

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Potencial anti leishmania de las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes de la familia Viperidae

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autoras:

Emily Gabriela Córdova Jerves

CI: 0107335317

Correo electrónico: emicordovaj98@gmail.com

Katherine Pamela Niveló Tenesaca

CI: 0105916944

Correo electrónico: pamela.niveló.tenesaca@gmail.com

Tutor:

PhD. María Elena Cazar Ramírez

CI: 0602243800

Cuenca, Ecuador

20 de julio de 2022

Resumen:

La Leishmaniasis es una enfermedad tropical no atendida y causada por parásitos intracelulares del género *Leishmania* que se transmite por la picadura de mosquitos infectados. Esta patología puede ser de tres tipos: cutánea, mucocutánea y visceral, de los cuales los dos primeros son los más comunes en América Latina. El tratamiento de elección actual consiste en la administración de fármacos costosos, que generan toxicidad y resistencia en los pacientes. Por estos motivos, se han realizado estudios que utilizan la fosfolipasa A₂ (PLA₂, del inglés Phospholipase A₂) presente en los venenos de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, como alternativa terapéutica. Esta revisión bibliográfica narrativa recopila datos de estudios realizados desde el año 2015 hasta el año 2022, cuya información publicada en los mismos afirman el uso de las PLA₂ presentes en el veneno de los viperidos y demuestran su potencial farmacológico anti *Leishmania*, siendo esta investigación una herramienta que podrá ser utilizada como una base para generar prototipos de nuevas moléculas farmacológicas de menor toxicidad, tratamiento corto y de menor costo para la Leishmaniasis.

Palabras claves: *Leishmania*. Leishmaniasis. Veneno. Veneno de serpiente. Tratamiento. Toxinas. Enzimas. Leishmaniasis cutánea. Leishmaniasis mucocutánea. PLA₂. Viperidae. Péptidos.

Abstract:

Leishmaniasis is an unattended tropical disease caused by intracellular parasites of the *Leishmania* genus, transmitted via bite of infected mosquitoes. Three pathologies are reported due to Leishmaniasis: cutaneous, mucocutaneous and visceral, being the first two the most common in Latin America. The current treatment of choice is the administration of expensive drugs, generating toxicity and resistance in patients. For these reasons, phospholipase A2, present in the snake's venom, from the *iperidae* family, has been evaluated as a therapeutic alternative. This bibliographical review collects data from studies dated from 2015 to 2022. These reports confirm the use of PLA2 present in the venom of viperids and demonstrates its pharmacological potential against *Leishmania*. The present report would be used as a baseline to support further experimental research focused on new pharmacological molecules with less toxicity, more effectivity and less cost for Leishmaniasis treatment.

Keywords: *Leishmania*. Leishmaniasis. Venom. Snake venom. Treatment. Toxins. Enzymes. Cutaneous Leishmaniasis. Mucosal Leishmaniasis. PLA₂. Viperidae. Peptides.

ÍNDICE DEL TRABAJO

Resumen:	2
Abstract:	3
AGRADECIMIENTO.....	12
DEDICATORIA.....	13
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	15
INTRODUCCIÓN	16
I. MARCO TEÓRICO	20
I.1 PARASITOSIS	20
I.2 LEISHMANIASIS.....	20
1.2.1 HISTORIA DE LA LEISHMANIASIS	21
1.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	23
1.2.3 CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO.....	25
1.2.4 CLASIFICACIÓN Y PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	27
1.2.5 FORMAS DE TRANSMISIÓN.....	29
1.2.6 EPIDEMIOLOGÍA	30
1.2.7 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	33
I.3 VENENOS DE ANIMALES.....	35
1.3.1 VENENOS DE SERPIENTES (FAMILIAS)	36
1.3.2 COMPOSICIÓN DEL VENENO DE SERPIENTE DE LA FAMILIA VIPERIDAE.....	38
I.4 FOSFOLIPASA A ₂ (PLA ₂).....	40
1.4.2 EFECTOS TÓXICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LAS PLA ₂	43
I.5 EFECTO ANTI LEISHMANIA DE LAS PLA ₂	44

1.5.1 PÉPTIDOS DERIVADOS DE PLA ₂ CON ACTIVIDAD ANTI LEISHMANIA	46
II. MATERIALES Y MÉTODOS	48
II.1 DISEÑO DE ESTUDIO	48
II.2 RECOLECCIÓN DE DATOS	48
III. RESULTADOS	51
IV. DISCUSIÓN	63
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	72
V.1 CONCLUSIONES	72
V.2 RECOMENDACIONES	73
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Deformación de nariz y cavidad nasal en indígenas andinos.....	22
Figura 2. <i>Leishmania spp</i> : promastigote y amastigote.....	24
Figura 3. Ciclo de vida del agente etiológico.	27
Figura 4. Número de casos de Leishmaniasis en Ecuador por provincia.	32
Figura 5. Colmillos de serpientes venenosas.	37
Figura 6. Estructura tridimensional de PLA ₂ del grupo IA y grupo IIA.....	43
Figura 7. Potencial de las PLA ₂ del veneno de serpiente contra <i>Leishmania spp</i>	46
.....	
Figura 8. Diagrama de flujo de selección de artículos.	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género Leishmania de mayor interés en Parasitología Humana.....	24
Tabla 2. Etapas del ciclo de vida de Leishmania.	25
Tabla 3. Clasificación de la Leishmaniasis.....	28
Tabla 4. Condiciones asociadas a la Leishmaniasis.....	31
Tabla 5. Ejemplos de ensayos que demuestran el efecto anti leishmania de las PLA ₂	45
Tabla 6. Semejanzas en la metodología usada en los estudios in vitro.	60

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

EMILY GABRIELA CÓRDOVA JERVES en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Potencial anti leishmania de las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes de la familia *Viperidae***", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de julio de 2022



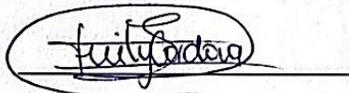
Emily Gabriela Córdova Jerves

C.I: 0107335317

Cláusula de Propiedad Intelectual

EMILY GABRIELA CÓRDOVA JERVES, autor/a del trabajo de titulación "**Potencial anti leishmania de las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes de la familia *Viperidae***", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 20 de julio de 2022



Emily Gabriela Córdova Jerves

C.I: 0107335317

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

KATHERINE PAMELA NIVELÓ TENESACA en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Potencial anti leishmania de las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes de la familia *Viperidae***", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de julio de 2022



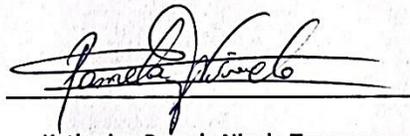
Katherine Pamela Niveló Tenesaca

C.I: 0105916944

Cláusula de Propiedad Intelectual

KATHERINE PAMELA NIVELO TENESACA, autor/a del trabajo de titulación “Potencial anti leishmania de las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes de la familia *Viperidae*”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 20 de julio de 2022



Katherine Pamela Niveló Tenesaca

C.I: 0105916944

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por brindarnos salud y vida; de la misma manera, agradecemos a nuestras familias por el amor y apoyo brindado durante nuestra vida académica.

A los docentes que con amabilidad nos compartieron sus conocimientos durante nuestra carrera universitaria; en especial a nuestra querida tutora PhD. María Elena Cazar, por brindarnos su experticia y tiempo para la realización de este trabajo. A nuestro querido profesor, PhD. Saulo Da Silva, por su apoyo, conocimiento y tiempo dedicado. También enviamos un agradecimiento especial a la Bqf. Maritza Ochoa por despertar el interés en el área de farmacia a través de su enseñanza.

A los amigos que nos han acompañado a lo largo de la carrera, con quienes hemos compartido buenos y malos momentos.

Emily & Pamela

DEDICATORIA

A mi mami, Carola, que es mi ejemplo a seguir y que a pesar de la distancia siempre esta a mi lado apoyándome, aconsejándome y dándome todo su cariño. A mi papi, Milton, por enseñarme el valor de la paciencia y la responsabilidad en la vida. A mi hermano, John, por estar conmigo para animarme, alentarme y ser mi compañía en todo momento.

A mis abuelitos, por demostrarme su amor, mimarme y confiar en mis capacidades. A mis tías, a las cuales considero como mis segundas madres y siempre están para mi. A mi Tomás, por estar a mi lado desvelándose durante toda mi carrera universitaria. A mi Coni, que llegó a mi vida para iluminar mis días y sacarme sonrisas con sus locuras. A mi Juan, por su apoyo y cariño incondicional.

A mi querida compañera de tesis y mejor amiga, Pamela, que desde que le conozco no ha hecho más que soportarme y hacerme reír todo el tiempo.

Emily Córdova

DEDICATORIA

A mi madre, Alexandra, por ser mi guía y soporte en mis victorias y derrotas, por enseñarme a ser responsable y honesta en todas las etapas de mi vida, por sus consejos y sus cálidos abrazos en cada momento oportuno. A mi padre, Luis, por enseñarme el amor incondicional y la valentía, por cuidar de nosotras a pesar de las dificultades que hemos enfrentado. Por todos sus sacrificios y por ser la fuerza que necesito para seguir mi camino.

A mi abuelita Mariana, por todos estos años que rezó por mi salud y bienestar, por su amor y cariño. A mi Uky, Nicolás y Bruno, por ser mi soporte emocional en los momentos de adversidad. A mi Shushel, que hoy ya no está en este mundo pero que en mi corazón siempre vivirá.

A mi querida Emily, por su invaluable amistad, cariño y lealtad.

Pamela Niveló

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

LC: Leishmaniasis cutánea

LV: Leishmaniasis visceral

LCM: Leishmaniasis mucocutánea

LCL: Leishmaniasis cutánea localizada

LCD: Leishmaniasis cutánea difusa

PLA₂: Fosfolipasa A₂

3FTx: Three-finger toxins

sPLA₂: Fosfolipasa A₂ secretora

cPLA₂: Fosfolipasa A₂ citosólica

iPLA₂: Fosfolipasa A₂ independiente de calcio

PAF-AH: Acetilhidrolasas de factor activador de plaquetas

Ca⁺⁺: Calcio

CdtV: Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

PGE₂: Prostaglantina E₂

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad tropical y subtropical desatendida de distribución mundial, siendo endémica en Asia, África, las Américas y en la región Mediterránea. Es causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*, que son transmitidos a través de la picadura de mosquitos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Arenas et al., 2017).

Existen tres formas clínicas principales de la enfermedad, que depende del tipo de células invadidas: 1) Leishmaniasis mucocutánea (**LCM**); 2) Leishmaniasis cutánea (**LC**); y 3) Leishmaniasis visceral (**LV**), de los cuales, los 2 primeros tipos son los más comunes en América Latina (Chakravarty & Sundar, 2019).

En Ecuador se ha reportado que la forma **LC** y **LCM** afectan principalmente a varones entre los 20 y 49 años. En el año 2015 el número de casos reportados por la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica fueron 1002, en 2017 se registraron 1380 casos, 1806 casos en 2018, 1566 casos en 2019, 924 casos en 2020 y hasta el mes de abril de 2021 se notificaron 414 casos. La situación epidemiológica de Ecuador señala a las provincias de Pichincha, Manabí, y Esmeraldas como las de mayor prevalencia. Este hecho se asocia a condiciones socio-económicas, ambientales y ecológicas, así como a la provisión de servicios básicos y el acceso a la atención oportuna en salud (Ministerio de Salud Pública, 2021).

El tratamiento es complejo y consiste en la administración por vía parenteral de antimonioatos como la metilglucamina o estibogluconato; sin embargo, se han implementado otros fármacos como la Anfotericina B, Miltefosina, Pentamidina, entre otros (Ponte-Sucre et al., 2017).

En la actualidad, se realizan estudios para encontrar alternativas terapéuticas que no generen resistencia, que sean menos tóxicas y que la duración del tratamiento sea más corta. Una de ellas, es la investigación de las moléculas que componen los venenos de animales, de los cuales, los más estudiados son de serpientes, arañas y escorpiones (Suranse et al., 2018). En cuanto al veneno de serpientes, los que tienen mayor importancia médica son los que pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae; siendo su composición muy semejante; donde aproximadamente el 70-90% está compuesto por proteínas (Modahl et al., 2020). Las enzimas principales presentes son L - aminoácido oxidasa, PLA₂, metaloproteinasas, serin proteasas, acetilcolinesterasas y hialuronidasas; mientras que, también se encuentran proteínas no enzimáticas como 3FTx, desintegrinas, inhibidores de proteasas, factor del crecimiento nervioso, etc. (Utkin, 2015).

Las PLA₂ secretadas en los venenos de serpientes pueden clasificarse en dos grupos: las del grupo IA, representado por serpientes de la familia Elapidae, Colubridae e Hydrophiidae, y las del grupo IIA que se encuentran presentes en los vipéridos (Viperidae) (Spolaore et al., 2019); siendo estas últimas las más

estudiadas con la finalidad de desarrollar nuevos fármacos debido a su actividad contra el cáncer y efectos antimicrobianos (Akef, 2017).

Actualmente, se evalúa el potencial farmacológico de las PLA₂ de los venenos de serpiente y su actividad anti *Leishmania*. Para esto, se han realizado estudios *in vitro*, que a pesar de que hayan iniciado a poco tiempo, ya se ha podido demostrar la efectividad de la PLA₂ en la destrucción del parásito, siendo un mecanismo dependiente de la dosis administrada (Barros et al., 2015).

Considerando la incidencia de casos de Leishmaniasis en Ecuador y en América Latina, la alta tasa de mortalidad según la OMS (World Health Organization, 2016), y las desventajas que presenta el tratamiento actual; es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean más efectivas para tratar la enfermedad.

La siguiente revisión bibliográfica narrativa recopiló información científica relevante que demuestran el potencial anti leishmania de la enzima fosfolipasa A₂ del veneno de serpientes de la familia Viperidae. Esta revisión de literatura aporta como base de información para futuras investigaciones a nivel experimental enfocadas al estudio de moléculas candidatas al desarrollo de fármacos que actúen contra los diferentes tipos de *Leishmania*.

