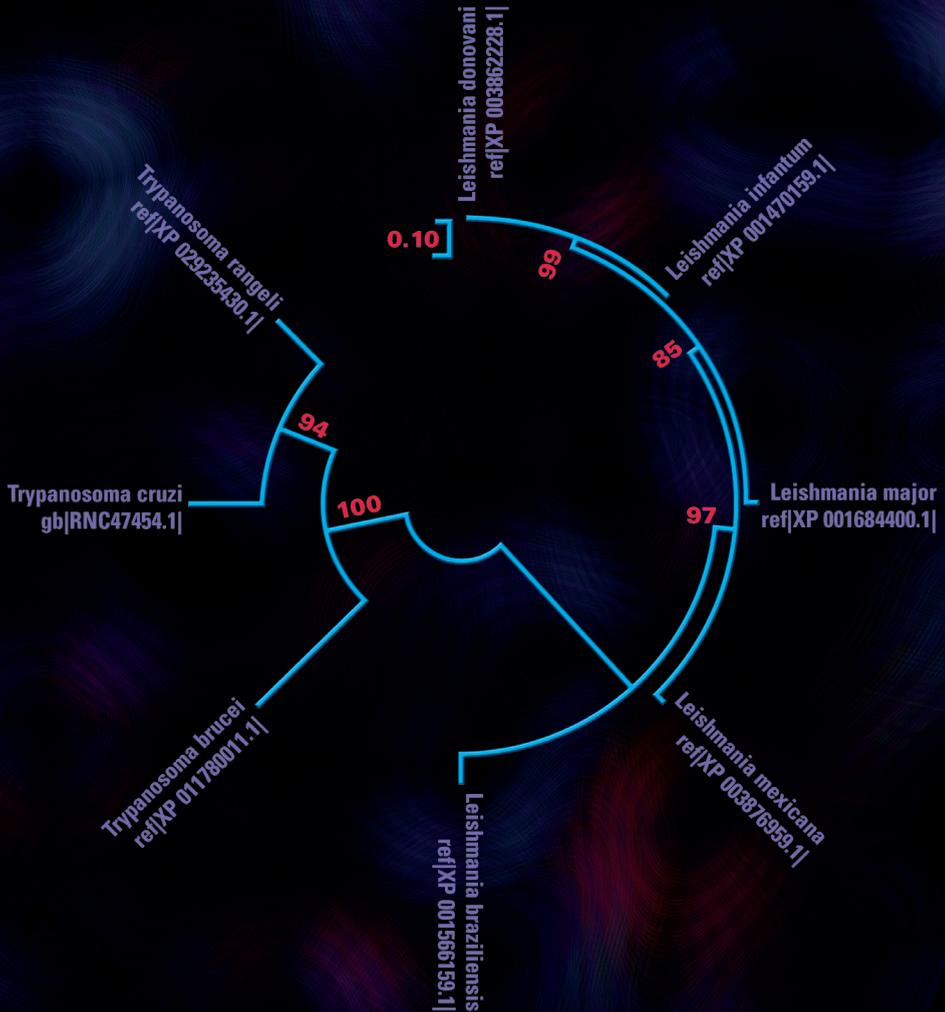


ALICIA PONTE-SUCRE  
**Fisiología imperceptible en**  
***Leishmania***



# Fisiología imperceptible en *Leishmania*

---

Alicia Ponte-Sucre

---

# **Fisiología imperceptible en *Leishmania***

**Señalización y transducción celular  
Rol en la interacción parásito-hospedero**

Trabajo de Incorporación como Individuo de Número, Sillón I  
junio, 2024





© Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, 2024  
Rif: J-002485728

Publicado por la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales  
Palacio de las Academias, av. Universidad, apartado postal 1421, Caracas 1010-A,  
Venezuela

Colección Trabajos de Incorporación

**Hecho el depósito de ley**

Depósito Legal (digital): DC2024001873

ISBN (digital): 978-980-6195-93-6

**Comisión Editora:**

Deanna Marcano (coordinadora)  
Ismardo Bonalde  
Gioconda San Blas

**Coordinación de edición:**

Pamela Navarro

**Corrección de texto:**

Pamela Navarro y Deanna Marcano

**Diagramación y diseño gráfico:**

María Alejandra Ramírez

**Diseño de portada:**

Pascual Estrada. Composición a partir de imagen de Anthony J. Febres A. Cladograma redondo para XP\_001566159.1, como proteína hipotética.

