentes en la reacción. Los datos muestran concordancia entre el estatus de “susceptible” y “resistente” para las cepas M2903 y PER104, respectivamente, ya que la actividad de TryR obtenida para la última de estas fue aproximadamente el doble que para M2903, sugiriendo que una mayor actividad de TryR tendría algún papel importante en la susceptibilidad de los aislados a estímulos de estrés, tal como es predecible debido a su rol en el metabolismo redox de *Leishmania*. Sin embargo, no se ve una relación tan marcada en el resto de los aislados analizados, debido a la gran variabilidad de estos en su susceptibilidad a las drogas probadas.

Aislado	[producto] μM	Índice de infección	[producto]/I.I.
LC2176(LRV1+)	40.5	1160.0	0.0349
LC1568(LRV1+)	7.5	324.0	0.0231
LH2033(LRV1+)	25	355.0	0.0704
LC2043(LRV1+)	73	712.0	0.1025
PER191(LRV1+)	39.5	472.0	0.0836
LC2125 (LRV1-)	4.5	219.5	0.0205
LC1580(LRV1-)	7	142.0	0.0493
LC2123(LRV1-)	88.5	765.0	0.1157
LC2177(LRV1-)	27	957.0	0.0282
LC1565(LRV1-)	33	176.0	0.1875
<i>M2903</i>	9.5	448.0	0.0212
<i>(control susceptible)</i>			
<i>PER104</i>	6	142.0	0.0422
<i>(control tolerante)</i>			

Tabla 20.- Concentración de TNB²⁻ alcanzada en la reacción de TryR por cada aislado en condiciones de ausencia de droga.

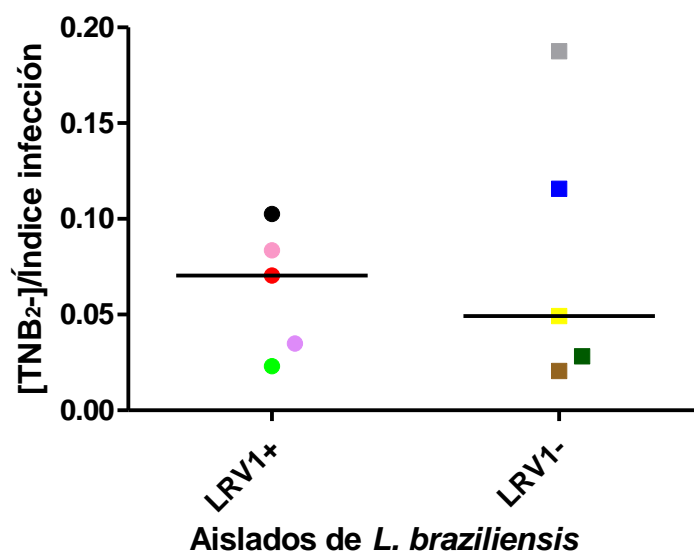


Figura 25.- Comparación de la cantidad de TNB²⁻ presente en la reacción de TryR en condiciones libres de droga para cada aislado, normalizado por el Índice de infección. Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa a generar más producto en la reacción de TryR (indicador de actividad enzimática) que aquellos aislados no infectados. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. p= 1.0, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (TNB²⁻/ I.I)	Rango (TNB²⁻/ I.I)	Rango Inter cuartílico (TNB²⁻/ I.I)
LRV1+	0.0704	0.0231-0.1025	0.0290-0.0931
LRV1-	0.0493	0.0205-0.1875	0.0244-0.1516

Tabla 21.- Estadísticos descriptivos de la comparación de la actividad enzimática de TryR en los aislados LRV1+ y LRV1- en ausencia de drogas.

Porcentaje de infección e índice de infección en macrófagos murinos. El

análisis con respecto a los resultados obtenidos para el porcentaje de infección alcanzado, así como el índice de infección en macrófagos murinos indican una tendencia a presentar mayores valores para aquellos aislados LRV1+ comparados con los aislados LRV1- (Figuras 26 y 27; Tablas 23 y 24).

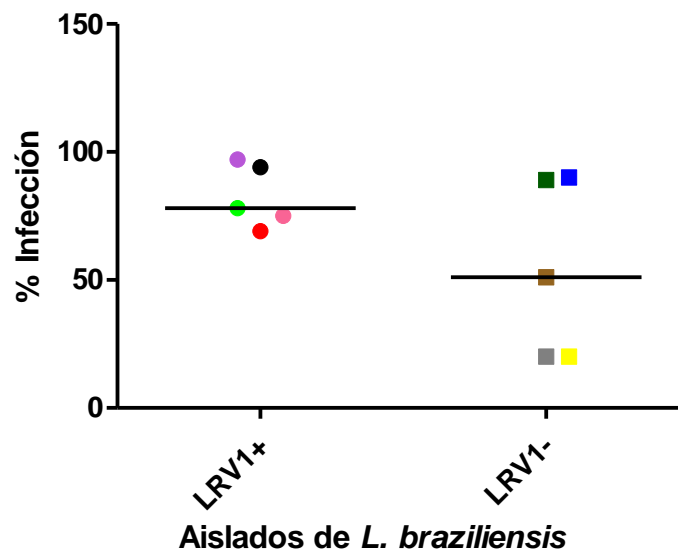


Figura 26.- Comparación de la infectividad de aislados LRV1+ y LRV1- (porcentaje de infección). Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 mostraron una tendencia que no fue estadísticamente significativa a tener mejor infectividad (evidenciada por el % de macrófagos infectados). La infectividad de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- fue analizada usando el método de microscopía. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. $p= 0.22$, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (% infección)	Rango (% infección)	Rango Inter cuartílico (% infección)
LRV1+	78.0	69.0-97.0	72.0-95.5
LRV1-	51.0	20.0-90.0	20.0-89.5

Tabla 22.- Estadísticos descriptivos de la comparación del porcentaje de infección en macrófagos murinos alcanzado de los aislados LRV1+ y LRV1-.