Por consiguiente, los objetivos del trabajo de titulación planteados en este estudio son:

Objetivo General: Sistematizar la información científica disponible sobre el potencial efecto anti Leishmania de las Fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en los venenos de serpientes de la familia Viperidae.

Objetivos Específicos:

- Distinguir los diferentes tipos de PLA₂ presentes en los venenos de los vipéridos y sus diferentes grados de eficacia contra los parásitos que provocan la Leishmaniasis.
- Recolectar información científica acerca del potencial anti-Leishmania de las fosfolipasas A₂ procedentes de la familia Viperidae y presentarla en forma narrativa científica.
- Discernir el potencial biotecnológico de las PLA₂ como moléculas base para el desarrollo futuro de nuevos fármacos.

I. MARCO TEÓRICO

I.1 PARASITOSIS

Las parasitosis son enfermedades infecciosas causadas por parásitos, los cuales requieren de otro organismo conocido como huésped para cubrir sus necesidades básicas y vitales; lo que se conoce como parasitismo (Olalla Herbosa & Tercero Gutiérrez, 2011). Las parasitosis pueden ser causadas por protozoos que son microorganismos unicelulares o helmintos que, por otro lado, son microorganismos multicelulares (Botero & Restrepo, 2013).

I.2 LEISHMANIASIS

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria tropical y subtropical causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos mediante la picadura de mosquitos hembras del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Botero & Restrepo, 2013). Esta enfermedad se encuentra en todos los continentes excepto en Oceanía y es endémica en África, Sur de Europa, Medio Oriente y en América Latina; y según la OMS, es una de las siete enfermedades tropicales más importantes, representando un grave problema de salud mundial (Rojas Madriz, 2019; World Health Organization, 2016).

1.2.1 HISTORIA DE LA LEISHMANIASIS

Los orígenes de la Leishmaniasis no son claros, ya que existen teorías diferentes sobre su descubrimiento. La más aceptada indica que existieron especies de parásitos similares a *Leishmania* en la prehistoria. Fueron encontrados fósiles en la probóscide (apéndice tubular que sirve para comer y absorber) y en el tracto digestivo de una mosca (extinta) de la especie *Palaeomyia burmitis*. Un segundo fósil fue encontrado en otra especie de mosca extinta de la especie *Lutzomyia adiketis*. Esos dos hallazgos evidencian que las moscas de arena eran vectores de parásitos ancestrales similares a *Leishmania* en el Oligoceno medio al Mioceno temprano (Steverding, 2017). Posteriormente, se pensó que los parásitos ancestrales evolucionarán a las especies modernas de *Leishmania* en la era Mesozoica (245 a 65 millones de años atrás) antes de la desintegración de Pangea. Después de eso, se cree que las varias especies de los ancestros de *Leishmania* han evolucionado y migrado por cada continente derivado de la separación de la Pangea. Un interesante ejemplo es la migración de *L. infantum* desde el Mediterráneo hasta Latinoamérica, donde fue clasificada como *L. chagasi*.

En América, las primeras descripciones de leishmaniasis ocurrieron en el siglo XVI, ya que se reportó una enfermedad que afecta a los indígenas del lado este de la Cordillera de los Andes, la cual destruye la nariz y cavidades nasales. El médico cronista Cosme Bueno e Hipólito Ruiz en 1777, identifican el rol de los flebótomos

y hablan sobre una llaga corrosiva llamada “uta” de difícil curación, que se forma en el sitio de la picadura, generalmente en la cara (Sánchez et al., 2004).



Figura 1. Deformación de nariz y cavidad nasal en indígenas andinos.
Fuente: (Sánchez et al., 2004).

Las especies modernas de *Leishmania* empezaron a ser descubiertas en 1898, por el médico del ejército ruso Piotr F. Borovsky, que fue el primero en reconocer que las lesiones cutáneas de un paciente eran producidas por protozoos. Sin embargo, su publicación pasó desapercibida. En 1900, el patólogo escocés William Boog Leishman, descubrió cuerpos ovoides en frotis tomados del bazo de un soldado muerto con esplenomegalia y sugiere que sus hallazgos eran formas degeneradas de tripanosomas. En ese año, el médico Charles Donovan publicó un artículo informando el hallazgo de cuerpos similares en muestras esplénicas (Sánchez et al., 2004).

Investigaciones posteriores indicaron que los cuerpos ovoides no eran tripanosomas, sino un nuevo protozoo que fue llamado *Leishmania donovani* causante de la LV. En 1908, se describen las características de las llagas “uta” y la

enfermedad se denomina Leishmaniasis cutánea andina (Sánchez et al., 2004). Años más tarde, se descubrió la especie *L. infantum* en niños de la región de Túnez (norte de África) que padecían anemia esplénica y en perros. Desde ese entonces, han sido considerados que hombres y otros animales son reservorios importantes de parásitos que producen las tres formas de Leishmaniasis (Pace, 2014; Steverding, 2017).

1.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Los parásitos del género *Leishmania*, son protozoos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, siendo característico que sufren cambios morfológicos durante la transición entre etapas de su ciclo de vida, ya sea en los vertebrados o invertebrados. Son pequeños y las características morfológicas dependen de las formas parasitarias en las que se encuentren: 1) los amastigotes son ovalados o redondeados que miden de 2 a 5 micras de longitud, posee núcleo y cinetoplasto, sin embargo, no posee flagelo y se encuentran en los macrófagos del vertebrado infectado; y 2) los promastigotes que son la forma infectante del parásito, son flagelados; por lo tanto son móviles y alargados que miden entre 15 a 25 micras de longitud, además poseen un solo núcleo y el cinetoplasto que puede ser terminal o subterminal (Melby et al., 2019; Rojas Madriz, 2019).

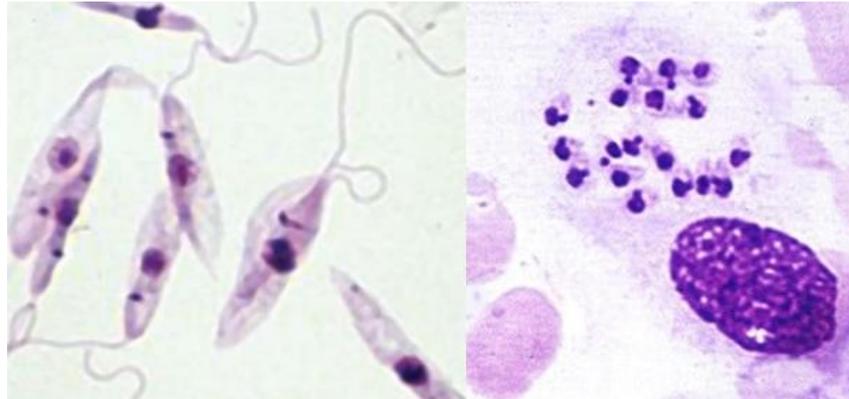


Figura 2. *Leishmania* spp: promastigote y amastigote.
Fuente: (Pereira & Pérez, 2002).

El género *Leishmania*, tiene dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*; y cada uno se divide en complejos que dependen de las características bioquímicas y moleculares que presenten (Botero & Restrepo, 2013; Tariq et al., 2020).

Tabla 1. Especies del género *Leishmania* de mayor interés en Parasitología Humana. **Fuente:** (Botero & Restrepo, 2013).

Subgénero	Complejo de especies	Especies asociadas	Localización geográfica
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	Europa, Asia, África
		<i>L. archibaldi</i>	Europa, Asia, África
		<i>L. infantum</i>	Europa, Asia, África y América
		<i>L. tropica</i>	América
	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i> <i>L. killicki</i> <i>L. major</i>	Europa, Asia, África
	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. aristidesi</i> <i>L. garnhami</i>	Europa, Asia, África
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. garnnam</i>	América

		<i>L. pifanoi</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	
<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. brasiliensis</i>	América
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. peruviana</i>	
	<i>L. lindebergi</i>	<i>L. guyanensis</i>	
	<i>L. utingensis</i>	<i>L. panamensis</i>	
	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. colombiensis</i>	
	<i>L. naiffi</i>	<i>L. equatorensis</i>	

1.2.3 CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

Para que el parásito pueda sobrevivir y comenzar su ciclo de vida, va a depender de la relación entre el vector y el reservorio (Pace, 2014).

En el ciclo de vida de las especies de *Leishmania*, se identifican dos formas morfológicas: una extracelular flagelada conocida como promastigote, el cual se encuentra dentro del vector; y la forma intracelular no flagelada presente en los macrófagos del huésped, conocida como amastigote (Botero & Restrepo, 2013).

Las etapas del ciclo de vida del parásito se explican en la Tabla 2:

Tabla 2. Etapas del ciclo de vida de *Leishmania*.

ETAPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
1	El vector se infecta tras succionar la sangre de un vertebrado que contenga macrófagos con amastigotes del parásito; los cuales se desarrollan dentro del fagocito hasta ser liberados por lisis.	(Botero & Restrepo, 2013).

<p>2 Y 3</p>	<p>En el tubo digestivo del invertebrado, los amastigotes evolucionan y desarrollan su flagelo, dando origen a los promastigotes. Estas formas del parásito se reproducen por fisión binaria en diferentes zonas del tracto digestivo de la mosca, ya sea en la parte posterior, anterior o ambos.</p>	<p>(Botero & Restrepo, 2013; Tariq et al., 2020).</p>
<p>4 Y 5</p>	<p>Cuando el mosquito ya presenta la forma infectante del parásito (promastigotes) en sus partes bucales; puede picar a un vertebrado, e inocular los parásitos; los cuales en la LC infectan los macrófagos de la piel.</p>	<p>(Melby et al., 2019).</p>
<p>6, 7 Y 8</p>	<p>Cuando las células se llenan de esas formas, estallan y los amastigotes son liberados para infectar los macrófagos vecinos.</p>	<p>(Melby et al., 2019).</p>

La **LC** y **LCM** están relacionadas, ya que la segunda forma se produce porque la enfermedad cutánea se propaga a las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. Por otro lado, en la **LV**, los amastigotes que son liberados de los macrófagos de la piel, pasan a la circulación sanguínea e infectan células del sistema reticuloendotelial de los órganos internos como el hígado, bazo, médula ósea, ganglios e intestino (Anversa et al., 2018).

Las etapas de desarrollo del parásito, descritas en la Tabla 2 se presentan en la Figura 3.

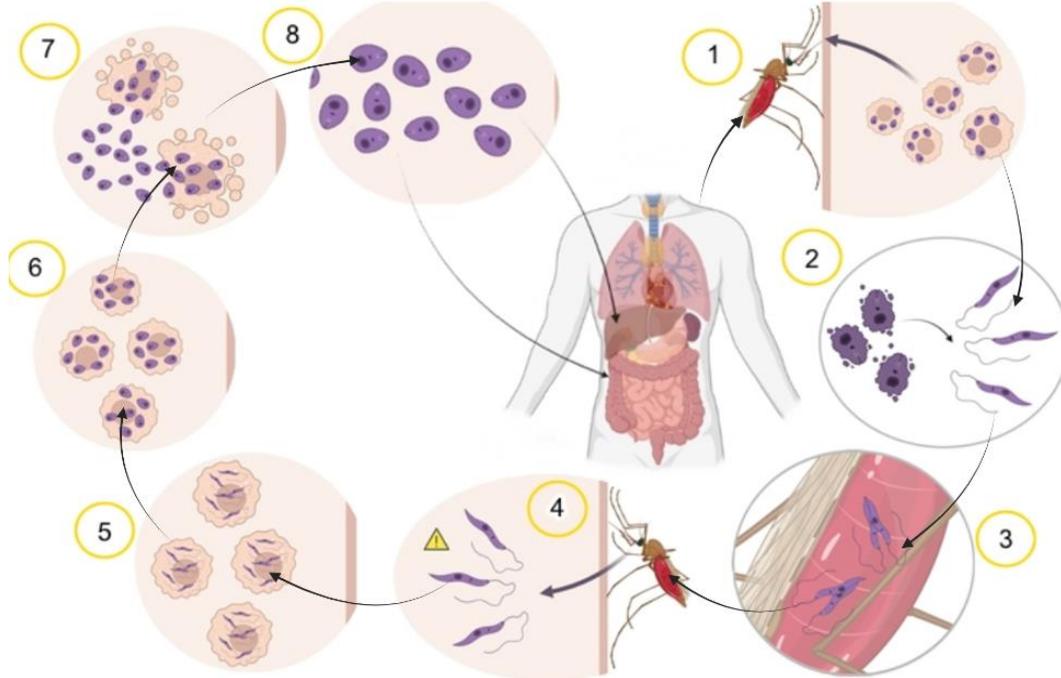


Figura 3. Ciclo de vida del agente etiológico.
Fuente: (Córdova & Niveló, 2022).

1.2.4 CLASIFICACIÓN Y PRESENTACIÓN CLÍNICA

La Leishmaniasis se puede clasificar en tres entidades clínicas según el tipo de células invadidas y la localización de las manifestaciones: 1) Leishmaniasis mucocutánea (**LCM**) que afecta a las membranas de las mucosas; 2) Leishmaniasis cutánea (**LC**), que produce úlceras cutáneas y nódulos; y 3) Leishmaniasis visceral (**LV**) que afecta a órganos internos (Chakravarty & Sundar, 2019). Las manifestaciones clínicas de las tres formas son muy variadas y difieren entre ellas según el grado de severidad, que depende de la especie involucrada y de la respuesta inmune del huésped, como se detalla en la Tabla 3:

Tabla 3. Clasificación de la Leishmaniasis.