**Imágenes:** Pág. 23 ([www.news-medical.net](http://www.news-medical.net)); pág. 53 (<https://dndial.org/es/>)

Ninguna parte de esta obra puede ser modificada, pero es de libre acceso para su reproducción y transmisión en cualquier forma o por cualquier medio, siempre que ello vaya precedido con el nombre del autor y de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.

## Índice general

---

Prólogo	7
Agradecimientos	9
Preámbulo	11
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	15
1.1 Aspectos generales de la leishmaniasis	18
1.2 Leishmaniasis tegumentaria americana, caso Venezuela	18
2.1 Consecuencias de la dinámica digenética del ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	23
<b>Capítulo 2. <i>Leishmania</i>: una célula que interactúa</b>	23
2.2 Importancia de la interacción parásito-hospedero, quimiotaxis	25
2.2.1 Rol del flagelo	27
2.2.2 Actividad sensorial de los flagelos	30
3.1 Evolución de la señalización en <i>Leishmania</i>	33
<b>Capítulo 3. Señalización y comportamiento fisiológico</b>	33
3.2 Mecanismos de señalización acoplados a proteínas G	34
3.3 Sistemas de transducción, mensajeros intracelulares	38
4.1 Nutrientes (glucosa, aminoácidos)	39
<b>Capítulo 4. Tipos de señalización presentes en <i>Leishmania</i></b>	39
4.2 Sistemas acoplados a nucleótidos cíclicos	43
4.3 Sistemas GPCR	46
4.4 Rol de las proteínas RAMP o RAMP-Like	48
4.5 Identificación de GPCR-like en otros protozoos	51
<b>Capítulo 5. Reflexiones finales</b>	53
Referencias	59

*Dedicado a los niños del mundo, fuente de inspiración constante de  
mi trabajo docente y experimental,  
en el anhelo de dejarles un mundo mejor*

## Prólogo

---

Los parásitos, entre ellos *Leishmania*, son por definición organismos, en este caso unicelulares, que se asocian biológicamente a otro organismo, denominado hospedero. Los parásitos viven a expensas del hospedero. A través de esta relación, el parásito utiliza a los organismos hospedadores para cubrir sus necesidades básicas y vitales, como pueden ser su crecimiento y reproducción. Durante ese proceso, el parásito debe detectar señales de su entorno y procesarlas intracelularmente para desarrollar una conducta que le permita sobrevivir al entorno, que generalmente es hostil. En esa interacción usualmente el parásito causa daño al hospedador; este daño resulta, por ejemplo, en enfermedades de diversos tipos, en nuestro caso la leishmaniasis, la cual es una enfermedad compleja.

En el transcurso de mi carrera como fisiólogo y farmacólogo celular, me ha interesado entre otros temas, comprender cada uno de los pasos involucrados en esa interacción parásito-hospedero, ya que su disección puede resultar ventajosa para el desarrollo de nuevas estrategias de control, de prevención y de tratamiento. Por ello, en mi carrera académica he intentado desentrañar esa íntima relación y en este libro, expongo uno de esos procesos que hemos abordado, relativo al estudio de cómo el parásito detecta y procesa las señales del entorno y actúa en consecuencia. Para esa exploración utilizamos herramientas que incluyen estudios funcionales de quimiotaxis, bioquímicos de análisis por Western Blot y fisiología celular y diferentes metodologías de bioinformática.