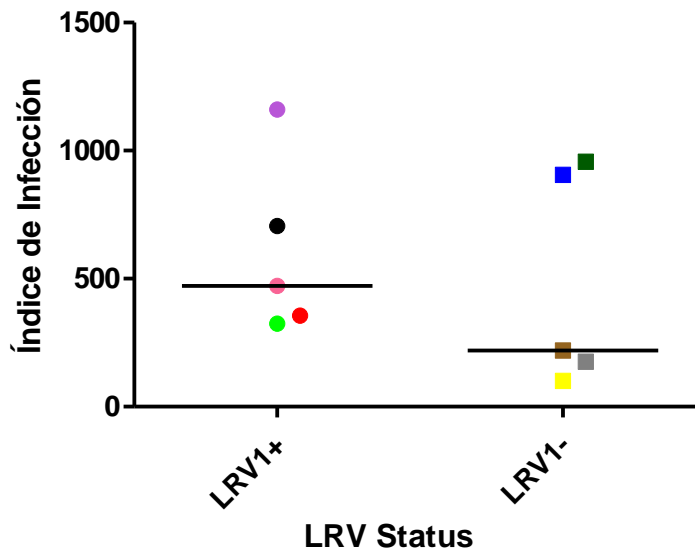


Figura 27.- Comparación de la infectividad de aislados LRV1+ y LRV1- (índice de infección). Aislados de *L.braziliensis* infectados por LRV1 mostraron una tendencia que no fue estadísticamente significativa a tener mejor infectividad en macrófagos murinos (evidenciada por el índice de infección). La infectividad de 5 aislados LRV1+ y 5 LRV1- fue analizada usando el método de microscopía. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana. $p = 0.22$, test de Mann-Whitney. Leyenda de colores: aislado LC2176 (morado), LC1568 (verde

claro), LC2043 (negro), LH2033 (rojo), PER191 (rosa), LC1565 (gris), LC2177 (verde oscuro), LC1580 (amarillo), LC2123 (azul), LC2125 (marrón).

Aislados de <i>L.braziliensis</i>	Mediana (Índice de Infección)	Rango (Índice de Infección)	Rango Inter cuartílico (Índice de Infección)
LRV1+	472.0	324.0-1160.0	339.5-932.5
LRV1-	219.5	100.0-957.0	138.0-931.5

Tabla 23.- Estadísticos descriptivos de la comparación del índice de infección en macrófagos murinos alcanzado de los aislados LRV1+ y LRV1-.

IX) DISCUSIÓN

El rol de LRV1 en los procesos celulares en su hospedero protozoario, *Leishmania*, no está bien entendido, y mucho menos el impacto de éste en la leishmaniasis en humanos. La presencia de LRV1 en parásitos de *Leishmania* agravó el curso de leishmaniasis en un modelo murino (Ives *et al*, 2011) y estuvo asociada con falla terapéutica y recaídas sintomáticas en pacientes humanos (Adaui *et al*, 2016; Bourreau *et al*, 2016).

Se ha postulado que LRV1 le confiere beneficios de supervivencia a su hospedero *Leishmania*, sea por una acción directa del virus sobre el metabolismo del parásito o indirectamente interfiriendo con la respuesta inmune innata del hospedero mamífero (Hartley *et al*, 2012; Eren *et al*, 2016; Hartley *et al*, 2016). Entre lo primero se ha hipotetizado que los parásitos LRV1+ tendrían una susceptibilidad reducida frente a condiciones de estrés oxidativo (Hartley *et al*, 2012). Se conoce que la tolerancia de *Leishmania* frente a estímulos de estrés biológico, físico y químico tiene un impacto sobre la virulencia de este parásito, en particular los tipos de estrés que el parásito encuentra durante su estadio en el hospedero mamífero, esto es, como amastigote intracelular (Bifeld y Clos, 2015).

En este contexto, el presente estudio intentó encontrar una posible asociación entre la presencia de LRV1 en *L.braziliensis* y una mayor tolerancia de este parásito frente a estímulos de estrés oxidativo/nitrosativo que simulan el ambiente hostil al que el parásito se enfrenta en las células hospederas mamíferas (macrófagos).

Para lograr esto, se escogió 5 aislados clínicos de *L.braziliensis* infectados y 5 no infectados con LRV1, provenientes de regiones endémicas para leishmaniasis tegumentaria en el Perú (Cusco, Madre de Dios y Junín), los cuales fueron expuestos a estímulos de estrés en el estadio de relevancia clínica, amastigote intracelular.

Se verificó la presencia viral en aquellos aislados de *L. braziliensis* calificados previamente como positivos para la infección (Aduai *et al*, 2016), y se cuantificó la cantidad relativa de transcritos virales (LRV1/G6PD) en el estadio promastigote de fase estacionaria mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). Los resultados muestran un amplio rango de niveles relativos de transcritos virales (desde 10 hasta aproximadamente 350 copias de transcritos virales por transcritos del parásito). Al estar trabajando con aislados clínicos, estos representan a poblaciones heterogéneas de parásitos encontrados naturalmente en la infección en humanos, lo cual podría explicar la gran variación con respecto al número de transcritos virales encontrado. En un estudio recientemente publicado, se estimó el número de copias de LRV1 por célula por el método de qRT-PCR, habiendo extraído ARN de un número conocido de células, usando una curva estándar establecida a partir de un genoma de LRV1 clonado en un plásmido. El resultado fue un promedio de 15 copias de LRV1 por célula (promastigote). Hay que resaltar que este ensayo se hizo a partir de una línea **clonal** de *L.guyanensis* LRV1+, lo cual asegura la homogeneidad de la población (Kuhlmann *et al*, 2017). Además, ese estudio reveló que el número de copias de LRV1 es mantenido a un “set point” específico, posiblemente a través de un balance entre la replicación

viral y la vía de RNA de interferencia (RNAi) presente en parásitos de *Leishmania* del subgénero *L. (Viannia)* (Brettmann *et al*, 2016; Lye *et al*, 2010).

Con el fin de demostrar que la infección viral persiste en los amastigotes intracelulares, estadio del parásito en el cual se realizó los ensayos de susceptibilidad a drogas, se seleccionó uno de los aislados clínicos de *L. braziliensis* y se analizó la cantidad relativa de transcritos virales en los estadios promastigote de fase estacionaria y amastigote intracelular (a las 48 horas post-infección de macrófagos), así como en la preparación de amastigotes axénicos (generados *in vitro* por exposición de promastigotes a pH ácido e incremento de temperatura) usados para la infección de macrófagos. Se encontró que los niveles de transcritos virales relativos fueron menores en amastigotes axénicos (66.8), pero mucho mayores en amastigotes intracelulares (16,562.5), con respecto a promastigotes de fase estacionaria (188.4). También, al hacer la estimación de niveles relativos de transcritos de LRV1/célula, se encontró que la “carga viral” fue mayor en el estadio de promastigotes (114.3) comparado con la preparación de amastigotes axénicos (48.2) y aún más que amastigotes intracelulares (10.84). Este hallazgo indicó que el número de copias de LRV1 es regulado durante las fases de crecimiento/diferenciación de los parásitos. Consistente con ello, un estudio previo que examinó transcritos de LRV1 durante el ciclo de crecimiento de promastigotes *in vitro* mostró que el número de copias de LRV1 se incrementa, a aproximadamente 130 copias por célula, cuando el parásito entra a la fase estacionaria (Chung *et al*, 1998).