TIPO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
LC	Causada por <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. major</i> y <i>L. aethiopica</i> . Se subdivide en LC localizada (LCL) y en LC difusa (LCD) dependiendo si la lesión es única o múltiple. La primera forma ocurre en un área expuesta al vector como la cara, cuello y extremidades. La segunda forma logra diseminarse, desarrollando úlceras que se pueden asociar a una linfadenopatía; siendo una forma muy difícil de tratar y no se cura espontáneamente.	(Arenas et al., 2017) (Pace, 2014) (Anversa et al., 2018)
LCM	Causada por <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> y <i>L. panamensis</i> . Se caracteriza por la presencia de lesiones localizadas en las mucosas principalmente de la boca, tracto respiratorio superior e inferior, y se puede producir por la diseminación de los parásitos de una lesión cutánea localizada de evolución crónica por vía hematógena o linfática hacia las mucosas aledañas.	(Arenas et al., 2017) (Anversa et al., 2018)
LV	Causada por <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum chagasi</i> , <i>L. amazonensis</i> y <i>L. tropica</i> . Se manifiesta por linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, fiebre, astenia y pérdida de peso; pudiendo causar la muerte de la persona infectada debido a complicaciones o infecciones superpuestas.	(Chakravarty & Sundar, 2019) (Tovar & Yasnot, 2017)

1.2.5 FORMAS DE TRANSMISIÓN

Los parásitos del género *Leishmania*, son transmitidos por la picadura de mosquitos hembras del género *Lutzomyia* en América, y el género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África. Estos mosquitos pertenecen a la familia Psychodidae y a la subfamilia Phlebotominae; siendo la razón por la cual se les conoce como flebótomos o flebotomíneos (Botero & Restrepo, 2013). Son dípteros muy pequeños que miden entre 2 y 5 mm.

En América, existen 3 géneros: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*; siendo el primero el más importante y se han descrito en Ecuador más de 60 especies, 133 en Colombia, 99 en Perú y 192 en Brasil (Arrivillaga et al., 2017; Botero & Restrepo, 2013).

Existen dos tipos de transmisión: 1) antroponótica, donde los seres humanos son el principal reservorio del parásito; y 2) zoonótica, siendo otros mamíferos los reservorios como perros, roedores y marsupiales (Steverding, 2017). Leishmaniasis visceral (**LV**) es de transmisión antroponótica en el sur de Asia y en África; mientras que en la región del Mediterráneo, Oriente Medio y Américas, la transmisión de **LV** es zoonótica, donde los perros son los principales reservorios de los parásitos (Chakravarty & Sundar, 2019). Leishmaniasis cutánea es de transmisión zoonótica (excepto la causada por *L. tropica*) que es considerada antroponótica. Por otro lado, la **LCM** se presenta por una transmisión zoonótica, cuyos reservorios principales son los roedores y los perros (Melby et al., 2019).

1.2.6 EPIDEMIOLOGÍA

La Leishmaniasis es una patología desatendida, de distribución mundial y es endémica en Asia, África, las Américas y en la región Mediterránea. Mundialmente se estima que, entre 12 y 15 millones de personas están infectadas y, se reportan alrededor de 0,9 a 1,6 millones de nuevos casos cada año. Además, alrededor de 350 millones de personas se encuentran bajo el riesgo de contraer la enfermedad, principalmente **LC**; y entre 20.000 y 30.000 defunciones anualmente (World Health Organization, 2016). En las Américas, anualmente, se registran aproximadamente 56.000 casos de **LC** y **LCM**; y 3.800 casos de **LV**, que presentan alrededor del 7% de letalidad. En el 2017, la Organización Panamericana de Salud reportó 49.959 casos en 17 países endémicos; siendo Brasil el país con más casos de **LC** y **LCM**; sin embargo, se registra un aumento de casos en comparación al 2016 en El Salvador, Argentina, México, Costa Rica y Ecuador (Silveira et al., 2018).

La **LC** es endémica en 18 países: Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México; mientras que la **LV** es endémica en Brasil, Argentina, Paraguay, Colombia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Bolivia, Guyana y México (World Health Organization, 2016). Los países con el mayor número de casos de **LV** son: India, Sudán del Sur, Sudán, Etiopía y Somalia; mientras que el 90% de casos de **LC** y **LCM** se presenta en Afganistán, Argelia, Pakistán y la República Árabe Siria, Marruecos, Nicaragua, Sudán, Túnez, Yemen y en países de América del Sur como

Brasil, Perú y Colombia (Arenas et al., 2017). Por otra parte, más del 90% de los casos de Leishmaniasis mucocutánea se producen en el Brasil, el Estado Plurinacional de Bolivia, Etiopía, Perú y Ecuador (OMS, 2021)

Esta enfermedad al ser endémica en Ecuador se asocia a condiciones que se describen en la Tabla 4:

Tabla 4. Condiciones asociadas a la Leishmaniasis.

CONDICIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
SOCIO ECONÓMICA	Pobreza, migración, personas en edad productiva (hombres entre 15 a 50 años de edad), que realicen actividades en zonas rurales, escaso acceso a la atención oportuna en salud y precariedad de medios y condiciones sanitarias.	(Izaguirre et al., 2017) (Maia-Elkhoury et al., 2021)
AMBIENTAL	Ambientes con altitudes que varían entre 0 a 1500 msnm, temperaturas superiores a 20 °C y precipitaciones anuales de 1500 a 3000 mm, la presencia de bosques y los tipos de vegetación de la zona, humedales.	(Calvopiña et al., 2012).
ECOLÓGICA	Deforestación, minería, reducción o eliminación de las campañas de fumigación, grado de urbanización, desarrollo agrícola y avícola, incremento de la población canina y la eliminación de	(Izaguirre et al., 2017) (Maia-Elkhoury et al., 2021) (Gutiérrez, 2014)

desechos que genera un aumento de roedores.

En Ecuador las formas más comunes de Leishmaniasis son la cutánea y mucocutánea; siendo la primera la más importante. En el año 2016 fueron registrados 1397 casos; en 2017, se registraron 1654 casos, 1336 en el 2018, 1108 casos en 2019, 924 en el 2020 y 1223 casos en 2021, siendo las provincias de Pichincha, Manabí y Esmeraldas las más afectadas siendo la mayoría de infectados pacientes masculinos (Ministerio de Salud Pública, 2021). Las especies de *Leishmania* más comunes son: *L. amazonensis*, *L. equatoriensis*, *L. mexicana*, *L. naiffi* y *L. panamensis*; por otro lado, los vectores más comunes son del género *Lutzomyia*, siendo las principales especies *L. flaviscutellata*, *L. ayacuchensis*, *L. hartmanni* y *L. cruciata* (Silveira et al., 2018).

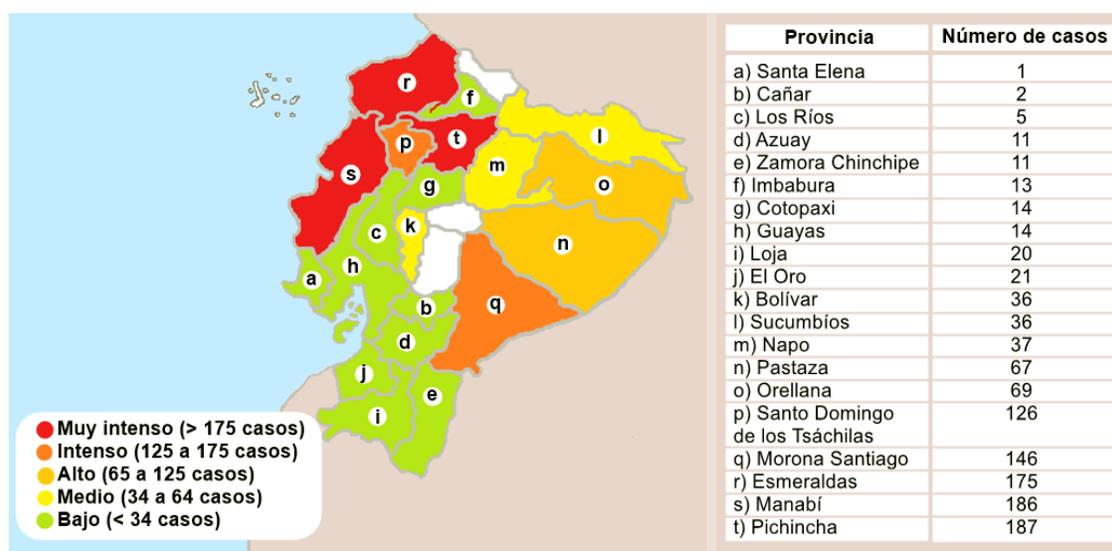


Figura 4. Número de casos de Leishmaniasis en Ecuador por provincia.
Fuente: (Córdova & Niveló, 2022) & (Ministerio de Salud Pública, 2021).

1.2.7 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El objetivo del tratamiento de la Leishmaniasis, es atacar al parásito intracelular (amastigote), por lo cual, se considera complejo y tóxico. La Leishmaniasis de América tiene un comportamiento más agresivo, mayor capacidad de provocar **LV** y mayor posibilidad de generar resistencia terapéutica. El tratamiento de primera línea para tratar la patología es sistémico; sin embargo, se puede considerar la vía de administración intralesional como de segunda línea o coadyuvante (Piccolo et al., 2018).

Principalmente se utilizan los antimoniatos o antimoniales pentavalentes (Sb^{+5}) (antimoniato de meglumina o estibogluconato de sodio) por vía intramuscular. El mecanismo de acción de estos medicamentos es la inhibición de la glucólisis y de la oxidación de ácidos grasos de los amastigotes, disminuyendo así la producción de ATP. El principal problema es la ventana terapéutica tan estrecha ya que generan efectos hepato y cardiotóxicos; y es teratogénico. Existen otros efectos adversos como dolores musculares, vómitos, náuseas, diarrea, dolor abdominal, anorexia, astenia, fiebre, urticaria, eritema, edema y cefalea (Piccolo et al., 2018). Este medicamento se sigue utilizando en la actualidad ya que mediante estudios se ha determinado que la curación con metilglucamina es de un 88%, y con estibogluconato es 51%; sin embargo, en India se ha documentado alta resistencia ya sea por el uso indiscriminado ya que es de venta libre, por iniciar a bajas dosis e irlo incrementando o por dividir la dosis diaria total en dos para administrarse dos veces al día (Ponte-Sucre et al., 2017).

La miltefosina es un análogo de la fosfocolina y es el primer fármaco desarrollado para ser administrado por vía oral para el tratamiento de Leishmaniasis y fue implementado como alternativa a los casos de resistencia de los parásitos, principalmente en India, demostrando tasas de curación del 95% (Piccolo et al., 2018). El mecanismo de acción se desconoce, ya que primeramente se investigó como un antineoplásico; sin embargo, parece actuar en el metabolismo de los fosfolípidos de membrana celular del amastigote. No obstante, debido a su forma de administración se ha observado que afecta el tracto gastrointestinal generando: vómito, náuseas, cefalea, diarrea; también genera hepato y nefrotoxicidad, y es teratogénico (Chakravarty & Sundar, 2019).

La pentamidina es una diamidina que se administra por vía intramuscular y se utiliza cuando las lesiones cutáneas no han sanado después del tratamiento con antimoniatos, cuando han quedado recidivas, cuando se han presentado reacciones adversas o cuando los otros tratamientos están contraindicados (Botero & Restrepo, 2013). El mecanismo de acción no está claro; sin embargo, se cree que puede interferir en la síntesis de ADN y ARN. Las reacciones adversas más comunes son mialgias, anorexia, hipotensión, náuseas, astenia, fatiga e hipoglucemia (Chakravarty & Sundar, 2019).

La anfotericina B es un agente antifúngico que se utiliza como tratamiento de segunda línea en la Leishmaniasis. Su mecanismo de acción se basa en la alteración de la composición de los ésteres de la membrana citoplasmática, generando así cambios en la permeabilidad con pérdida del contenido

citoplasmático y muerte celular. Este fármaco es administrado por vía parenteral, que, a pesar de ser eficaz, es también es altamente tóxica y cuando se inyecta en su forma desoxicolato libre desencadena reacciones adversas como hipokalemia, fiebre, escalofríos, miocarditis y nefrotoxicidad por lo que se debe administrar en ambiente hospitalario (Piccolo et al., 2018; Ponte-Sucre et al., 2017).

Otros fármacos que han sido utilizados con menos efectividad son: alopurinol, itraconazol, ketoconazol y pirimetamina; sin embargo, su uso no previene las complicaciones mucosas que se pueden presentar por una **LC** no curada completamente.

I.3 VENENOS DE ANIMALES

Durante la evolución, los animales han desarrollado órganos especiales para la producción y excreción de venenos; siendo los animales venenosos terrestres más estudiados serpientes, arañas y escorpiones (Utkin, 2015). Para Mebs, (2002) el veneno de un animal es definido como “una sustancia compleja producida en una glándula especializada y administrada por un aparato especializado asociado, que es perjudicial para otros organismos en una dosis dada y se usa activamente en la subyugación, digestión de presas y/o defensa”. Otra definición es que “los venenos son mezclas complejas de diversos compuestos químicos que interrumpen el funcionamiento fisiológico de la víctima para ayudar al animal en su defensa o alimentación” (Suranse et al., 2018).

El uso de los venenos y toxinas de los animales ha permitido la aclaración de procesos fisiológicos importantes como la neurotransmisión, hemostasia, apoptosis y transducción de señales (Mackessy, 2010); por tal motivo, se da paso a la investigación de efectos farmacológicos que puedan tener estos compuestos debido a que el desarrollo de nuevos fármacos es vital, y se desarrolla a partir de la proteómica y genómica utilizando venenos para favorecer su investigación (Utkin, 2015).

1.3.1 VENENOS DE SERPIENTES (FAMILIAS)

Desde la antigüedad, se ha demostrado el uso de los venenos de animales como beneficio para el hombre; por ejemplo, en la antigua Roma, los venenos de animales se usaron para producir fármacos para tratar la viruela, lepra, fiebre y en la cicatrización de heridas. El veneno de serpiente fue escrito e investigado por médicos y filósofos de la antigua Grecia. Nicandro de Colofón fue un médico griego que describió la acción del veneno de serpiente y la composición de sus antídotos (Utkin, 2015).

En la Edad Media, se comercializaba el veneno de serpiente hasta el siglo XIX, y se conocía como “theriac”; fue fabricado en farmacias en Europa hasta el siglo XVIII; sin embargo, el uso real del veneno comenzó a fines del siglo XIX, cuando el científico francés Albert Calmette descubrió que el suero sanguíneo de animales inyectados con dosis pequeñas de veneno funcionaba como antídoto; por tal motivo,

se utilizó para la producción de antiveneno hasta que empezó a utilizarse en pacientes con epilepsia ya que al ser mordidos por una serpiente cascabel, las convulsiones cesaron; y así, en 1934 se descubre que el veneno de cobra a dosis pequeñas, tiene una actividad analgésica (Utkin, 2015).