Nuestros hallazgos que en muchos casos resultaron fascinantes, sugieren que en *Leishmania*, como buena célula eucariota, la presencia de proteínas y moléculas altamente conservadas y vinculadas a antiguos sistemas de señalización, presentes en las respuestas unicelulares, que potencialmente podrían estar involucradas en la cascada de transducción asociada a receptores acoplados a proteína G (GPCR), con funciones similares a las que se encuentran en eucariotas superiores, fundamentales para la supervivencia celular como son la taxis y la migración. Esto constata cuán lejos en la evolución se desarrollaron estos sistemas ancestrales de señalización y supervivencia en entornos hostiles y cómo la identificación molecular de GPCR en parásitos patógenos, en este caso *Leishmania* podría ser relevante en la comprensión de su patogénesis.

El objetivo perseguido es el de, analizar estas proteínas de membrana, lo cual podría ayudar a definir su papel en la interacción hospedero-patógeno y la supervivencia

de los parásitos dentro de las células hospederas y la caracterización de estas proteínas, lo cual podría colaborar en la identificación de objetivos farmacológicos alternativos, así como metodologías alternativas de control.

## Agradecimientos

---

Agradezco a diversas instituciones, especialmente a El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela (UCV), la Coordinación de Investigación, Facultad de Medicina-UCV, el Programa Iberoamericano de Ciencia, Tecnología y Desarrollo (CyTED), la Fundación Alejandro de Humboldt (AvHF)-Alemania, la Oficina Internacional de Intercambio Académico (DAAD)-Alemania, el Consejo Alemán de Investigación (DFG)-Alemania, la Universidad de Würzburg (Uni-Wue)-Alemania, el Instituto de Misiones para Enfermedades Tropicales (Med-Missio)-Würzburg-Alemania, La Academia de Ciencias «Siebold Colegium» (SCIAS)-Uni-Wue-Alemania, Universidad Semmelweis, Budapest, Hungría, Universidad de Helsinki, Finlandia, La Escuela de Biociencias y Tecnología, Vellore, Tami Nadu, India. Agradezco especialmente a los estudiantes y colegas profesores venezolanos e internacionales que han confiado en nuestro trabajo y desarrollaron sus retos de investigación en el laboratorio o en colaboración con nosotros. Un reconocimiento especial a la Sra. Pilar Rodríguez por las labores de mantenimiento del laboratorio y mi reconocimiento muy personal y especial a mis colegas-amigas las profesoras Maritza Padrón Nieves y Emilia Díaz López por la paciencia, la complicidad y la excelencia de los trabajos que durante tantos años hemos fraguado en conjunto. Gracias a todos.



## Preámbulo

---

Para una célula, al igual que para un organismo multicelular, percibir el ambiente que lo rodea y establecer una coordinación sensorial-motora es esencial para su supervivencia. Ello significa reconocer el entorno y los cambios que en él ocurren, y actuar en consecuencia. Incluso podría clasificarse como un proceso de aprendizaje que permite diferenciar un entorno adverso de uno amable, y que repercute en las transformaciones que ocurren en cada organismo en función de las señales recibidas en su membrana y de sus espacios intracelulares.

Pero, ¿cuál es la diferencia entre sensación y percepción?, palabras que nos rodean constantemente en nuestra vida diaria como humanos. Científicamente, la sensación connota un elemento objetivo, mientras que la percepción lo es a nivel subjetivo en el proceso sensorial-perceptivo, incluso en la célula (<https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/118241092/>).

De hecho, se define sensación como la capacidad de recibir y procesar señales que se originan fuera de sus fronteras, o la capacidad de procesar por medios físicos las señales del entorno. Las células individuales suelen recibir muchas señales simultáneamente y luego integran la información en un plan de acción unificado. Sin embargo, las células no son solo receptoras de señales, también envían mensajes a otras células cercanas y lejanas. Constantemente toman decisiones importantes, que implican una ampliación del concepto de percepción contextual y multimodal presente desde los seres humanos a las células individuales, las cuales toman decisiones de forma mucho más autónoma de lo que se pensaba anteriormente (<https://physicsworld.com/a/how-well-can-biological-cells-sense-their-environment/>).