Si bien el cultivo de amastigotes axénicos muestra la morfología característica del estadio amastigote intracelular, así como algunos aspectos moleculares y

bioquímicos, se ha demostrado que su virulencia es menor que aquellos amastigotes extraídos directamente de lesiones, lo cual indicaría que esta preparación difiere del fenotipo de “verdaderos” amastigotes (Fiebig *et al*, 2015). Se sabe, además, que el estadio amastigote está caracterizado por presentar transcripción y síntesis de proteínas reducida, lo que sugiere que los parásitos intracelulares entran a un estado de crecimiento lento con requerimientos metabólicos reducidos, comparados con los promastigotes (Alcolea *et al*, 2010; Lahav *et al*, 2011). Esto podría explicar la reducción en los niveles de transcritos de LRV1/célula entre estadios, así como la reducción de transcritos tanto virales (LRV1) como del parásito (*G6PD*) en amastigotes axénicos, y la aún más notoria disminución de los transcritos de *G6PD* en amastigotes intracelulares, lo cual genera que el ratio LRV1/*G6PD* se vea muy aumentado (Tabla 9). *G6PD* es un gen que codifica para una proteína cuyo rol es netamente metabólico [participa en el metabolismo de la glucosa, siendo la glicólisis un proceso menos activo en amastigotes que en promastigotes (Coombs *et al*, 1982)], lo cual explicaría por qué mostró niveles de expresión tan reducidos en el estadio intracelular (aproximadamente 3 copias de transcritos).

Para lograr exponer a los amastigotes intracelulares a los estímulos de estrés ocasionado por las drogas de interés, fue necesario estandarizar dos condiciones en el ensayo: 1.- el ratio de infección, que permita obtener un porcentaje de infección aproximado de 80% o mayor; y 2.- las concentraciones máximas de droga a usar, de modo que las células hospederas no se vean afectadas y el modelo amastigote-macrófago *in vitro* sea viable.

El ratio de infección que mostró mejores resultados fue 1:10 (macrófago:amastigotes axénicos). Sin embargo, los porcentajes de infección logrados por cada aislado clínico variaron mucho (20-97%). Esto se debe a que cada aislado crece de distinta forma en cultivo *in vitro*, estando algunos más adaptados que otros, lo cual les permite soportar mejor el proceso de infección, así como a las diferencias metabólicas entre aislados. Un problema que podría presentarse en caso de no alcanzarse un porcentaje de infección adecuado (Ej. LC1580 - 20% de infección) es la manifestación de un fenotipo de parásitos persistentes, los cuales están catalogados como un estado fisiológico diferente al de la población que ya murió (por exposición a la droga *in vitro*), y de este modo no estar representando la susceptibilidad real de la población de parásitos ante las drogas probadas.

En este estudio se usó un ensayo colorimétrico cuantitativo basado en la actividad enzimática de TryR, enzima esencial para la supervivencia del parásito, para analizar la viabilidad de los parásitos intracelulares de *L. braziliensis* una vez expuestos a los estímulos de estrés. Van den Bogaart *et al* (2014) describieron un método simple y robusto basado en la reducción enzimática de tripanotión disulfuro por la actividad específica de TryR en *Leishmania donovani* y *L. major* aplicado fácilmente en el modelo *in vitro* de amastigote-macrófago. Su aporte consistió en establecer las condiciones para que el ensayo funcione correctamente y validar este método al compararlo con el método convencional de microscopía, usado para evaluar la susceptibilidad de amastigotes intracelulares a drogas. Las curvas de inhibición del crecimiento, una vez expuestos a las drogas los aislados de *Leishmania* analizados, bajo los dos métodos mostraron ser dosis-

dependientes, y los valores de IC_{50} calculados estuvieron altamente correlacionados. En el presente estudio se aplicó el mismo ensayo para amastigotes intracelulares de *L.braziliensis*, encontrándose una alta correlación entre los resultados de la cinética de infección bajo el método de TryR y el de microscopía: La absorbancia registrada (TryR) y el índice de infección (microscopía) aumentaron conforme aumentó el ratio de infección y el tiempo post-infección (Figuras 12–15). Asimismo, se comprobó que el ensayo es específico para *Leishmania*, ya que los macrófagos no aportaron a la absorbancia registrada (Figura 10).

Los resultados de IC_{50} de los aislados de *L.braziliensis* frente a las drogas probadas no lograron tener diferencias estadísticamente significativas entre grupos (LRV1+ vs. LRV1-) y tampoco los grados de infectividad. Sin embargo, para el caso de SNAP, el % de infección e índice de infección se ve una tendencia a mayores valores alcanzados por el grupo de parásitos LRV1+ *versus* aquellos LRV1-. Con respecto a los % de inhibición del crecimiento alcanzados en la máxima concentración de drogas probada, para todos los casos se observa una tendencia de aquellos aislados LRV1+ a presentar menores valores (mayor resistencia) comparados con aislados LRV1- (evidenciado por las medianas), pero sin diferencias significativas luego de un análisis estadístico no paramétrico (Mann-Whitney).

Estos resultados podrían estar indicando dos escenarios: el primero, en el cual la presencia de LRV1 realmente no genera una diferencia en la susceptibilidad de los parásitos a los estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo probados; o el segundo,

en el cual el tamaño muestral empleado en este estudio no fue suficiente para lograr evidenciar una diferencia entre grupos (LRV1+ vs. LRV1) respecto a la susceptibilidad de los parásitos.

Con respecto a los resultados de susceptibilidad a Sb^V, se encontró que todos los aislados, excepto dos de ellos (LC2176 y LC2125), fueron tolerantes a las concentraciones de droga probadas (IC₅₀ > 100 µg/mL). Por este motivo, se decidió analizar los porcentajes de inhibición del crecimiento de los parásitos a esta concentración máxima. Así, se vio una correspondencia entre estatus de cepa control sensible (44% inhibición, cepa M2903) *versus* cepa control tolerante (12.5% de inhibición, aislado PER104), así como una tendencia de aquellos parásitos LRV1+ a presentar % de inhibición menores (mediana: 17%, mínimo: 0%) que aquellos parásitos LRV1- (mediana 26.5%, mínimo: 22.6%), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Yardley *et al* (2006) hipotetizaron que, debido a que la mayoría de aislados probados en su estudio fueron resistentes a Sb^V, pero difiriendo en su susceptibilidad a Sb^{III}, la resistencia a antimoniales sería un proceso acumulativo, donde los parásitos se vuelven resistentes primero a Sb^V y luego a Sb^{III}. Esto tiene sentido considerando que los antimoniales pentavalentes son pro-drogas, las cuales necesitan de su reducción a Sb^{III} para ejercer su actividad antileishmanial y las diferencias en susceptibilidad a Sb^{III} pueden estar definidas por diferencias en la activación de la droga y/o su permanencia en el parásito por mecanismos de eflujo.