De las más de 3.700 especies de serpientes existentes, solamente una minoría muerde a los humanos y de estas, las que son venenosas y médicamente importantes pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae, que poseen colmillos tubulares en la porción anterior de la mandíbula superior (Modahl et al., 2020). Los vipéridos poseen colmillos mucho más grandes que los elápidos; de tal manera que tras una mordida pueden inocular el veneno en los tejidos profundos de su presa (Harris & Scott-Davey, 2013).

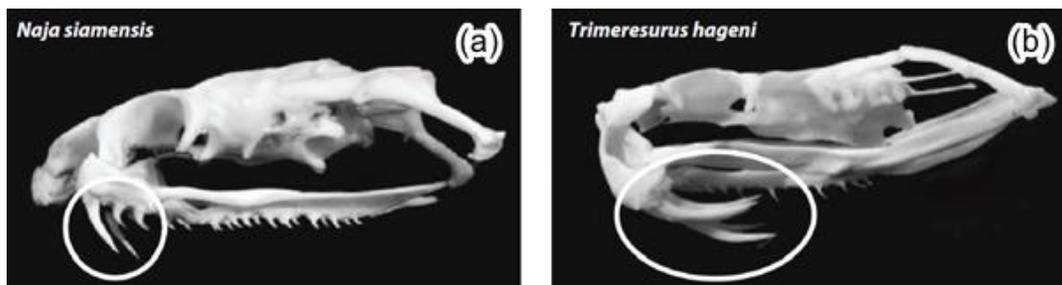


Figura 5. Colmillos de serpientes venenosas, (a) Elapidae (b) Viperidae.
Fuente: (Modahl et al., 2020).

Los efectos tóxicos del veneno se han clasificado como neurotóxico, hemotóxico, cardiotóxico, nefrotóxico, miotóxico, entre otros (Gopalakrishnakone & Calvete, 2014); sin embargo, los cuadros patológicos más importantes son el neurotóxico y hemotóxico; y ambos cursan con debilidad generalizada, dolor e inflamación local,

que es mediado principalmente por las metaloproteasas (Nogués et al., 2008). La familia Elapidae se caracteriza por generar los efectos neurotóxicos; mientras que Viperidae genera efectos miotóxicos.

1.3.2 COMPOSICIÓN DEL VENENO DE SERPIENTE DE LA FAMILIA VIPERIDAE

En cuanto a su composición, predominan principalmente proteínas (70-90% incluyendo enzimas y no enzimas), pequeñas cantidades de metales, aminoácidos, péptidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminas biogénicas. Se han identificado más de 20 enzimas diferentes, de las cuales 12 se encuentran en la mayoría de venenos y la hialuronidasa cuya función es facilitar la distribución del veneno por los tejidos de la presa, es común en todos los venenos (Nogués et al., 2008). Las principales enzimas presentes son de dos clases: oxidasas e hidrolasas, de las cuales destacan la L-aminoácido oxidasa, PLA₂, proteinasas, acetilcolinesterasas y hialuronidasas; mientras que, también se encuentran proteínas no enzimáticas como 3FTx, desintegrinas, inhibidores de proteinasas, factor de crecimiento nervioso, etc. (Utkin, 2015).

La composición bioquímica del veneno puede variar entre especies de serpientes, o incluso dentro de una misma especie; y esto se debe al modo de evolución, donde la dieta juega un papel importante en su adaptación; la edad también es un factor que afecta al veneno principalmente en su rendimiento ya que la cantidad y el peso del veneno producido aumenta con la edad debido al tamaño de la cabeza y el volumen de la glándula. Otro factor que puede alterar a los venenos es la ubicación

geográfica de la serpiente ya que puede tener impacto profundo directo en la composición del veneno al cambiar la toxicidad y actividad metaloproteinasa; por ejemplo, estudios realizados han demostrado que existe variación regional en los componentes de la fosfolipasa A₂ y las miotoxinas peptídicas de varios vipéridos (Mackessy, 2010; Suranse et al., 2018).

El veneno de los elápidos está compuesto por 3FTx (del inglés three-finger toxins), citotoxinas, fosfolipasa A₂ (PLA₂) y toxinas CRISP; mientras que el veneno de los vipéridos son altamente proteolíticos y contiene principalmente metaloproteinasas, serina proteasas, L-aminoácidos oxidasas, esterases, hialuronidasas y PLA₂ (Suranse et al., 2018); de esta manera, las mordeduras de vipéridos producen síntomas de destrucción y coagulación de los tejidos. (Modahl et al., 2020), ya que perturban los mecanismos de la homeostasia produciendo trombosis aguda y otros trastornos hemostáticos. “Los venenos de vipéridos son cualitativa y cuantitativamente muy diferentes a la mayoría de los venenos de elápidos” (Mackessy, 2010). Estudios realizados, demuestran que ciertos tipos de PLA₂ presentes en venenos de víboras pueden causar necrosis del músculo esquelético, mientras que otras formas heterodiméricas pueden causar neurotoxicidad; por esta razón, en la actualidad se estudian estos venenos por sus actividades antimicrobianas contra cepas resistentes a múltiples fármacos (Suranse et al., 2018).

I.4 FOSFOLIPASA A₂ (PLA₂)

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) (EC.3.1.1.4) son enzimas intracelulares que catalizan específicamente la hidrólisis de los enlaces éster en los fosfolípidos, en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol, generando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, esta reacción es dependiente de Ca⁺⁺. Como consecuencia se genera ácido araquidónico libre, precursor común de los eicosanoides, una familia de compuestos con múltiples funciones en inflamación; por lo tanto, son importantes en funciones celulares como la transducción de señales a partir de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos, y homeostasis de la membrana debido al mantenimiento de las reservas de fosfolípidos celulares (Gopalakrishnakone & Calvete, 2014).

Se presentan de forma ubicua en la naturaleza como sPLA₂ (secretora), cPLA₂ (citósólica), iPLA₂ (calcio independiente) y PAF-AH (acetilhidrolasas de factor activador de plaquetas). Las sPLA₂ son de bajo peso molecular, dependientes de calcio y tienen solo un sitio activo de histidina; que están presentes en fluidos y secreciones biológicas como exudados inflamatorios, lágrimas, jugo pancreático, fluidos corporales y venenos de serpientes, escorpiones, abejas y lagartos. Las sPLA₂ derivadas del veneno, se dividen en cuatro subtipos principales que son el tipo 1, 2, 3 y 4; siendo el tipo 1 y 2 propias del veneno de serpientes, las del tipo 3 son estructuralmente únicas y se encuentran sólo en los venenos del Monstruo de Gila (*Heloderma horridum*), que es un lagarto mexicano y en el veneno de la abeja *Apis mellifera* (Harris & Scott-Davey, 2013).

Por el contrario, cPLA₂, iPLA₂ y PAF-AH son enzimas intracelulares, de alto peso molecular, independientes de calcio y tienen un residuo de serina en su sitio activo y están presentes dentro de todas las células vivas (Mackessy, 2010). De esta manera, son de gran interés las sPLA₂ en el estudio neurológico y neurotoxicológico ya que están involucradas en la neuro-miotoxicidad periférica causada por mordeduras de serpientes; y, por lo tanto, las sPLA₂ como las cPLA₂ están implicadas en enfermedades inflamatorias y degenerativas del SNC (Harris & Scott-Davey, 2013).

1.4.1 TIPOS DE PLA₂

Esta enzima se divide en diferentes grupos, considerando las diferencias en la distribución de los enlaces disulfuro, su estructura tridimensional, especificidad catalítica y en ciertos segmentos en la secuencia de aminoácidos. Estructuralmente, se pudo determinar su estructura primaria en donde se describen como polipéptidos monocatenarios de 115-125 residuos de aminoácidos con masa molecular de 13 - 15 kDa (Akef, 2017; Harris & Scott-Davey, 2013).

Los polipéptidos monocatenarios suelen estar conformados por 7 (ocasionalmente 6 u 8) enlaces disulfuro que unen residuos de cisteína entre las posiciones 11 y 77, 27 y 124, 29 y 45, 44 y 105, 51 y 96, 61 y 91 y finalmente 84 y 98. La enzima está formada por más del 50% de hélice α y 10% de hoja β . El sitio activo consta de 6 residuos principalmente: His-48, Asp-49, Tyr-28, Gly-30, Gly-32 y Asp-99; y es el sitio de unión para el calcio que es el principal cofactor para que se produzca la

actividad catalítica. El sitio catalítico de la enzima se encuentra dentro de una hendidura rodeada por un anillo de residuos hidrófobos. El sustrato está ligado dentro de esta hendidura, y, por lo tanto, está protegido del medio ambiente (Harris & Scott-Davey, 2013).

Esta enzima se puede clasificar en el grupo IA, presente en el veneno de los elapídeos; y en el grupo IIA, representado por los vipéridos, que son estructuralmente similares a las del grupo IA ya que ambos presentan una hélice α en la región N-terminal, un bucle donde se une el calcio, una segunda hélice α larga y una región de ala β ; pero la diferencia principal es que presentan una pequeña cola C - terminal y un enlace disulfuro que conecta una cisteína C - terminal a la segunda hélice α . A su vez, el grupo IIA, presenta 2 subdivisiones: la primera, presenta un aspartato en la posición 49 (Asp49), que al tener una carga negativa, se une mejor al calcio y en consecuencia, le otorga su hidrofobicidad y actividad catalítica; mientras que el segundo subgrupo presenta una lisina en la posición 49 (Lys49), que al tener carga positiva, impide que se fije el calcio y así presenta una actividad catalítica insignificante; sin embargo, presentan niveles muy altos de citotoxicidad y miotoxicidad (Akef, 2017; Spolaore et al., 2019; Utkin, 2015).

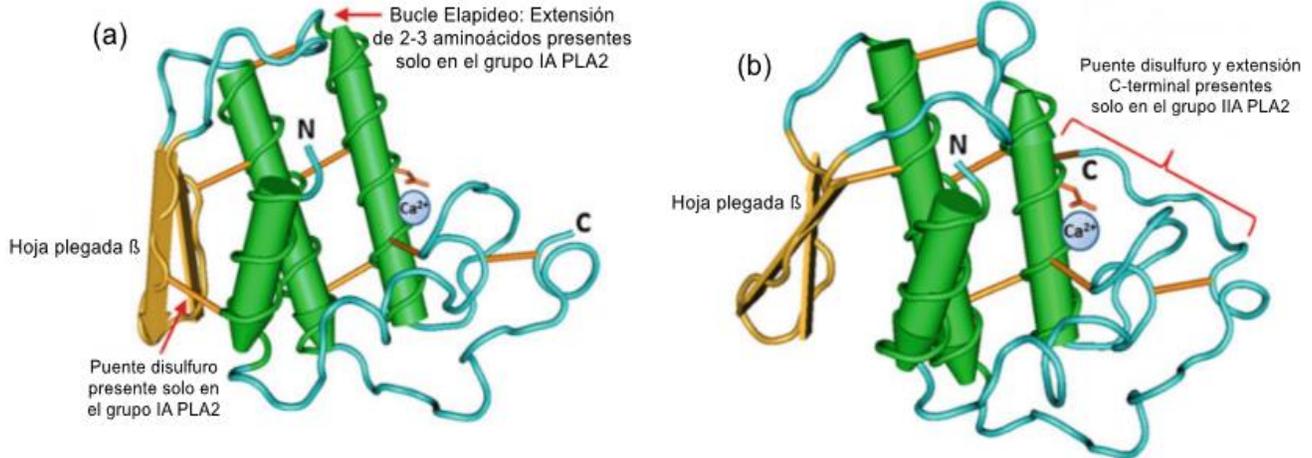


Figura 6. Estructura tridimensional de PLA₂ del grupo IA (a) y grupo IIA (b).
Fuente: (Spolaore et al., 2019).

1.4.2 EFECTOS TÓXICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LAS PLA₂

Los efectos tóxicos que producen las PLA₂ se pueden clasificar en: neurotóxicos, miotóxicos y alteraciones de la hemostasia y coagulación.

Entre los efectos neurotóxicos, pueden bloquear la transmisión neuromuscular causando parálisis y, lo que resulta en depresión respiratoria y muerte. La neurotoxicidad de las PLA₂ se produce porque ataca a las neuronas presinápticas y postsinápticas. Dentro de la familia Viperidae, las principales especies que producen este tipo de toxicidad son las serpientes de cascabel (Xiao et al., 2017).

Los efectos miotóxicos se producen en el músculo esquelético y pueden actuar local o sistémicamente, generando necrosis que puede conducir a la pérdida permanente del tejido o amputación. La familia Viperidae produce miotoxicidad local, que indica

que el daño se limita a la región donde se ha inyectado el veneno (Akef, 2017; Utkin, 2015).

Las alteraciones a la hemostasia incluyen efectos anticoagulantes y/o hemolíticos, debido a que inhibe uno o dos pasos en la cascada de coagulación. Además, también producen cardiotoxicidad, citotoxicidad, actividad convulsiva, hipotensora, actividad inductora de edema y daños a órganos o tejidos hígado, riñón, pulmones, testículos, entre otros (Xiao et al., 2017).

Además de los efectos tóxicos mencionados, se han realizado estudios que han demostrado actividad antitumoral, antiagregante plaquetaria, antiviral, antiparasitaria, antiinflamatoria, analgésica, inmunomoduladora y antibacteriana de las PLA₂ (Akef, 2017; Harris & Scott-Davey, 2013).