Los órganos de los sentidos captan los estímulos que podríamos denominar como «puros», mediante proteínas especializadas (receptores) que eventualmente y luego de un proceso de transducción, los convierten, en el caso de los humanos, en impulsos nerviosos que viajan hasta el cerebro donde se produce una integración de señales que se traduce en la percepción, al interpretarse los estímulos y asociarlos a información y experiencias previas, conocimientos, emociones, etc. Es decir, que la percepción implica la detección consciente y la interpretación de un estímulo (<https://physicsworld.com/a/how-well-can-biological-cells-sense-their-environment/>). Acorde con información publicada por Lubbock en su libro de 1888 sobre los sentidos, los instintos

y la inteligencia de los animales, «encontramos en los animales órganos sensoriales complejos, ricamente provistos de nervios, pero cuya función aún no podemos explicar». Comparando los animales con los humanos, Lubbock señaló que el mundo «puede estar lleno de música que no podemos oír, de colores que no podemos ver, de sensaciones que no podemos concebir» (<https://www.americanscientist.org/article/the-doors-of-animal-perception>). De esta manera parece que queda mucho por descubrir y describir en este mundo de las sensaciones y las percepciones que nos permiten interactuar con el universo que nos rodea.

En esencia, entonces, la sensación se define como la detección física de un estímulo, mientras que la percepción incluye la detección y la interpretación consciente del estímulo, teniendo como sinónimos según la RAE (<https://dle.rae.es/percepci%C3%B3n>), impresión y sensación entre otros. La sensación consiste en tomar información del mundo exterior y transformarla. En el caso de los humanos, todos obtenemos la misma información sensorial. No obstante, todos percibimos esa información de manera diferente. De hecho, podemos preguntarnos, ¿puede haber sensación sin percepción? Y la respuesta parece ser sí. La sensación puede ocurrir antes de que percibamos esa sensación. Por ejemplo, nuestros órganos sensoriales pueden sentir un sonido antes de que lo interpretemos conscientemente. Las sensaciones pueden ser de diversos tipos y son captadas por diferentes órganos: visuales, gustativos, olfativos, táctiles, acústicos, dolor..., y varían en intensidad. La percepción implica una interpretación compleja de la realidad en la cual se atribuye «sentido» a los estímulos que el organismo capta, con un consecuente comportamiento observable. La sensación es objetiva, la percepción subjetiva (<https://opentext.wsu.edu/psych105/chapter/5-2-sensation-versus-perception/>).

En los organismos unicelulares, al igual que en los organismos más complejos, y tal como ya mencionamos, es fundamental recoger información de su ambiente externo y desde su medio interno a fin de mantener eficazmente su homeostasis. Para estos fines existen igualmente sistemas de detectores que representan formas distintas de receptores, con una organización morfofuncional generalmente diferente, equivalente a los receptores sensitivos.

Estos receptores presentan una organización funcional usualmente conservada durante la evolución, con la capacidad de transformar la energía de los estímulos en el lenguaje de información que manejen los diversos sistemas (señales químicas, físicas, de temperatura, etc.), al transducir la información y convertirla en un comportamiento.

Así, el desarrollo, organización y coordinación de la conducta de los organismos (cualquiera que sea) depende de su comunicación con su entorno, tanto abiótico (factores ambientales) como biótico (entre organismos de la misma especie o no). Cuando una célula recibe una señal a través de un receptor, se inicia una serie de pasos en una red interna de interpretación que incluye muchas estructuras, incluso zonas de

su genoma. Así, el significado de una señal y de su intensidad, depende de complejas interpretaciones llevadas a cabo por la célula, y sus moléculas receptoras.

Finalmente, si en organismos unicelulares hay percepción, es una pregunta abierta, pero ciertamente, la sensación y la percepción son procesos íntimamente ligados a la función de los receptores y la conjunción de ambos, «determina la imagen del mundo a construir».