De un estudio previo (Adui *et al*, 2016), donde se estableció las relaciones filogenéticas del virus en los aislados de *L.braziliensis* analizados (en base a la secuenciación parcial del gen de la cápside de LRV1 - Anexo 1), se determinó que los aislados LH2033 (PER014) y LC2043 (primer cluster – extremo superior del dendrograma- ambos con el mismo genotipo viral), así como LC1568 y LC2176 (último cluster – extremo inferior del dendrograma - ambos con el mismo genotipo viral) están cercanamente relacionados en cuanto a sus secuencias de LRV1, y que por co-evolución podría indicar cercanía genética de los parásitos. Coincidentemente, el primer grupo de aislados (LH2033 y LC2043) presentó porcentajes de inhibición de crecimiento a 100µg/mL de Sb^V muy bajos (0% y 2.5% respectivamente) y el segundo grupo (LC1568 y LC2176) mostró porcentajes considerablemente altos (44% y 56.7% - cercanos al alcanzado por la cepa control susceptible M2903: 44%). Esto podría sugerir la existencia de “subtipos” virales, los cuales interaccionarían con su hospedero (*Leishmania*) de forma distinta, generando fenotipos diferentes.

Finalmente, los datos de actividad basal de TryR para los aislados fueron muy variables dentro de cada grupo y entre grupos, observándose una tendencia de aquellos parásitos LRV1+ a presentar mayores niveles de actividad de TryR (evidenciado por mayor generación de producto en la reacción), pero sin diferencias significativas. Debido al rol vital de esta enzima en el metabolismo redox de *Leishmania*, se podría especular que aquellos parásitos más tolerantes a moléculas de estrés tengan mayores niveles de actividad de TryR, lo cual guardó correlación con los estatus de “susceptible” y “tolerante” de las cepas control (PER104 – tolerante – presentó el doble de actividad de TryR que M2903 –

susceptible-). También, se notó que 2 de las cepas analizadas mostraron niveles de TryR interesantes cuando se las asocia con sus susceptibilidades a las drogas probadas: LH2033 (TryR: 0.0704 [producto]/I.I.) mostró ser “resistente” a las 3 drogas analizadas (% de inhibición de 26.5, 0.0 y 16.1 para las máximas concentraciones probadas de Sb^{III}, Sb^V y SNAP, respectivamente) mientras que LC2125 (TryR: 0.0205 [producto]/I.I. – alrededor de 1/3 de LH2033, y muy similar a la cepa control susceptible) fue susceptible para las 3 drogas (% de inhibición de 87.8, 54.4 y 80.9 para las máximas concentraciones probadas de Sb^{III}, Sb^V y SNAP, respectivamente).

En un reporte previo de la actividad de TryR, en *Leishmania amazonensis*, se determinó que esta estuvo asociada con la capacidad de infectividad de los parásitos: su actividad estuvo aumentada en promastigotes en fase estacionaria (estadio infectivo), así como en la preparación de amastigotes axénicos con respecto a promastigotes no infectivos (Castro-Pinto et al, 2004).

Asimismo, Romao *et al* (2006) determinaron que los niveles de Glutación presentes en distintas cepas de *Leishmania* estarían asociados a su tolerancia a SNAP. La concentración de glutación en *L.amazonensis*, *L.donovani*, *L.major* y *L.braziliensis* fue 0.12, 0.10, 0.08 y 0.04 nmol/10⁷ parásitos respectivamente y, coincidentemente, los valores de IC₅₀ calculados para la exposición a SNAP para cada una de ellas fue de: 207.8, 188.5, 160.9 y 83 μM respectivamente, siendo más tolerantes aquellas que presentaron mayor concentración de Glutacion intracelular. Esto podría estar indicando que hay otros factores, además de la actividad de TryR, involucrados potencialmente en la tolerancia de los parásitos a estímulos de estrés.

En el presente estudio no fue posible establecer una relación de causa-efecto entre la presencia del virus y la tolerancia de los aislados LRV1+ frente a los distintos estímulos de estrés. Esto se debe a que nuestro diseño experimental estuvo enfocado en aislados clínicos de *L. braziliensis* y no en líneas isogénicas LRV+ y LRV-. Por este motivo, la gran variabilidad observada con respecto a la susceptibilidad de los aislados clínicos a las drogas probadas puede verse explicada por las diferencias genéticas entre aislados, así como por la heterogeneidad dentro de cada aislado.

Una forma de abordar este problema sería la obtención de clonas de cada aislado clínico. Esto aseguraría homogeneidad genética en la población, por lo menos para ciertas generaciones (Dujardin *et al*, 2007) y podría facilitar la estandarización de los experimentos; sin embargo, se aleja de la realidad en cuanto a que no representa el escenario natural encontrado en la infección en humanos. Otra alternativa es el uso de líneas isogénicas (parásitos genéticamente idénticos, que solo difieran en la condición de infección por LRV1). Hasta el 2016, no existía un protocolo reproducible para lograr la cura en el parásito de la infección viral. A inicios del 2017, Kuhlmann *et al* publicaron el hallazgo de análogos de nucleósidos (2'-C-metiladenosina – 2CMA-, y 7-deasa-2'-C-metiladenosina – 7d2CMA-) capaces de reducir fuertemente los niveles de cápside de LRV1 generando un mínimo impacto en el crecimiento del parásito (la concentración media efectiva -EC₅₀- de 2CMA para la inhibición de la cápside de LRV1 fue ~3 mM *versus* >100 mM para el crecimiento del parásito). Después de 6 duplicaciones celulares de crecimiento en presencia de 2CMA, el perfil de

cápside de LRV1 era indistinguible de aquellos parásitos LRV1-, lo cual permaneció así hasta 40 duplicaciones.

Otra forma reportada de obtener líneas isogénicas LRV1- es mediante RNAi (Bretmann *et al*, 2016). Se observó que mediante la expresión incrementada de siRNA específicos para LRV1, este fue eliminado y estos parásitos lograron generar sobre macrófagos el perfil de citoquinas característico de aquellos parásitos naturalmente LRV1-.

Analizar la susceptibilidad de líneas isogénicas de *L.braziliensis* a las drogas de interés sería un paso importante para esclarecer el rol de LRV1 en este fenómeno. Sólo así, teniendo líneas del parásito genéticamente idénticas y al virus como única variable, sería posible establecer una relación de causalidad entre el resultado de tolerancia a estrés obtenido y la presencia viral.

También, en futuros estudios empleando aislados clínicos sería importante seleccionar pares de aislados de *L.braziliensis* LRV1+ y LRV1- que estén genéticamente relacionados, escogidos en base a la información disponible del genoma de los parásitos y de LRV1 (secuenciación del gen de cápside) – datos en proceso de colección durante la realización de este estudio, por lo que no fue posible usar este criterio de selección–, lo cual daría la ventaja de tener poblaciones “naturales”, que ocurren normalmente en la infección en humanos, al mismo tiempo que exista la mayor cercanía genética posible entre los aislados.

Usando los datos generados en este estudio, se puede calcular el N muestral necesario para, en un estudio futuro, determinar una diferencia estadísticamente significativa entre grupos (LRV1+ vs. LRV1-). Tomando como base los datos

obtenidos para el análisis de porcentaje de inhibición del crecimiento en la máxima concentración de SNAP, se determinó el “n” muestral necesario en base a la fórmula:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * 2 * \sigma^2 / d^2$$

Donde se trabajó con datos de Nivel de confianza de 95% ($Z_{\alpha/2}=1.96$), Poder estadístico de 80% ($Z_{\beta}=0.84$), diferencia esperada entre las medianas de los dos grupos (LRV1+ y LRV1-) de 30 (d - basados en que la diferencia entre medianas del piloto fue 19.12 y no se encontró diferencias significativas-) y la varianza calculada a partir de los datos de la “población” del estudio piloto: 714.5 (σ^2).