I.5 EFECTO ANTI LEISHMANIA DE LAS PLA₂

Estudios recientes han demostrado el potencial citotóxico y antiparasitario de las PLA₂. La metodología empleada para evaluar el efecto de las PLA₂ incluye ensayos *in vitro*, donde se analizan distintos tipos de la enzima aislada de varias serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, siendo las especies del género *Bothrops* las más comunes (Adade et al., 2012; de Oliveira Nunes, 2011). Algunos ejemplos de las investigaciones enfocadas a la evaluación de PLA₂ y su potencial anti leishmania se presentan en la Tabla 5:

Tabla 5. Ejemplos de ensayos que demuestran el efecto anti leishmania de las PLA₂

TIPO DE PLA ₂	FUENTE DE AISLAMIENTO	EFEECTO ANTI LEISHMANIA	REFERENCIAS
MJTX-II	<i>Bothrops moojeni</i>	Reducción del 50% de las formas de promastigote <i>L. amazonensis</i> , <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. major</i> y <i>L. donovani</i> .	(Abdullahi et al., 2021; Teixeira et al., 2022)
MTX I Y II	<i>Bothrops brasili</i>	Reducción del 90% de las especies de <i>Leishmania</i> , siendo un proceso de dosis dependiente, el cual puede depender de cada tipo de especie.	(Abdullahi et al., 2021; Teixeira et al., 2022)
TRIMORPHIN	<i>Trimorphodon biscutatus lambda</i>	Efecto leishmanicida contra <i>L. major</i> , demostrando que dosis bajas de la toxina estimulaban la proliferación celular; mientras que dosis más altas inhiben la viabilidad celular del parásito.	(Abdullahi et al., 2021; Teixeira et al., 2022)

De esta manera, existen más estudios que evalúan a otros tipos de PLA₂ como BnSP-7 y BmajPLA₂-II. Los efectos anti leishmania reportados incluyen hinchazón de las mitocondrias, ruptura de la membrana plasmática y cambios morfológicos producidos por interacción y alteración en los fosfolípidos de membrana, por lo cual

(Teixeira et al., 2022) plantea un posible mecanismo del potencial de las PLA₂ contra la *Leishmania*, como se detalla en la Figura 7:

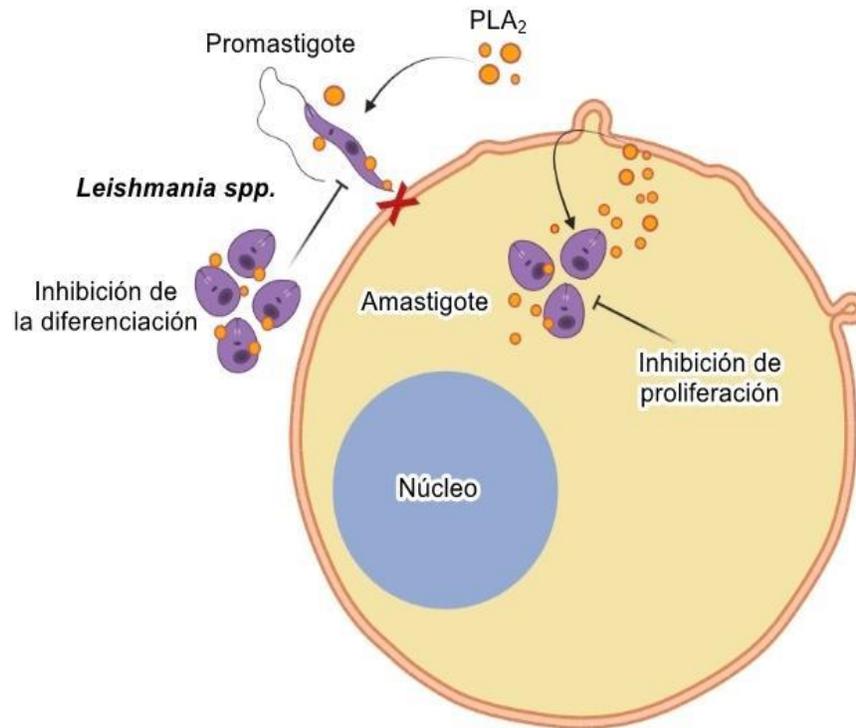


Figura 7. Potencial de las PLA₂ del veneno de serpiente contra *Leishmania* spp.
Fuente: (Córdova & Niveló, 2022).

1.5.1 PÉPTIDOS DERIVADOS DE PLA₂ CON ACTIVIDAD ANTI LEISHMANIA

Anteriormente se detalló la composición del veneno de serpiente, que puede ser dividida en la fracción enzimática y en la no enzimática; siendo esta última, la categoría en donde se encuentran los péptidos del veneno de serpiente.

Los péptidos, también conocidos como AMP (péptidos antimicrobianos) son cadenas pequeñas que constan de 5 a 100 aminoácidos, plegados en dominios monoméricos; que están involucrados en la inmunidad innata y en la protección

contra la resistencia a los mismos. Las propiedades antimicrobianas que exhiben los AMP son de amplio espectro, y eliminan directamente bacterias, virus, hongos y parásitos; además también actúan en el control de la inflamación y actúan como moléculas de señalización, biomarcadores y agentes antitumorales (El-Dirany et al., 2021; Munawar et al., 2018).

Al igual que las PLA₂, se ha podido demostrar mediante estudios el potencial anti leishmania de los péptidos obtenidos del veneno de serpiente. Para ello, algunos detallan sobre la extracción de fragmentos peptídicos de la cadena C - terminal de una Asp-49 PLA₂, dando como resultado la inhibición de promastigotes de *L. amazonensis* y *L. brasiliensis*, además de cambios morfológicos en el flagelo y reducción del volumen celular (Barros et al., 2015; Peña-Carrillo et al., 2021).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 DISEÑO DE ESTUDIO

El presente estudio es una revisión bibliográfica narrativa de carácter cualitativo del potencial anti-*Leishmania* de las Fosfolipasas A₂ del veneno de serpientes de la familia Viperidae contra las formas de promastigote y amastigote.

II.2 RECOLECCIÓN DE DATOS

Se realizó la búsqueda bibliográfica conforme a la pregunta de investigación: “¿Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) presentes en el veneno de serpientes de la familia Viperidae poseen potencial farmacológico contra las especies del género *Leishmania*?”. Los aspectos considerados para la búsqueda de artículos científicos se efectuaron de acuerdo a términos libres en los gestores de búsqueda como: PubMed (40 artículos), ScienceDirect (30 artículos), SpringerLink (30 artículos), SciELO (1 artículo), Google academic (524 artículos) cuya búsqueda deriva a otros gestores de búsqueda como los anteriormente mencionados; las palabras claves empleadas fueron: “*Leishmania*”, “snake venom”, “phospholipase A2”, “Lys49-Phospholipase A2”, “Asp49-Phospholipase A2”, “toxins”, “cutaneous Leishmaniasis”, “mucosal Leishmaniasis”, “promastigote”, “amastigote”, “Viperidae”; en idioma inglés, español y portugués. Se emplearon de la siguiente manera los operadores booleanos (“*Leishmania*” AND “venom snake” AND “phospholipase A2”); (“*Leishmania*” AND “phospholipase A2”); (“*Leishmaniasis*” AND “PLA2”); (“Lys49-Phospholipase A2”

AND “Viperidae” AND “toxins”); (“Lys49-Phospholipase A2” AND “cutaneous Leishmaniasis” AND “mucosal Leishmaniasis”); (“Lys49-Phospholipase A2” AND “Leishmania” AND “promastigote” AND “amastigote”). De dicha búsqueda se obtuvo un total de 101 artículos. Posteriormente se realizó la selección de artículos en 3 fases:

- **Primera Fase:** Se procedió la lectura de cada uno de los resúmenes de los artículos, insertando los datos respectivos en la tabla de Excel para aceptar o rechazar bajo los criterios de inclusión y exclusión.
 - **Criterios de exclusión:** Publicaciones sin acceso al texto completo.
 - **Criterios de inclusión:** Artículos originales que manifiesten la importancia farmacológica y biotecnológica en el tema principal y los subtemas, en idiomas como: inglés, español y portugués, con fecha de publicación a partir de 2015 hasta el 2022 que comprendan estudios observacionales, descriptivos, cuasi experimentales, experimentales. Con base en estos criterios, se obtuvieron 32 artículos.
- **Segunda fase:** Se determinó la calidad de la información mediante la plataforma Scopus, dependiendo de la ubicación del percentil. En este caso, se escogieron aquellos artículos cuyas revistas se ubican en los percentiles 75% a 99% (11 artículos), en los casos menores al 75% (21 artículos) se rechazaron por baja o nula confiabilidad.

- **Tercera fase:** Se seleccionaron los artículos de acuerdo la lectura completa de cada artículo. Se obtuvieron 11 artículos en total.

III. RESULTADOS

El proceso de selección se esquematiza en el siguiente diagrama, obteniendo como fuentes de información principales: ScienceDirect, PubMed y SpringerLink.

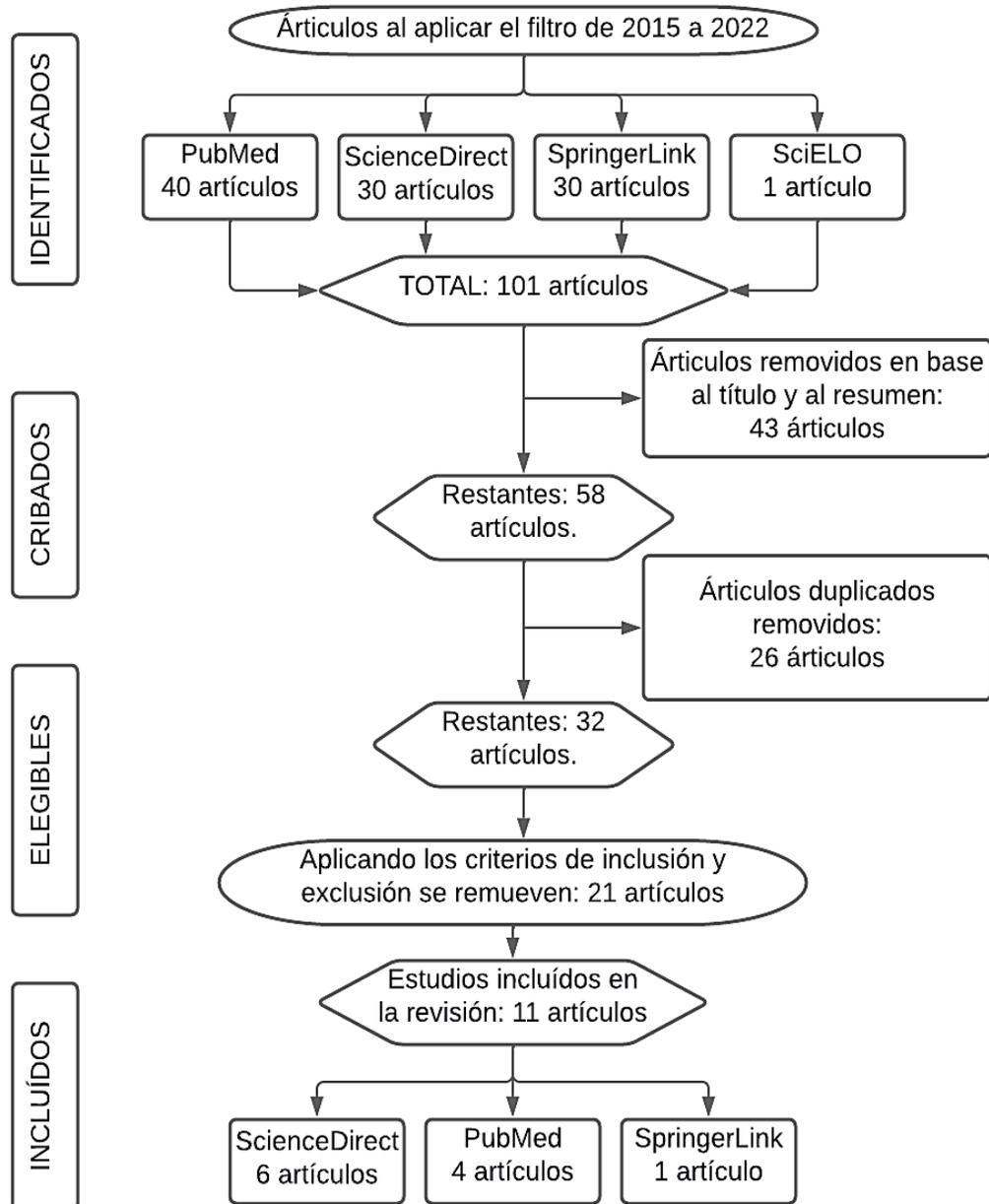


Figura 8. Diagrama de flujo de selección de artículos.

Fuente: (Córdova & Niveló, 2022).

La información obtenida en la selección de estudios se presenta en las siguientes tablas, tomando en cuenta los datos como: autor, año de publicación, país (idioma), tipo de estudio, hallazgos clave y evaluación de calidad. Además, se añaden datos de interés para el estudio como: especie de serpiente, enzima o fracción analizada, dosis, forma del protozoo, etc.