Reitero que el *leitmotiv* del Laboratorio de Fisiología Molecular ha sido comprender los procesos fundamentales que intervienen en funciones esenciales relacionadas con la homeostasis y la preservación de la vida en organismos Trypanosomatideos. Parte del enfoque ha sido hacia el estudio de los mecanismos responsables de la susceptibilidad, o la resistencia a drogas, en estos parásitos metabólicamente flexibles. En el presente trabajo presentamos una parte más fisiológica de nuestra aproximación, la cual está en relación con la comprensión de algunos de los mecanismos de transducción de señales que podrían estar involucrados en la detección de ese entorno muchas veces hostil que acompaña el ciclo de vida de *Leishmania*.

Por ello y para el objeto del presente trabajo, me referiré exhaustivamente a lo que denomino: Fisiología imperceptible en *Leishmania*. Sensación y percepción de señales y transducción intracelular. Rol potencial en la interacción parásito-hospedero.



---

## 1. Introducción



La leishmaniasis constituye un espectro de enfermedades potencialmente mortales y desfigurantes causadas por la infección con parásitos protozoarios del género *Leishmania*, catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedad infecciosa Categoría I en situación emergente e incontrolada, e incluida en la lista de enfermedades tropicales desatendidas (*neglected tropical disease*, NTD) [1, 2], la leishmaniasis es endémica en 98 países; 14 millones de personas permanecen infectadas y más de 350 millones se encuentran en riesgo [3]. Alrededor de 1,3 millones de personas contraen la enfermedad anualmente; 300 000 casos corresponden a leishmaniasis visceral (LV) con 90 % en Bangladés, Brasil, Etiopía, India, Nepal y Sudán y 1 000 000 corresponden a leishmaniasis tegumentaria (LT), principalmente en Afganistán, Arabia Saudita, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, Siria y Túnez. El estimado de muertes por LV oscila entre 20 000 y 50 000 fallecidos cada año [2]. Estas cifras constituyen la *punta del iceberg*, ya que solo 40 de los 98 países donde la enfermedad es endémica reportan adecuadamente sus estadísticas sanitarias a la OMS [4].

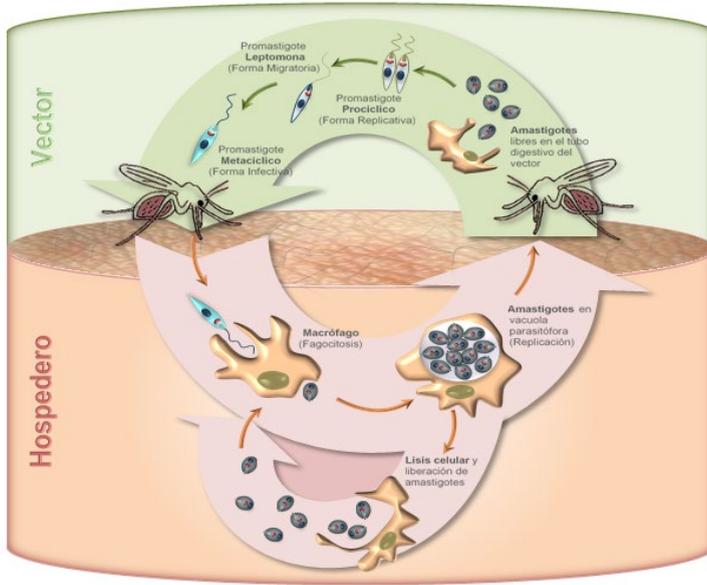
La forma infectiva de *Leishmania* es el promastigote metacíclico. Este invade al mamífero mediante la picadura de insectos que actúan como vectores biológicos, hembras hematófagas, dípteras de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae [5]. Existen unas 600 especies de flebotominos, conocidos comúnmente como jejenes o moscas de la arena; aproximadamente 30 son vectores biológicos de *Leishmania*, y unas 40 especies adicionales participan en la transmisión.