Así, se determinó que el “n” muestral debería ser de 13 aislados en cada grupo (26 aislados en total) para poder determinar una diferencia estadísticamente significativa.

Finalmente, sería interesante, además, evaluar si existe alguna correlación entre la carga viral de LRV1 y la susceptibilidad del parásito a estímulos de estrés, lo cual no fue posible en este estudio debido a falta de poder estadístico.

¿Cómo LRV1 podría estar influenciando en la tolerancia del parásito frente a moléculas de estrés?

Algunas hipótesis fueron formuladas (Hartley *et al*, 2012), tal como la presencia de niveles incrementados de arginasa en aquellos parásitos LRV1+, lo cual ocasionaría la toma de arginina para la producción de poliaminas, moléculas que contribuyen al crecimiento del parásito, que a su vez disminuiría la disponibilidad de arginina para la producción de óxido nítrico por los macrófagos (Rath *et al*, 2014).

También, la presencia de transcritos virales podría tener cierto rol regulatorio post-transcripcional que modifique la abundancia de transcritos del parásito (Narayanan y Makino, 2014) que pudieran estar implicados en la tolerancia a moléculas de estrés, tales como tripanotión reductasa, arginasa, entre otros. Se sabe que, por ejemplo, el virus de la influenza es capaz de reducir la abundancia de mRNAs en el núcleo de la célula infectada, probablemente mediante la acción de una endonucleasa (Mohr, 2016).

Asimismo, una alternativa interesante sería el posible rol de LRV1 en la modulación de la producción de moléculas de estrés (radicales libres) sobre los macrófagos, lo cual estaría asociado a la menor exposición de los parásitos a estas, y una consecuente mayor supervivencia. Además, esto tendría un rol directamente sobre la falla terapéutica, ya que, como se mencionó antes, el mecanismo de acción de los antimoniales incluye la estimulación de los macrófagos para una mayor producción de moléculas de estrés que son parte del arsenal microbicida de estas células (Mookerjee *et al*, 2006).

X) CONCLUSIONES

- El grado de infección por LRV1 de los aislados clínicos de *L.braziliensis* analizados (niveles relativos de transcritos virales) mostró ser muy variable, presentando número de copias virales desde muy bajo (10 copias) a alto (350 copias).
- Se confirmó la presencia de LRV1 en dos estadios de *Leishmania* (promastigote de fase estacionaria y amastigote intracelular), así como en la preparación de amastigotes axénicos, mediante qRT-PCR.
- Se implementó y validó un ensayo enzimático colorimétrico basado en TryR en promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L.braziliensis*; el cual mostró ser dosis-dependiente, así como específico para *Leishmania*, y tener correlación con los métodos convencionales de estimación de viabilidad celular (MTT, Alamar blue y microscopía).
- Los resultados no sugieren una diferencia significativa entre los grupos de parásitos LRV1+ *versus* LRV1- para la susceptibilidad de estos hacia las drogas probadas o para el éxito de la infección en macrófagos murinos, por lo que no fue posible establecer una asociación entre la presencia de LRV1 y la tolerancia de los aislados a estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo.

XI) DIRECCIONES FUTURAS

Para obtener información más certera sobre la posible influencia de la presencia del virus LRV1 en la tolerancia de *Leishmania* a estímulos de estrés oxidativo y nitrosativo, será necesario explorar la susceptibilidad de más aislados clínicos (N=13 como mínimo en cada grupo) o de líneas isogénicas de *L.braziliensis* ante las drogas de interés, para lo cual se puede hacer uso de los nuevos inhibidores selectivos de LRV1 descritos por Kuhlmann *et al.* (2017).

Asimismo, de encontrarse una asociación entre la presencia viral y una tolerancia incrementada del parásito, habrá que analizar los mecanismos por los cuales esto estaría ocurriendo (rol de arginasa y tripanotión reductasa; rol de LRV1 en la respuesta inmune innata-efectora de los macrófagos, haciendo hincapié en su influencia en la producción de radicales libres, entre otros).

También sería interesante evaluar el papel de LRV1 en modelos *in vivo*, ya que asemeja mejor al ambiente al que se enfrentan los parásitos en la infección en humanos (no sólo participan macrófagos, sino otras células).

Con respecto al método validado de Tripanotión reductasa para la estimación de la viabilidad de parásitos intracelulares, sería importante comparar este método con ensayos de qPCR basados en kDNA u otros blancos.

XII) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acestor N, Masina S, Ives A, Walker J, Saravia NG, Fasel N. Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous Leishmaniasis. *J Infect Dis*; 2006; 194(8): 1160-1167.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*; 2016; 10(3): e0004349.
- Alcolea PJ, Alonso A, Gomez MJ, Moreno I, Dominguez M, et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. *Int J. Parasitol*; 2010; 40:1497–1516.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero H, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*; 2012; 7 (5): e35671.
- Adui V, Lye LF, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L et al. Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure of human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J Infect Dis*; 2016; 213(1): 112-121.
- Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J. Infect.Dis*; 2007; 195(12): 1846–1851.

- Armstrong TC, Keenan MC, Widmer G, Patterson JL. Successful transient introduction of *Leishmania* RNA virus into a virally infected and uninfected strain of *Leishmania*. Proc. Natl. Acad. Sci; 1993; 90(5): 1736-1740.
- Bifeld E, Clos J. The genetics of *Leishmania* virulence. Med Microbiol Immunol; 2015 ; 204(6):619-34.
- Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F et al. *Leishmania*-RNA virus presence in *L. guyanensis* parasites increases the risk of firstline treatment failure and symptomatic relapse. J Infect Dis; 2016; 213(1): 105-111.
- Bryceson AD, Chulay JD, Ho M, Mugambii M, Were JB, Muigai R et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. Clinical and immunological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg; 1985; 79(5): 700-704.
- Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhaes A et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. Parasite Immunol; 2007; 29(5): 251–258.
- Castro-Pinto D, Echevarria A, Genestra M, Cysne-Finkelstein L, Leon L. Trypanothione reductase activity is prominent in Metacyclic Promastigotes and Axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. J Enz Inhib and Med Chem; 2004; 19 (1): 57-63.