Actividad in vitro de la fosfolipasa A₂ y de los péptidos del veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> contra las formas amastigota y promastigota de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	
Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Barros, G., Pereira, A., Barros, L., Jr, A., Calvi, S., Santos, L., Barraviera, B. & Ferreira, R. (2015) Brasil.	Especie de serpiente: <i>Crotalus durissus terrificus</i>
	Enzima o fracción: Asp49 - PLA ₂ y Péptidos de PLA ₂
	Dosis: 1.5 - 200 µg/mL
	Forma del protozoo: Amastigote y promastigote de <i>Leishmania infantum</i>
	Actividad de la enzima: El efecto anti-leishmania de la PLA ₂ contra los promastigotes fue de un 50% a 83%, en dosis de 50 a 200 µg/mL; siendo efectiva 52.07 µg/mL; mientras que la fracción peptídica tuvo su efecto a dosis de 16.98 µg/mL tanto para promastigotes y amastigotes. Por otro lado, para los amastigotes presentes en los macrófagos, se necesitó una dosis de 98 µg/mL para la PLA ₂ siendo un proceso dosis dependiente debido a que a dosis bajas se reportó proliferación de los parásitos.
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

Liposomas que contienen una ASP49-fosfolipasa A₂ de veneno de serpiente Bothrops jararacussu como terapia experimental contra leishmaniasis cutánea

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Barros, N., Aragão Macedo, S., Ferreira, A., Tagliari, M., Kayano, A., Nicolete, L., Soares, A. & Nicolete, R. (2016) Brasil	Especie de serpiente: <i>Bothrops jararacussu</i>
	Enzima o fracción: Fosfolipasa A ₂ (Asp49 - PLA ₂).
	Dosis: 6.25 a 100 µg/mL
	Forma del protozoo: Promastigotes de <i>L. amazonensis</i>
	Actividad de la enzima: La actividad anti <i>Leishmania amazonensis</i> de una Fosfolipasa A ₂ (Asp49 - PLA ₂), en el cual el grupo tratado con liposomas Asp49 (12.5 µg/mL) mostraron una reducción significativa (53%) en el número de amastigotes en comparación con el grupo control infectado.
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

BmajPLA₂-II, un homólogo básico de Lys49-fosfolipasa A₂ del veneno de la serpiente Bothrops marajoensis con potencial parasiticida

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Grabner, A., Alfonso, J., Kayano, A., Moreira-Dill, L., dos Santos, A., Caldeira, C., Soares, A. & Calderon, L. (2017) Brasil y Paraguay	Especie de serpiente: <i>Bothrops marajoensis</i>
	Enzima o fracción: BmajPLA ₂ -II
	Dosis: 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL
	Forma del protozoo: Promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>
	Actividad de la enzima: El veneno de <i>B. marajoensis</i> demostró actividad anti leishmania entre 57% y 78% en concentraciones de 6.25 a 100 µg/mL. BmajPLA ₂ -II demostró actividad anti leishmania entre 7% y 29% en las mismas concentraciones. El estudio muestra una actividad significativa concentración de 100 µg/mL.
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

Liposomas cargados con Asp49 - fosfolipasa A₂ como terapia experimental en modelo de leishmaniasis cutánea

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vivo</i>
Barros, N., Aragão Macedo, S., Ferreira, A., Tagliari, M., Kayano, A., Nicolete, L., Soares, A. & Nicolete, R. (2018) Brasil	Especie de serpiente: <i>Bothrops jararacussu</i>
	Enzima o fracción: Fosfolipasa A ₂ (Asp49 - PLA ₂)
	Dosis: 2 mg/mL de Asp49 - PLA ₂ en vesículas lipídicas
	Forma del protozoo: Promastigotes de <i>L. amazonensis</i>
	Actividad de la enzima: Disminución de la diferenciación entre promastigotes y amastigotes en ratones infectados. El tratamiento con Asp49 - PLA ₂ liposomal indujo una producción significativamente mayor de mediadores inflamatorios, como TNF- α y NO, los cuales se consideran importantes para prevenir el crecimiento y supervivencia de parásitos intracelulares (formas amastigotas).
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

Actividad antiagregante plaquetaria de dos nuevas Asp49 - fosfolipasas A₂ ácidas del veneno de serpiente *Bothrops brasili*

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Sobrinho, J., Kayano, A., Simões-Silva, R., Moura, L., da Silva, S., Almeida, J., Zuliani, J. & Soares, A. (2018) Brasil, Paraguay, España y Ecuador.	Especie de serpiente: <i>Bothrops brasili</i>
	Enzima o fracción: Asp49 - PLA ₂ : Brasiliasa-I y II
	Dosis: 100 μ g/mL
	Forma del protozoo: Promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>
	Actividad de la enzima: Dos nuevas Asp49 - PLA ₂ ácidas con punto isoeléctrico de 5.2 y 5.3: Brasiliasa-I y II, mostraron 26.2% y 19.2% de citotoxicidad en <i>Leishmania infantum</i> .
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

Aislamiento, caracterización bioquímica y actividad antiparasitaria de BmatTX-IV, una Lys49-fosfolipasa A₂ básica del veneno de Bothrops mattogrossensis de Paraguay

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Alfonso, J., Kayano, A., Garay, A., Simões-Silva, R., Sobrinho, J., & Vourliotis, S. (2019) Paraguay	Especie de serpiente: <i>Bothrops mattogrossensis</i>
	Enzima o fracción: Lys49 - PLA ₂ : BmatTX-IV
	Dosis: 1.25 a 200 µg/mL
	Forma del protozoo: Promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>
	Actividad de la enzima: Tras la incubación de los promastigotes a diferentes concentraciones de la enzima, se pudo demostrar el efecto antileishmania a una dosis de 62.4 ug/mL.
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

Efecto de proteínas aisladas del veneno de Crotalus durissus terrificus en macrófagos infectados con Leishmania amazonensis.

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Katz, S., Barbiéri, C. L., Soler, F. P. M., Soares, A. M., Chavantes, M. C., & Zamuner, S. R. (2020) Brasil	Especie de serpiente: <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt)
	Enzima o fracción: Crotoxina, Convulxina, Crotamina, Girotoxina, PLA ₂
	Dosis: 10 - 50 µg/mL
	Forma del protozoo: Amastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>
	Actividad de la enzima: Las 5 toxinas obtenidas de CdtV mostraron actividad citotóxica contra los amastigotes de <i>L. amazonensis</i> inoculados en macrófagos. Las dosis efectivas van desde 25 a 50 µg/mL. Siendo la crotamina la más efectiva y la convulxina la menos efectiva.
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

Leishmania suicida

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Podešvová, L., Leštinová, T., Horáková, E., Lukeš, J., Volf, P. and Yurchenko, V. (2020) República Checa y Rusia	Especie de serpiente: <i>Bothrops pauloensis</i>
	Enzima o fracción: BnSP-7: PLA2 básica Lys-49
	Forma del protozoo: Promastigote y amastigote de <i>L. mexicana</i>
	Actividad de la enzima: Se demostró la muerte celular de los parásitos por BnSP-7 mediante un sistema "suicida" generado por <i>L. mexicana</i> , con el fin de generar una vacuna contra la enfermedad.
	Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído

La disección de fosfolipasas A₂ revela péptidos multifacéticos dirigidos a células cancerosas, Leishmania y bacterias

Referencia	Diseño del estudio: Estudio experimental <i>in vitro</i>
Peña-Carrillo, M., Pinos- Tamayo, E., Mendes, B., Domínguez- Borbor, C., Proaño-Bolaños, C., Miguel, D. & Almeida, J. (2021) Ecuador y Brasil	Especie de serpiente: <i>Bothrops godmani</i> (a), <i>Bothrops moojeni</i> (b), <i>Bothrops marajoensis</i> (c)
	Enzima o fracción: (a) pCergo, (b) pBmTxJ y (c) pBmje, basados en tres secuencias de aminoácidos diferentes de Asp49 - PLA ₂ .
	Dosis: 0 a 200 µM
	Forma del protozoo: Promastigotes de <i>L. brasiliensis</i> y <i>L. amazonensis</i>
	Actividad de la enzima: La incubación con concentraciones crecientes de péptidos resultó en la disminución de la viabilidad celular. pCergo fue el más activo para <i>L. brasiliensis</i> y <i>L. amazonensis</i> , mientras que los otros requirieron valores superiores.
Evaluación de calidad (Incluído / Excluído): Incluído	

Efecto antiprotozoario de los venenos de serpientes y sus fracciones: una revisión sistemática

Referencia	Diseño del estudio: Revisión sistemática
<p>Abdullahi, Z., Musa, S., He, D. & Bello, U.</p> <p>(2021)</p> <p>China y Nigeria</p>	<p>Revisión literaria en la que se informa en particular de alrededor de 36 actividades de PLA₂, entre ellas sus efectos inhibidores sobre <i>P. falciparum</i> y su inhibición sobre la viabilidad celular de las especies de <i>Leishmania</i>.</p>

Panacea dentro de la caja de Pandora: los efectos antiparasitarios de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) de los venenos de serpiente.

Referencia	Diseño del estudio: Revisión sistemática
<p>Teixeira, S., da Silva, M., Gomes, A., Moretti, N., Lopes, D., Ferro, E. & Rodrigues, V.</p> <p>(2022)</p> <p>Brasil</p>	<p>Revisión literaria en la que se informa el potencial antiparasitario de las PLA₂ del veneno de serpiente, ya sea para helmintos, especies de <i>Plasmodium</i>, <i>Leishmania</i> y <i>Toxoplasma</i>. Se detalla la interacción y el posible mecanismo de acción de la enzima contra los componentes de la membrana del parásito.</p>

En el Ecuador el tratamiento de primera línea sugerido por el Ministerio de Salud Pública es el antimonio de meglumina a dosis de 10 a 15 mg/kg/día, administrados por vía intramuscular y con una duración de 20 días para la **LC** y 28 días para la **LCM**. Como medicamento de segunda línea se utiliza la anfotericina B a una dosis de 0.5 a 1 mg/kg/día; y medicamentos sistémicos como la pentamidina a 20

mg/kg/día por un tiempo de 10 días, considerándola como terapia de tercera línea y reserva en casos refractarios. Debido a que en los últimos años han aumentado los casos de fracaso terapéutico por resistencia parasitaria o por inmunosupresión del paciente, otra opción de tratamiento es la miltefosina, utilizada por vía oral a una dosis de 2.5 mg/día por un período de 28 días (Mosquera et al., 2019; Toalombo & Coque, 2021).

Considerando todas las desventajas que acarrea el uso de estos fármacos, tales como: la hepato, nefro y cardio toxicidad que producen, reacciones adversas en el tracto gastrointestinal (náusea, vómito, anorexia), hipokalemia, hipotensión, reacciones adversas cutáneas (urticaria, edema, eritema) y teratogenicidad, se realizó esta recopilación de bibliografía científica que demuestra la efectividad leishmanicida de estas moléculas y el bajo número de investigaciones de este tipo de alternativas terapéuticas en Ecuador.

Por lo tanto, esta revisión puede ser utilizada como una base para futuras investigaciones en entidades ecuatorianas como el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), universidades y centros de especialidades médicas, pues toda la información extraída durante el desarrollo de este informe pertenece a estudios realizados en otros países, principalmente en: Brasil (7 estudios) Paraguay (3 estudios), República Checa (1 estudio), Rusia (1 estudio), España (1 estudio) y Ecuador (2 estudios), siendo los investigadores de la

Universidad Regional Amazónica Ikiam y la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) las únicas instituciones en el país en llevar a cabo estudios experimentales que demuestran la importancia de estas enzimas, en colaboración con universidades brasileñas como: la Universidad Federal de Rondônia, la Universidad Federal Fluminense, el Centro Universitário São Lucas y la Universidad Estatal de Campinas; demostrando de esta manera que la gran parte del interés e investigación científica del tema se desarrolla en Brasil.

Además, mediante el análisis de los estudios experimentales incluidos se encontraron semejanzas en cuanto a las especies de vipéridos utilizados, destacando los géneros *Bothrops* y *Crotalus* que son de gran importancia en Brasil, incluyendo a los estudios en los que Ecuador ha colaborado, pues solo en uno de ellos se analizó una de las especies presentes tanto en Brasil como en Ecuador, siendo esta *Bothrops brasili* que es una especie que se distribuye en bosques ecuatoriales de la cuenca amazónica. Mientras que, en la segunda colaboración no se analiza ninguna especie situada en Ecuador, sino únicamente especies que se encuentran y son de relevancia en Brasil y en otros países de Centroamérica.

Adicionalmente, dentro de los 11 artículos incluidos en esta revisión, 8 de ellos son estudios experimentales *in vitro*, 1 estudio experimental *in vivo* y 2 son revisiones sistemáticas; en las que encontramos semejanza en la metodología usada por parte de los investigadores, las cuales se detallan en la Tabla 6:

Tabla 6. Semejanzas en la metodología usada en los estudios *in vitro*.

Etapa	Método	Número de artículos
Purificación de los componentes del veneno	Cromatografía líquida en fase reversa	7 estudios <i>in vitro</i>
Cultivo celular de promastigotes	Microdilución en placa (24 a 96 pocillos) con diferentes dosis de la enzima	6 estudios <i>in vitro</i> Katz et al., (2020) no cumple
Cultivo celular de macrófagos – amastigotes	Incubación de macrófagos infectados con amastigotes en microcultivo de 16 – 24 pocillos	2 estudios <i>in vitro</i>
	Microdilución en placa con diferentes dosis de la enzima	
	Evaluación de amastigotes viables mediante tinción de Giemsa	
Determinación de IC 50	Método colorimétrico por espectrofotometría	7 estudios <i>in vitro</i>

Por otro lado, las diferencias en estos estudios *in vitro*, se basan en periodos de incubación, temperaturas, concentración de CO₂ en la atmósfera y en las diluciones de la enzima y sus péptidos. Es importante mencionar que en la investigación realizada por Barros et al., (2016) se utilizó una dosis mayor en comparación a los otros estudios, debido a la implementación de liposomas con Asp49-PLA₂, con la finalidad de proteger el principio activo mediante la vesícula lipídica.

Dos de los estudios *in vitro* analizados en la revisión, incluyen el análisis de la fracción peptídica obtenida a partir de las PLA₂. Los métodos que se utilizaron para la purificación de los péptidos en el caso de Barros et al., (2015) fue mediante centrifugación, basándose en el peso molecular deseado de 3 kDa; mientras que, Peña et al., (2021) utilizaron la cromatografía líquida en fase reversa para la caracterización y purificación de los mismos.

Un estudio *in vitro* utiliza otra metodología, debido a que su finalidad es producir vacunas contra esta enfermedad parasitaria. La técnica empleada se basa en el cultivo celular de promastigotes y amastigotes que luego son sometidos a ensayos de apoptosis con la enzima, para determinar los cambios morfológicos mediante tinción de Giemsa.

Del mismo modo, el único estudio *in vivo* considerado en esta revisión utiliza una metodología diferente, ya que su finalidad es analizar la acción de la enzima dentro de un huésped vivo para así determinar la efectividad en cuanto a dosis y reacciones adversas. Por lo cual, la técnica empleada consiste en la inoculación de promastigotes en las extremidades de ratones conjuntamente con el sistema liposomal-Asp49(PLA₂) y posteriormente evaluar la viabilidad celular de los parásitos en las lesiones producidas

Finalmente, las dos revisiones sistemáticas incluidas engloban información importante para el tema desarrollado, pues poseen un enfoque general, desde la

enfermedad hasta el posible mecanismo de acción que plantean los diversos autores.

IV. DISCUSIÓN

Los venenos de serpientes y sus toxinas purificadas han sido ampliamente utilizadas como fuente para el descubrimiento de nuevas moléculas con efecto farmacológico, el cual ha sido demostrado por algunos grupos de investigación. Entre los efectos observados se encuentran la acción citotóxica, miotóxica, neurotóxica y alteración de la hemostasia; siendo los más estudiados en la actualidad las propiedades antitumorales, antivirales, antibacterianas y antiparasitarias, demostrando efectividad contra *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, helmintos y varias especies de *Leishmania*, con la finalidad de generar nuevas alternativas terapéuticas.

Las fracciones del veneno que han demostrado sus efectos antimicrobianos son: L - aminoácido oxidasas (LAAO), metaloproteasas, serin proteasas, péptidos y PLA₂ del grupo IIA, las cuales han sido extraídas de las especies de la familia Viperidae, tales como; *Bothrops jararacussu*, *Bothrops godmani*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops brasili*, *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus viridis viridis* y *Crotalus durissus cumanensis*.

Sin embargo, es muy importante puntualizar que autores como Alfonso et al., (2019) y Mackessy, (2010) mencionan que diversos factores pueden alterar significativamente la composición bioquímica del veneno, la cual puede variar entre especies de serpientes, o incluso dentro de una misma especie. Esto se debe al modo de evolución, donde la dieta y la edad juegan un papel importante en su

adaptación y en la concentración de proteínas; por ejemplo, para muchas serpientes cascabel y víboras, esta variación da como resultado venenos con características bioquímicas, composición y farmacología diferentes.

Otro factor que puede alterar a los venenos es la distribución geográfica de la serpiente, teniendo impacto directo en la toxicidad y actividad enzimática; por ejemplo, estudios realizados han demostrado que existe variación regional en los componentes de la fosfolipasa A₂ y las miotoxinas peptídicas de varios vipéridos (Mackessy, 2010).

A pesar de que existen factores que pueden alterar los venenos de las serpientes, se ha demostrado mediante varios estudios que poseen una acción leishmanicida contra especies de *Leishmania* como: *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. mexicana*, *L. infantum chagasi* y *L. donovani*, esto gracias a las PLA₂ que contienen y en donde se ha detallado que poseen un mismo efecto tanto en la forma catalíticamente activa (Asp49) como en la forma catalíticamente inactiva (Lys49), comprendiendo mayor porcentaje de estudio esta última mencionada.

Distintos autores han descrito el efecto antiparasitario de los venenos de las especies de *Bothrops* desde hace 16 años aproximadamente. Stábeli et al., (2006) evidenciaron que una fracción del veneno de *B. moojeni* designada como MjTX-II (Lys49) inhibió la viabilidad celular en promastigotes de *L. donovani* y *L. major*. Por otro lado, Costa et al., (2008) obtuvieron 2 fracciones del veneno de *B. brasili*: MTX-I (Asp49) y MTX-II (Lys49) las cuales demostraron la inhibición de la viabilidad

celular en las formas de promastigote de *L. brasiliensis* a dosis de 19 µg/ml y 59 µg/ml respectivamente para las fracciones. Nunes et al., (2013) demostraron que una fosfolipasa básica aislada del veneno de *B. pauloensis*, denominada BnSP-7 (Lys49) a dosis de 58.7 µg/ml inhibe la proliferación de promastigotes y a 28.1 µg/ml inhibe a los amastigotes de *L. amazonensis*. El mecanismo planteado en este estudio indica que existe una alteración a un nivel estructural en la forma de promastigote del parásito, el cual está relacionado con la región C - terminal de la enzima.

A partir del 2015, los investigadores se han enfocado en nuevos estudios que incorporan la forma catalíticamente activa, Asp49, como es el caso de Barros et al., (2016) los cuales realizaron un estudio *in vitro* en el cual obtuvieron la enzima de *B. jararacussu* demostrando la actividad contra los promastigotes de *L. amazonensis* a dosis de 12.5 µg/mL obteniendo una reducción significativa del 53% en la transformación del parásito. Dos años después, los autores Barros et al., (2018) realizaron el estudio *in vivo* con el mismo objetivo, demostrando que a dosis mayores (2 mg/mL) existió la interrupción del ciclo de vida del parásito en las lesiones de ratones previamente infectados. De esta manera podemos observar que en el estudio *in vivo* la dosis utilizada es mayor que en el estudio *in vitro*, lo cual justifica que la cantidad de los estudios *in vivo* sea escasa por la mio y la neurotoxicidad que presenta la enzima.

Otro estudio realizado con la forma Asp49 de los autores Sobrinho et al., (2018) se basó en la caracterización de la Brasiliasa I y II proveniente del veneno de *B. brasili*,

que a comparación del resto de estudios, son formas ácidas presentando un punto isoeléctrico de 5.2 y 5.3 respectivamente. Este estudio posee gran relevancia para nuestra revisión debido a que la mayoría de las PLA₂ de los venenos de las especies de *Bothrops* son básicas presentando un punto isoeléctrico de 7 a 10, ya sea con o sin sitio catalítico. Los autores utilizaron una dosis de 100 µg/mL contra promastigotes de *L. infantum* demostrando así una citotoxicidad del 26.2% y del 19.2% respectivamente. Como mencionamos anteriormente, en el veneno de *B. brasili* están presentes fracciones básicas como MTX- I y MTX- II que con dosis menores a las del reciente estudio realizan el mismo efecto leishmanicida, es decir, las fracciones básicas poseen mayor potencia a diferencia de las fracciones ácidas, sin embargo, consideramos que requieren mayor estudio por su gran utilidad.

Grabner et al., (2017) realizaron un estudio en Brasil y Paraguay evaluando la especie *Bothrops marajoensis* en el cual reportan una enzima catalíticamente inactiva denominada BmajPLA₂-II que por sus características químicas se la consideró una forma de Lys49. Esta proteína es distinta de las descritas previamente en el veneno de *B. marajoensis*, con un efecto contra los promastigotes de *L. infantum*, sin embargo, su efectividad es baja a comparación de la proteína estudiada por Alfonso et al., (2019) en Paraguay en la especie *Bothrops mattogrossensis* en la cual la proteína BmatTX-IV demuestra que a una dosis menor cumple con el mismo efecto leishmanicida contra los promastigotes de la misma especie de *Leishmania* anteriormente mencionada. Esta discrepancia entre las diferentes concentraciones inhibitorias de venenos puede explicarse por las

características propias que existen para cada una de las especies de serpientes del mismo género.

Actualmente, se han estudiado otros géneros de los vipéridos como *Crotalus*, siendo la más relevante *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*). Katz et al., (2020) explican que esta especie contiene abundantes proteínas que son biológicamente activas, tales como: crotoxina, convulxina, crotamina, girottoxina y PLA₂, de las cuales la crotoxina genera interés para la revisión debido a que posee un dominio de fosfolipasa A₂ y un dominio que no presenta actividad enzimática. Farias et al., (2017) demostraron que la crotoxina induce una actividad contra las dos formas parasitarias de *L. amazonensis*.

Por otro lado, Katz et al., (2020) también mencionan que la crotamina a pesar de ser un polipéptido básico con bajo peso molecular, presenta actividad neurotóxica, miotóxica y mayor actividad antimicrobiana contra *L. amazonensis* requiriendo una dosis menor que las anteriormente mencionadas. Finalmente, en este estudio se describe que la convulxina fue la proteína que necesitó una dosis mayor para generar la misma actividad leishmanicida.

Referente a la misma especie, Barros et al., (2015) estudiaron el efecto de las PLA₂ y de los péptidos del veneno de *Cdt* contra los amastigotes y promastigotes de *L. infantum*. La PLA₂ - Asp49 por medio de alteraciones estructurales produce un efecto anti leishmania contra las dos formas del parásito, siendo un mecanismo dosis dependiente. Para generar la inhibición de los promastigotes se requirió una

dosis a partir de 52.07 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para los amastigotes la dosis efectiva fue a partir de los 98 $\mu\text{g/mL}$, demostrando que a dosis menores de las detalladas el efecto es inverso, generando una proliferación de la forma amastigota del parásito. Así lo corroboraron autores como Bordon et al., (2018) y Domingues et al., (2008) que en sus estudios han demostrado que las PLA₂ suprimieron los niveles de IL-2 y generaron un aumento de las prostaglandinas E₂ (PGE₂), las cuales actúan como mediadores lipídicos inflamatorios. Además, poseen un papel importante en la virulencia y el mantenimiento del parásito en hospedadores vertebrados.

Considerando que la mayor parte de los estudios son realizados en promastigotes, se debe evaluar la posibilidad de generar más estudios en la forma intracelular del parásito y verificar la relación riesgo - beneficio sobre el aumento de dosis teniendo en cuenta la toxicidad de la enzima.

Un enfoque innovador para incursionar en el estudio de nuevas moléculas fue descrito por Barros et al., (2015) dando a conocer la fracción peptídica del veneno de *Cdt* contra *L. infantum*, cuyos resultados fueron muy alentadores ya que demostró que poseen un efecto anti leishmania a dosis de 16.98 $\mu\text{g/mL}$ para eliminar promastigotes y amastigotes, siendo una dosis relativamente pequeña a comparación del resto de fracciones anteriormente analizadas. Este descubrimiento ha generado interés en otros investigadores los cuales han analizado fracciones peptídicas en otros vipéridos, como *Bothrops godmani* (péptido pCergo), *Bothrops moojeni* (péptido pBmTxJ) y *Bothrops marajoensis* (péptido pBmje) descritos en el

estudio realizado por Peña et al., (2021) en el cual caracterizaron estas nuevas moléculas derivados de PLA₂ - Asp49 con potencial inhibidor sobre promastigotes de *L. amazonensis* y *L. brasiliensis*, dando como resultado que la fracción peptídica pCergo fue la más activa para ambas especies, mientras que los demás péptidos mostraron la misma acción pero con valores superiores a la dosis utilizada de pCergo. Estas fuentes péptidicas podrán ser parte de nuevos tratamientos para solventar esta enfermedad parasitaria que es un problema de salud pública, gracias a su gran potencial. Sin embargo, se necesitan más investigaciones con mayor profundidad para dilucidar los mecanismos de acción de estas moléculas.

A pesar de esto, se han reportado en estudios previos varios cambios en la forma de promastigote, observados mediante análisis de microscopía óptica, presentando alteraciones estructurales como: ampollas en la superficie celular, alteración en el núcleo y condensación de la cromatina, aumento del número de vacuolas, edema mitocondrial afectando así la cadena respiratoria, contracción del citoplasma y alteraciones en el flagelo (Nunes et al., 2013); por lo cual, autores como Teixeira et al., (2022) plantean un posible mecanismo de acción en el cual se produce una alteración electrostática al interactuar la enzima con la membrana plasmática, generando cambios en la permeabilidad de la misma y la penetración en la bicapa lipídica con la consecuente apoptosis de la célula parasitaria.

Aunque el mecanismo de acción no ha sido completamente establecido, se ha planteado otro uso de la enzima para generar un esquema de vacunación; donde

Podešvová et al., (2020) analizaron el comportamiento de los promastigotes de *Leishmania mexicana* frente a la fracción BnSP7 - Lys49 de *B. pauloensis*, observando la apoptosis del parásito debido a cambios en su morfología y con esto dedujeron que al debilitar al parásito esta podría utilizarse como una alternativa para la elaboración futura de vacunas profilácticas para el huésped debido a la reducción de la patogénesis. Este último estudio destaca la gran importancia de la enzima, no solo como una alternativa terapéutica, si no también como una alternativa de prevención a la enfermedad parasitaria la cual representa un gran problema de salud pública en áreas endémicas a nivel mundial.

Con base en toda la recopilación bibliográfica presentada, se enfatizan los métodos utilizados antes y después del periodo de investigación planteado, en los cuales se han encontrado tanto semejanzas como diferencias, principalmente en estudios como los de Stábeli et al., (2006), Costa et al., (2008) y Nunes et al., (2013) que presentaron similitud en la purificación de la enzima y la técnica de microdilución en placas, difiriendo en tiempos de incubación más cortos, dosis mayores y recomendando para investigaciones futuras la realización de las técnicas por triplicado.

Puesto que, la gran parte de la información obtenida es procedente de otros países se busca incentivar la investigación en Ecuador, ya que según Torres et al., (2022) en el país existen 18 especies de vipéridos, entre los cuales se destacan especies del género *Bothrops*, como: *B. asper*, *B. atrox* y *B. brasili*. Sin embargo, no existen

reportes de la presencia del género *Crotalus*. A pesar de este hecho, se puede recalcar que existen otros vipéridos como la *Porthidium arcosae*, conocida como la víbora de Manabí, de la cual se podría obtener resultados promisorios debido a que es endémica en el país.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 CONCLUSIONES

Esta revisión bibliográfica contiene información científica que proporciona una descripción general del efecto anti leishmania de las PLA₂ de los venenos de serpiente de la familia Viperidae y sus péptidos. La información analizada se organizó en forma de fichas nemotécnicas para facilitar la comprensión del lector.

Los dos tipos principalmente estudiados de la enzima son los que en su estructura presentan un aminoácido lisina o un aspartato en la posición 49 del sitio catalítico. Ambas formas demostraron un efecto citotóxico prometedor contra Leishmania, sin embargo, esto depende de la dosis administrada, la especie de serpiente de la cual se obtiene el veneno, forma morfológica del parásito y la especie de Leishmania a tratar. Actualmente, se evalúan fracciones peptídicas derivadas de las PLA₂ las cuales presentan un alto grado de eficacia, siendo más efectivas que la misma enzima, pues requieren dosis menores para cumplir con el mismo efecto leishmanicida.

Esta recopilación de información científica servirá como una base para estudios futuros con el fin de generar moléculas diana que sirvan para el desarrollo de nuevos fármacos y brindar un tratamiento alternativo a la enfermedad.