- Chung IK, Armstrong TC, Scheffer SM, Lee JH, Kim YM, Patterson JL. Generation of the Short RNA Transcript in *Leishmaniavirus* correlates with the growth of its parasite host, *Leishmania*. *Mol. Cells*; 1998; 8(1):54-61.
- Coombs GH, Craft JA, Hart DT. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. *Mol Biochem Parasitol*. 1982; 5(3):199-211.
- Costa DL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Silva NM, Milanezi CM, Cardoso CR et al . BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLoS Negl Trop Dis*; 2011; 5(3): e965.
- Dujardin JC, De Doncker S, Jacquet D, Bañuls AL, Balavoine M, Van Bockstaele D et al. Clonal propagation and the fast generation of karyotype diversity: An *in vitro* *Leishmania* model. *Parasitology*; 2007; 134 (1): 33-39.
- Ellman JG. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys*; 1958; 74: 443–450.
- Eren R, Reverte M, Rossi M, Hartley MA, Castiglioni P, Prevel F et al. Mammalian Innate Immune Response to a *Leishmania*-Resident RNA Virus Increases Macrophage Survival to Promote Parasite Persistence. *Cell & Host Microbe*. 2016; 20 (1): 318-328.
- Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*; 1992; 46 (1): 695-729

- Fichorova RN, Lee Y, Yamamoto HS, Takagi Y Hayes GR, Goodman RP. Endobiont Viruses Sensed by the Human Host – Beyond Conventional antiparasitic Therapy. PLoS One; 2012; 7(11): e48418.
- Fiebig M, Kelly S, Gluenz E. Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. PLoS Pathog. 2015; 11(10): e1005186.
- Fraga J, Rojas L, Sario I, Fernández-Caliènes A. Genetic characterization of three Cuban *Trichomonas vaginalis* virus. Phylogeny of Totiviridae family. Infect Genet Evol; 2012; 12(1): 113-20.
- Freitas M, CostaDaSilva AC, DosReis GA. Innate Immunity to *Leishmania* infection: within phagocytes. Mediators of Inflammation; 2014; 2014 (ID754965).
- Ghabrial SA, Nibert ML. *Victorivirus*, a new genus of fungal viruses in the family *Totiviridae*. Arch Virol; 2009; 154 (2): 373-379.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME et al . Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. BMC Infect Dis; 2007; 7 (1): 7.
- Goodman RP, Ghabrial SA, Fichorova RN, Nibert ML. *Trichomonasvirus*: a new genus of protozoan viruses in the family *Totiviridae*. Arch Virol; 2011; 156(1): 171-179.

- Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M et al. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. *J Biol Chem*; 2004; 279(30): 31010-31017.
- Gupta V, Deep A. An insight into *Leishmania* RNA Virus. *Indian J Med Microbiol*; 2007; 25(1): 7-9.
- Haldar AK, Sen P, Roy S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Mol Biol Intern*; 2011; 2011 (ID571242).
- Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J*; 2003; 369 (3): 529-537.
- Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiology*, 2012; 2 (99).
- Hartley MA, Drezler S, Ronet C, Beverley SM, Fasel N. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *Trends Parasitol*; 2014; 8 (1): 412–422.
- Hartley MA, Bourreau E, Rossi M, Castiglioni P, Eren R, Prevel F et al. *Leishmaniavirus*-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. *PLoS Pathog*; 2016; 12(9): e1005852.
- Heidary S, Bandehpour M, Valadkhani Z, Seyyed-Tabaee SJ, Haghghi A, Abadi AR et al. Double-stranded RNA viral infection in Tehran *Trichomonas vaginalis* isolates. *Iran J parasitol*; 2013; 8(1): 60-64.

- Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. *Science*; 2011; 331 (6018): 775-778.
- Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*; 2013; 51(6): 1826-1833.
- Khoshnan A, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol*; 1994; 68 (6): 4035–4038.
- Kuhlmann FM, Robinson JI, Bluemling GR, Ronet C, Fasel N, Beverley SM. Antiviral screening identifies adenosine analogs targeting the endogenous dsRNA *Leishmania* virus 1 (LRV1) pathogenicity factor. *Proc. Natl. Acad. Sci* ; 2017; 114(5): 811-819.
- Lahav T, Sivam D, Volpin H, Ronen M, Tsigankov P, Green A et al. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. *FASEB J*; 2011; 25 (2): 515–525.
- Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L et al. Clinical and Parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*; 2008; 46(2): 223-231.

- Macbeth KJ, Patterson JL. Overview of the *Leishmanivirus* Endoribonuclease and Functions of Other Endoribonuclease affecting viral gene expression. *J Exper Zool*; 1998; 282 (1-2): 254-260.
- Martínez-Calvillo S, Sunkin SM, Yan S, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;116(2):147-57.
- Mohr I. Closing in on the causes of host shutoff. *ELife*; 2016; 5: e20755.
- Mookerjee B J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S et al. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani* infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*; 2006; 50(5): 1788-1797.
- Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, Okwor IB et al. Infection with arginase deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol*; 2009; 183(12):8068–8076.
- Narayanan K, Makino S. Interplay between viruses and host mRNA degradation. *Biochim Biophys Acta*; 2014; 1829 (0): 732-741.
- Ogg MM, Carrion R, Botelho AC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, Patterson JL. Quantification of *Leishmania* Virus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 2003; 69(3):309-313.

- O'Neal S, Guimaraes LH, Machado PRL, Alcántara LM, Morgan DJ, Passos S et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J. Infect Dis*; 2007; 195 (1): 142-8.
- Opperdoes FR, Michels PAM. The metabolic repertoire of *Leishmania* and implications for drug discovery. *Annu Rev Microbiol*; 2008; 29: 467–483.
- Parmentier L, Cusini A, Müller N, Zangger H, Hartley MA, Desponds C, et al. Severe Cutaneous Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus Patient Coinfected with *Leishmania braziliensis* and Its Endosymbiotic Virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 94(4):840-3.
- Pereira LO, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 2013; 108(5): 665-667.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*; 1993; 91 (4): 1390-1395.
- Puentes F, Diaz D, Hoya RD, Gutierrez JA, Lozano JM, Patarroyo ME et al. Cultivation and characterization of stable *Leishmania guyanensis* complex axenic amastigotes derived from infected U937 cells. *Am J Trop Med Hyg*; 2000; 63 (1-2): 102–110.
- Rai S, Dwivedi UN, Goyal N. *Leishmania donovani* trypanothione reductase: Role of urea and guanidine hydrochloride in modulation of

- functional and structural properties. *Biochim Biophys Acta*; 2009; 1794 (10): 1474–1484.
- Rath M, Muller I, Kropf P, Closs E, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol*; 2014; 5:532.
 - Ro YT, Scheffer SM, Patterson JL. Hygromycin B resistance mediates elimination of *Leishmania* virus from persistently infected parasites. *J Virol*; 1997; 71 (12): 8991-8998.
 - Romao P, Fonseca S, Hothersall J, Noronha-Dutra A, Ferreira S, Cunha F. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology*, 1999; 118(6): 559-566.
 - Romao PRT, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS et al. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res*; 2006; 39 (3): 355-363.
 - Ronet C, Ives A, Bourreau E, Fasel N, Launois P, Masina S. Immune responses to *Leishmania guyanensis* infection in humans and animal models. En: Jirillo E, Brandonisio O (Eds). *Protozoa, Immune Response to Parasitic Infections*. Bentham eBooks 2010; 1: 165-76.
 - Ronet C, Beverley SM, Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: The ultimate subversion. *Virulence*; 2011; 2 (6): 547-552.
 - Souza A, Giudice A, Pereira J, Guimaraes LH, De Jesus AR, De Moura TR et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide:

- correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. *BMC Infect Dis*; 2010; 10: 209.
- Tovar J, Wilkinson S, Mottram J, Fairlamb A. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. *Mol Microbiol*; 1998; 29 (2): 653-660.
 - Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimaraes LH, Morgan DJ, Schriefer A et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*; 2009; 80 (4): 574-9.
 - Valencia C, Arevalo J, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Zimic M. Prediction score for antimony treatment failure in patients with ulcerative leishmaniasis lesions. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6: e1656.
 - Vanaerschot M, Maes I, Ouakad M, Aduai V, Maes L, De Doncker S et al. Linking In Vitro and In Vivo Survival of Clinical *Leishmania donovani* Strains. *PLoS One*, 2010; 5(8): e12211.
 - Van Den Bogaart E, Schoone GJ, England P, Faber D, Orrling KM, Dujardin JC et al. Simple Colorimetric Trypanothione Reductase-Based Assay for High-Throughput Screening of Drugs against *Leishmania* Intracellular Amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*; 2014; 58 (1): 527–535.
 - Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ et al. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. *Infect. Immun*, 2010; 78 (1):301–308.

- Widmer G, Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. Proc. Natl. Acad. Sci, 1989. 86 (15): 5979-5982.
- World Health Organization. Control of the leishmaniases. WHO Tech. Rep. Ser. 2010; 949:1–186.
- Wyllie S, Cunningham M, Fairlamb A. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. J Biol Chem, 2004. 279 (38): 39925-39932.
- Yardley V, Ortuño N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, De Doncker S, Ramirez L *et al.* Tegumentary Leishmaniasis: Is Antimonial Treatment Outcome Related to Parasite Drug Susceptibility? J Infect Dis 2006; 194 (8): 1168-1175.
- Zangger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley M-A, et al. Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites. PLoS Negl Trop Dis; 2013; 7(1): e2006.
- Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye LF, Akopyants NS, Dobson DE, et al. *Leishmania aethiopica* Field Isolates Bearing an Endosymbiotic dsRNA Virus Induce Pro-inflammatory Cytokine Response. PLoS Negl Trop Dis; 2014; 8(4): e2836.

XIII) LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Componentes de reacción de tratamiento de ARN con DNAsa.

Tabla 2.-Componentes de reacción de transcripción reversa.

Tabla 3.- Componentes de reacción de PCR en tiempo real.

Tabla 4.- Condiciones de ciclamiento de reacción de PCR en tiempo real.

Tabla 5.- Descripción de las variables a analizar por cada ensayo realizado y sus respectivas pruebas estadísticas.

Tabla 6.- Selección de aislados de *L.braziliensis*.

Tabla 7.- Cuantificación de ARN extraído con dos métodos distintos.

Tabla 8.- Niveles relativos de transcritos virales en aislados de *L.braziliensis* determinados por el método de qRT-PCR.

Tabla 9.- Niveles de transcritos de LRV1 y G6PD en todos los estadios de *Leishmania*.

Tabla 10.- Cinética de infección de la cepa de referencia *L.braziliensis* M2903.

Tabla 11.- Susceptibilidad de aislados de *L.braziliensis* a estímulos de estrés, su capacidad redox y de infección en macrófagos murinos.

Tabla 12.- Estadísticos descriptivos de la comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a SNAP.

Tabla 13.- Porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado con la máxima concentración de SNAP probada (300 μ M) para cada cepa analizada.

Tabla 14.- Estadísticos descriptivos de la comparación del % de inhibición del crecimiento de los aislados LRV1+ y LRV1- frente a 300 μ M de SNAP.

Tabla 15.- Estadísticos descriptivos de la comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a Sb^{III} .

Tabla 16.- Porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado con la máxima concentración de Sb^{III} probada (20 μ g/mL) para cada cepa analizada

Tabla 17.- Estadísticos descriptivos de la comparación del % de inhibición del crecimiento de los aislados LRV1+ y LRV1- frente a 20 μ g/mL de Sb^{III} .

Tabla 18.- Porcentaje de inhibición del crecimiento alcanzado con la máxima concentración de Sb^V probada (100 μ g/mL) para cada cepa analizada.

Tabla 19.- Estadísticos descriptivos de la comparación del % de inhibición del crecimiento de los aislados LRV1+ y LRV1- frente a 100 μ g/mL de Sb^V .

Tabla 20.- Concentración de TNB^{2-} alcanzada en la reacción de TryR por cada aislado en condiciones de ausencia de droga.

Tabla 21.- Estadísticos descriptivos de la comparación de la actividad enzimática de los aislados LRV1+ y LRV1- en ausencia de drogas.

Tabla 22.- Estadísticos descriptivos de la comparación del porcentaje de infección en macrófagos murinos alcanzado de los aislados LRV1+ y LRV1-.

Tabla 23.- Estadísticos descriptivos de la comparación del índice de infección en macrófagos murinos alcanzado de los aislados LRV1+ y LRV1-.

XIV) LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de la reacción acoplada de DTNB para la determinación de la actividad de tripanotión reductasa (Van Den Bogaart et al, 2014).

Figura 2.- Curva de crecimiento de *Leishmania braziliensis* M2903.

Figura 3.- Gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes al 1.5% para determinar la integridad del ARN extraído.

Figura 4.- Citotoxicidad de *Sb^{III}* sobre macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 5.- Citotoxicidad de *Sb^V* sobre macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 6.- Citotoxicidad de Amfotericina-B sobre macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 7.- Citotoxicidad de SNAP sobre macrófagos peritoneales de ratón.

Figura 8.- Cinética de infección de la cepa de referencia *L. braziliensis* M2903.

Figura 9.- Actividad de TryR dosis-dependiente.

Figura 10.- Tiempo-dependencia y especificidad de actividad TryR.

Figura 11.- Actividad de TryR dosis-dependiente en amastigotes axénicos.

Figura 12.- Cinética de Infección con el ensayo de actividad de TryR.

Figura 13.- Cinética de Infección con el ensayo de actividad de TryR (gráfico de barras).

Figura 14.- Cinética de Infección con ensayo de microscopía.

Figura 15.- Cinética de Infección con ensayo de microscopía (gráfico de barras).

Figura 16.- Comparación de tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a SNAP.

Figura 17.- Porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados de *L.braziliensis* alcanzado en la máxima concentración (300 µM) de SNAP probada.

Figura 18.- Comparación del % de inhibición del crecimiento de aislados LRV1+ y LRV1- alcanzado en la máxima concentración (300 µg/mL) de SNAP probada.