V.2 RECOMENDACIONES

Al finalizar esta investigación se considera que el principal desafío es el escaso planteamiento de un mecanismo de acción de la enzima contra el parásito, por lo cual se recomienda seguir realizando estudios en este mismo enfoque; de la misma manera se recomienda extender la investigación a profundidad del mecanismo dosis dependiente, en el cual a dosis bajas existe una proliferación del parásito y a dosis altas la inhibe; para así, con investigaciones futuras lograr generar prototipos de nuevos fármacos contra todas las especies de *Leishmania* que no presenten desventajas, ni reacciones adversas como el tratamiento actual, además que sean accesibles para toda la población.

De la misma manera, teniendo en cuenta los diversos factores que pueden alterar significativamente la composición bioquímica del veneno, se recomienda realizar estudios con especies de serpientes que pertenezcan a una misma zona geográfica o sean endémicas de regiones específicas, con el objetivo de evitar la variación entre los componentes del veneno.

Finalmente, se recomienda a las instituciones universitarias y centros de investigación públicos, el desarrollo de estudios enfocados a estas enzimas de gran interés presentes en especies de vipéridos pertenecientes a Ecuador.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullahi, Z. U., Musa, S. S., He, D., & Bello, U. M. (2021). Antiprotozoal Effect of Snake Venoms and Their Fractions: A Systematic Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10121632>
- Adade, C. M., Anne Cristine, S. F., Ana Lúcia, O. C., Zingali, R. B., & Souto-Padrón, T. (2012). 44. Leishmanicidal Effects of a Phospholipase A2 Isolated from *Crotalus viridis viridis* Snake Venom. *Toxicon*, 60(2), 117. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.045>
- Akef, H. M. (2017). Snake venom: kill and cure. *Toxin Reviews*, 0(0), 1–20. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1399278>
- Alfonso, J. J., Kayano, A. M., Garay, A. F. G., Simões-Silva, R., Sobrinho, J. C., Vourliotis, S., Soares, A. M., Calderon, L. A., & Gómez, M. C. V. (2019). Isolation, Biochemical Characterization and Antiparasitic Activity of BmatTX-IV, A Basic Lys49-Phospholipase A2 from the Venom of *Bothrops matogrossensis* from Paraguay. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(22), 2041–2048. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190723154756>
- Anversa, L. s., Tiburcio, M. G. S., Richini-Pereira, V. nia B., & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 64(3), 281–289. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>
- Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6(May), 1–15.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Arrivillaga, J., Enríquez, S., Romero, V., Echeverría, G., Pérez-Barrera, J., Poveda, A., Navarro, J. C., Warburg, A., & Benítez, W. (2017). Aspectos eco-epidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi* majuscula y *Lutzomyia trapidoi*. *Biomedica*, 37, 1–46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536>

Barros, G. A. C., Pereira, A. V., Barros, L. C., Lourenço, A., Calvi, S. A., Santos, L. D., Barraviera, B., & Ferreira, R. S. (2015). In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0049-0>

Barros, N. B., Macedo, S. R. A., Ferreira, A. S., Tagliari, M. P., Zanchi, F. B., Kayano, A. M., Soares, A. M., & Nicolete, R. (2016). Liposomes containing an ASP49-phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. *International Immunopharmacology*, 36, 225–231. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2016.04.025>

Barros, N. B., Aragão Macedo, S. R., Ferreira, A. S., Tagliari, M. P., Kayano, A. M., Nicolete, L. D. F., Soares, A. M., & Nicolete, R. (2018). ASP49-phospholipase A2-loaded liposomes as experimental therapy in cutaneous leishmaniasis model. *International Immunopharmacology*, 55, 128–132. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2017.12.012>

- Bordon, M. L. A. C., Laurenti, M. D., Ribeiro, S. P., Toyama, M. H., Toyama, D. de O., & Passero, L. F. D. (2018). Effect of phospholipase A₂ inhibitors during infection caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(1).
<https://doi.org/10.1186/S40409-018-0156-9>
- Botero, D., & Restrepo, M. (2013). *Parasitosis humanas* (Cooperación para Investigaciones Biológicas (ed.); 5th ed.). CIB.
<https://cib.org.co/servicios/catalogo/parasitosis-humanas/>
- Calvopiña, M., Loor, R., Lara, F., Zambrano, P., & Hashiguchi, Y. (2012). Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha–Ecuador. *Rev Fac Cien Med (Quito)*, 37(January 2016), 31–38.
- Chakravarty, J., & Sundar, S. (2019). Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(10), 1251–1265. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>
- Costa, T. R., Menaldo, D. L., Oliveira, C. Z., Santos-Filho, N. A., Teixeira, S. S., Nomizo, A., Fuly, A. L., Monteiro, M. C., de Souza, B. M., Palma, M. S., Stábeli, R. G., Sampaio, S. V., & Soares, A. M. (2008). Myotoxic phospholipases A(2) isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*, 29(10), 1645–1656.
<https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2008.05.021>

- Domingues P., L. F. D., Laurenti, M. D., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., & Toyama, M. H. (2008). The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitology Research* 2007 102:5, 102(5), 1025–1033. <https://doi.org/10.1007/S00436-007-0871-6>
- El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-Sater, F., Gonzalez-Gaitano, G., Brandenburg, K., Martinez de Tejada, G., & Nguewa, P. A. (2021). Activity of anti-microbial peptides (Amps) against leishmania and other parasites: An overview. *Biomolecules*, 11(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom11070984>
- Farias, L. H. S., Rodrigues, A. P. D., Coêlho, E. C., Santos, M. F., Sampaio, S. C., & Silva, E. O. (2017). Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, 144(11), 1458–1467. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000944>
- Gopalakrishnakone, P., & Calvete, J. J. (2014). Venom Genomics and proteomics. In *Genetic Engineering and Biotechnology News* (Vol. 34, Issue 8). <https://doi.org/10.1089/gen.34.08.09>
- Grabner, A. N., Alfonso, J., Kayano, A. M., Moreira-Dill, L. S., dos Santos, A. P. de A., Caldeira, C. A. S., Sobrinho, J. C., Gómez, A., Grabner, F. P., Cardoso, F. F., Zuliani, J. P., Fontes, M. R. M., Pimenta, D. C., Gómez, C. V., Teles, C. B. G., Soares, A. M., & Calderon, L. A. (2017). BmajPLA2-II, a basic Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasiticidal potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102,

571–581. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.013>

Gutiérrez, J. (2014). Factores de riesgo ambientales en la transmisión de la leishmaniasis cutánea en una zona endémica del Estado de Tabasco. *Horizonte Sanitario*, 13(2), 194–200.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457845287004>

Harris, J. B., & Scott-Davey, T. (2013). Secreted phospholipases A2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*, 5(12), 2533–2571. <https://doi.org/10.3390/toxins5122533>

Izaguirre, A., Díaz, D., Flores, J., González, M., Arguello, D., Valle, W., & Zepeda, H. (2017). Características clínicas y epidemiológicas de Leishmaniasis en el municipio de trojes, El Paraíso, 2014-2017. *Revista Médica Hondureña*, 85(1 y 2), 15–20. <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2017/pdf/Vol85-1-2-2017-5.pdf>

Katz, S., Barbiéri, C. L., Soler, F. P. M., Soares, A. M., Chavantes, M. C., & Zamuner, S. R. (2020). Effect of Isolated Proteins from *Crotalus Durissus Terrificus* Venom on *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*-Infected Macrophages. *Protein and Peptide Letters*, 27(8), 718–724. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200129152954>

Mackessy, S. P. (2010). Venoms and toxins of reptiles. In *Venoms and toxins of reptiles*.

Maia-Elkhoury, A. N. S., Lima, D. M., Salomón, O. D., Buzanovsky, L. P., Saboyá-Díaz, M. I., Valadas, S. Y. O. B., & Sanchez-Vazquez, M. J. (2021). Interacción

entre los determinantes medioambientales y socioeconómicos para el riesgo para leishmaniasis cutánea en América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 45, e49. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2021.49>

Mebs, D. (2002). *Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists* (MedPharm (ed.)). CRC Press. https://books.google.com/books/about/Venomous_and_Poisonous_Animals.html?hl=es&id=pkYXAQAIAAJ

Melby, P. C., Travi, B. L., & Yaneth Osorio, E. (2019). Leishmania. *Encyclopedia of Microbiology*, September, 769–779. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02473-9>

Ministerio de Salud Pública. (2021). *ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES INFORME LEISHMANIASIS Semana Epidemiológica (SE) 01-32/2019.Ecuador*.

Modahl, C. M., Brahma, R. K., Koh, C. Y., Shioi, N., & Kini, R. M. (2020). Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Animal-021419-083626>, 8, 91–116.

Mosquera, R., Enrique, J., Díaz, V., & Cecibel, A. (2019). Leishmaniasis cutánea, a propósito de un caso. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de La Universidad de Cuenca*, 37(1), 65–73. <https://doi.org/10.18537/RFCM.37.01.08>

Munawar, A., Ali, S. A., Akrem, A., & Betzel, C. (2018). Snake venom peptides: Tools

- of biodiscovery. *Toxins*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/toxins10110474>
- Nogués, M. P., Rojo, ; C, M^a, S. ;, De, L., Ruiz, V., & Encinas Cerezo, M. T. (2008). *Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos snakes venoms: kinds and treatments*. 2(2).
- Nunes, D. C. O., Figueira, M. M. N. R., Lopes, D. S., De Souza, D. L. N., Izidoro, L. F. M., Ferro, E. A. V., Souza, M. A., Rodrigues, R. S., Rodrigues, V. M., & Yoneyama, K. A. G. (2013). BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*, 140(7), 844–854. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000012>
- Olalla Herbosa, R., & Tercero Gutiérrez, M. J. (2011). Parasitosis comunes internas y externas. Consejos desde la oficina de farmacia. *Offarm*, 30(4), 33–39.
- Oliveira Nunes, D. C. (2011). *Efeito de uma Fosfolipase A2 básica isolada da peçonha de Bothropoides pauloensis (Bothrops pauloensis) sobre formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 93.
- OMS. (2021). *Leishmaniasis*. Retrieved 10 October 2021, From. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69(S1), S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- Peña, M. S., Pinos-Tamayo, E. A., Mendes, B., Domínguez-Borbor, C., Proaño-Bolaños, C., Miguel, D. C., & Almeida, J. R. (2021). Dissection of phospholipases A2 reveals multifaceted peptides targeting cancer cells,

- Leishmania and bacteria. *Bioorganic Chemistry*, 114, 105041.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2021.105041>
- Pereira, Á., & Pérez, M. (2002). Leishmaniosis. *Offarm*, 21(July), 1–23.
- Piccolo, L., Pérez Elizondo, E., Álvarez Morales, L., Wang Zúñiga, C., & Sancho Torres, M. (2018). Leishmaniasis: Opciones terapéuticas en la población pediátrica. *Medicina Legal de Costa Rica*, 35(1), 52–64.
- Podešvová, L., Leštinová, T., Horáková, E., Lukeš, J., Volf, P., & Yurchenko, V. (2020). Suicidal Leishmania. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9020079>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006052.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006052>
- Rojas Madriz, B. (2019). Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. *Med. Leg. Costa Rica*, 36(2), 82–94.
- Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Zegarra, R., Garcés, N., & Regis, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, 14.
<https://doi.org/10.4324/9780429310232-26>
- Silveira, A., Oshiro, S., Nicholls, S., Buzanovsky, L., Sánchez, M., & Rivera, A. (2018). Informe Epidemiológico de las Americas- LEISHMANIASIS. *Paho*, 7.
- Sobrinho, J. C., Kayano, A. M., Simões-Silva, R., Alfonso, J. J., Gomez, A. F.,

- Gomez, M. C. V., Zanchi, F. B., Moura, L. A., Souza, V. R., Fuly, A. L., de Oliveira, E., da Silva, S. L., Almeida, J. R., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2018). Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A 2 from *Bothrops brazili* snake venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Pt A), 1014–1022. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.069>
- Spolaore, B., Fernández, J., Lomonte, B., Massimino, M. L., & Tonello, F. (2019). Enzymatic labelling of snake venom phospholipase A2 toxins. *Toxicon*, 170(July), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.019>
- Stábeli, R. G., Amui, S. F., Sant'Ana, C. D., Pires, M. G., Nomizo, A., Monteiro, M. C., Romão, P. R. T., Guerra-Sá, R., Vieira, C. A., Giglio, J. R., Fontes, M. R. M., & Soares, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 142(3–4), 371–381. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2005.11.020>
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2028-5/FIGURES/2>
- Suranse, V., Srikanthan, A., & Sunagar, K. (2018). *Animal Venoms: Origin , Diversity and Evolution. March*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000939.pub2>
- Tariq, L., Lazar, Y., & Abass, K. S. (2020). *Morphology, Life Cycle, Pathogenesis and Virulence Factors of Genus Leishmania : a Review*. 20(2), 4057–4060.

- Teixeira, S. C., da Silva, M. S., Gomes, A. A. S., Moretti, N. S., Lopes, D. S., Ferro, E. A. V., & Rodrigues, V. de M. (2022). Panacea within a Pandora's box: the antiparasitic effects of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. *Trends in Parasitology*, 38(1), 80–94. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2021.07.004>
- Toalombo, J., & Coque, M. (2021). Leishmaniasis en el Ecuador: revisión bibliográfica. *Mediciencias UTA*, 5(3), 2–11. <https://doi.org/10.31243/MDC.UTA.V5I3.1190.2021>
- Torres, O., Pazmiño, G., Ayala, F. & Salazar, D. (2022). Reptiles del Ecuador. Version 2022.1. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb>>, 13/07/2022
- Tovar, A., & Yasnot, A. (2017). Visceral Leishmaniasis in Latin America and Therapy Perspectives. *Revista MVZ Cordoba*, 22, 6075–6088. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1077>
- Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>
- World Health Organization. (2016). *Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 91(22), 285–296. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254451?locale-attribute=es&>
- Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., & Huang, C. (2017). *Snake Venom PLA 2 , a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. 2017.*