Figura 19.- Comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a Sb^{III}.

Figura 20.- Porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados de *L.braziliensis* alcanzado en la máxima concentración (20 µg/mL) de Sb^{III} probada.

Figura 21.- Comparación del % de inhibición del crecimiento de aislados LRV1+ y LRV1- alcanzado en la máxima concentración (20 µg/mL) de Sb^{III} probada.

Figura 22.- Comparación de la tolerancia de aislados LRV1+ y LRV1- frente a Sb^V.

Figura 23.- Porcentajes de inhibición del crecimiento de los aislados de *L.braziliensis* alcanzado en la máxima concentración (100 µg/mL) de Sb^V probada

Figura 24.- Comparación del % de inhibición del crecimiento de aislados LRV1+ y LRV1- alcanzado en la máxima concentración (100 µg/mL) de Sb^V probada

Figura 25.- Comparación de la cantidad de TNB²⁻ presente en la reacción de TryR en condiciones libres de droga para cada aislado, normalizado por el Índice de infección

Figura 26.- Comparación de la infectividad de aislados LRV1+ y LRV1- (porcentaje de infección).

Figura 27.- Comparación de la infectividad de aislados LRV1+ y LRV1- (índice de infección).

XV) LISTA DE ABREVIATURAS

2CMA: 2'-C-metiladenosina

7d2CMA: 7-deasa-2'-C-metiladenosina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Akt: proteína quinasa B

AQP1: Aquagliceroporina 1

ARN: Ácido ribonucleico

CC₅₀: concentración citotóxica 50

CCL4: quimiocina (motivo C-C) ligando 4

cDNA: ADN complementario

CP: proteína de cápside

CXCL10: quimiocina 10 (motivo C-X-C)

dsRNA: doble hebra de ARN

DTNB: 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

EC₅₀: concentración media efectiva

ED₅₀ : dosis efectiva 50%

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FAD: flavina adenina dinucleótido

G6PD: Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IC₅₀: concentración inhibitoria al 50%

IFN- γ : Interferón gamma

LC: Leishmaniasis cutánea

LMC: leishmaniasis mucocutánea

LRV1-: Aislados *Leishmaniavirus* negativos

LRV1: *Leishmaniavirus 1*

LRV1+: Aislados *Leishmaniavirus* positivos

LSU: “Long Subunit” – subunidad grande

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos.

mg: miligramos

mL: mililitros

mM: milimolar

MOPS: Ácido –morfolinopropano-1-sulfónico

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaNO₂: nitrito de sodio

NO: óxido nítrico

Sb^V-NO-R: parásitos resistentes tanto a *Sb^V* y a NO

Sb^V -NO-S: parásitos susceptibles tanto a Sb^V y a NO

$O_2^{\cdot -}$: radicales superóxido

OH^{\cdot} : radicales hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitrito

PI3K: fosfatidilinositol-3-fosfato quinasa

PKC: proteína quinasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

qRT-qPCR: Transcripción reversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN

RNAsas: enzimas que cortan el ARN.

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROOH: hidroperóxido

ROS: especies reactivas de oxígeno

Sb^{III} : Antimonio trivalente

Sb^V : Antimonio pentavalente

SFB: Suero fetal bovino

SNAP: S-nitroso-N-acetil-D-L-penicilamina

SSG: estibogluconato de sodio

SSU: “Small Subunit” – subunidad pequeña

T[S]₂: tripanotión disulfuro

T[SH]₂: dihidrotripanotión

TLR3: Toll-like receptor 3

TNB²⁻: 2-nitro-5-tiobenzoato

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TryR: Tripanotión reductasa

TVV: virus de *Trichomonas vaginalis* (*Trichomonasvirus*)

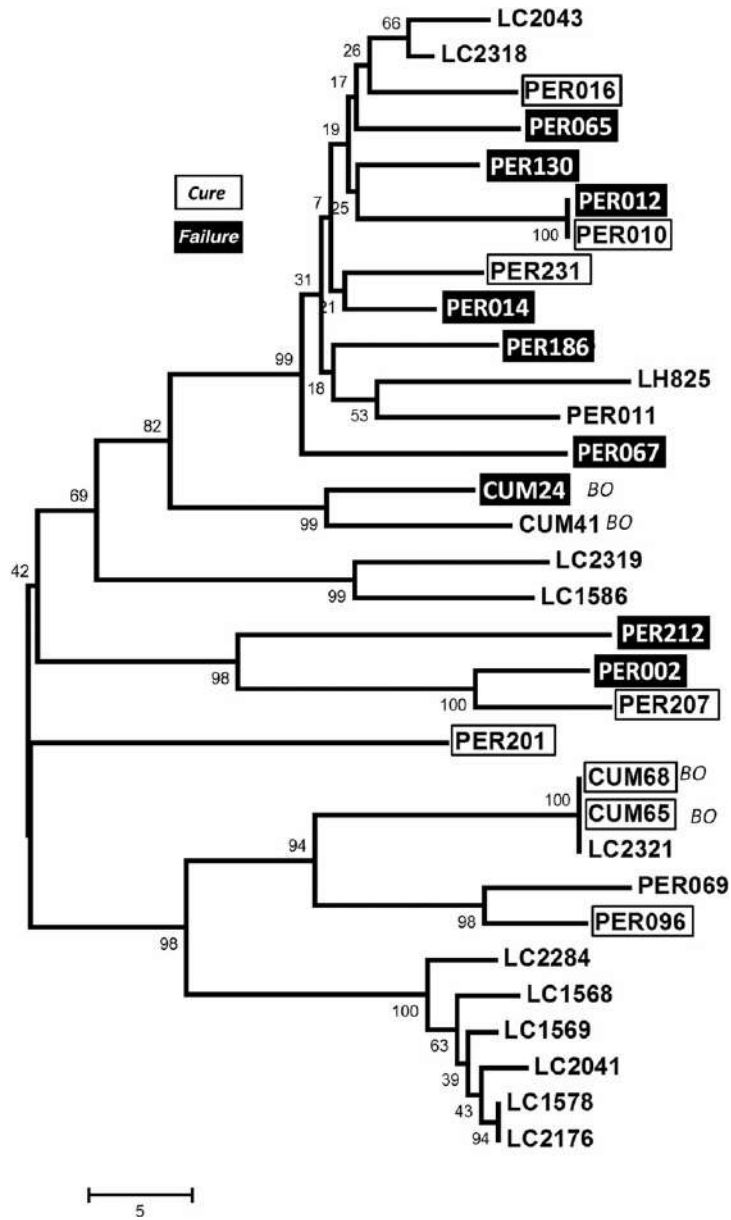
VIH: virus de inmunodeficiencia humana

μ g: microgramos

μ L: microlitros

μ M: micromolar

XVI) ANEXOS



Anexo 1.- Filogenia molecular de LRV1 y desenlace del tratamiento. (Figura 4 - Adui *et al*, 2016).