Epidemiológicamente, se describen tres ciclos de transmisión en *Leishmania*: (i) **ciclo selvático**: infección humana accidental, ocurre cuando el individuo invade los nichos ecológicos en los cuales abundan reservorios silvestres, el parásito llega al hombre mediante vectores zoonotópicos (ejemplo: *Lutzomyia ovallesi* vector de *Leishmania (V.) braziliensis*); (ii) **ciclo peridoméstico**: animal peridoméstico o doméstico como reservorio, el parásito se transmite al hombre por vectores zoonotópicos y antropofílicos (ejemplo: *Lu. longipalpis* vector de *L. infantum*), y (iii) **ciclo antroponótico**: reservorio no identificado, los vectores son exclusivamente antropofílicos (ejemplo: *Phlebotomus argentipes* vector de *Leishmania (L.) (L.) donovani*) [5].

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando el vector (hembra hematófaga), al alimentarse del hospedero susceptible, regurgita entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos infectivos que al ser depositados en la piel son captados por las células del sistema reticuloendotelial (macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos) [6,7]. Luego de la fagocitosis, surge una vacuola parasitófora donde, en el transcurso de 12 a 24 horas, el promastigote se diferencia en amastigote, se multiplica activamente por fisión binaria hasta causar lisis celular, libera amastigotes e invade nuevas células fagocitarias. El ciclo continúa cuando un nuevo flebotomino ingiere la sangre de un hospedador infectado. En el tubo digestivo del vector, al cabo de 24 a 48 horas, los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos; estos se multiplican activamente; algunos se diferencian en formas intermedias no infectivas (nectomonas, leptomonas y haptomonas) y tras un período de 6 a 9 días, las leptomonas migran hacia la faringe del vector, donde se origina la forma infectiva (promastigote metacíclico) cerrándose el ciclo (**Figura 1**) [8, 9]. La infección también puede ocurrir por transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, transmisión congénita, contacto sexual, accidentes de laboratorio y uso compartido de agujas hipodérmicas [10,11,12]. Adicionalmente, la leishmaniasis visceral canina (LVC) es un problema veterinario, y constituye un reservorio para la infección humana [13,14].

El perfil epidemiológico y clínico de la leishmaniasis está determinado por la biología del parásito y la compleja interacción que el mismo establece con sus hospederos. La plasticidad del genoma de *Leishmania* es una característica peculiar que se pone de manifiesto, por ejemplo, en cómo se altera el número de copias cromosómicas de su genoma y cómo ocurre la amplificación genética en ellos. Se presume que esta plasticidad genómica es un elemento crucial que permite a *Leishmania* sobrevivir a las presiones ambientales a las que está sometida durante su ciclo de vida y que es posiblemente fundamental para evadir el tratamiento quimioterapéutico [15].

La patogenia de la enfermedad varía según la especie de *Leishmania* infectante. No es menos cierto que la infección con una misma especie puede ocasionar una respuesta inmune apropiada con resolución exitosa de la infección, o en una alteración de la respuesta inmune, que se traduce en la proliferación de parásitos o inflamación, y des-



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Alcazar W, comunicación personal [19].

emboca en el amplio espectro de manifestaciones de la enfermedad, como resultado de la inmunopatología asociada. Esto sugiere que la interacción parásito-hospedero, aunque sujeta a parámetros que podríamos calificar como generales, es un evento único que depende del comportamiento de ambos protagonistas, el hospedero y el parásito en el momento en el que interactúan [16].

La comprensión de la contribución del hospedero (humano) a esta interacción y los resultados de ella, requiere de estudios epidemiológicos y genómicos que examinen la diversidad intrínseca de los parásitos, y de análisis que permitan comprender los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos que modulan la interacción entre ambos desde el nivel molecular y celular hasta el nivel sistémico. Esto es especialmente importante dado que los parásitos de *Leishmania* codifican mecanismos que modulan los procesos inmunes del hospedero y a que la modulación mutua que ocurre entre ambos está íntimamente asociada a la especie de parásito infectante [7].

Así, entender cómo la especie infectante de *Leishmania* influye en la expresión de un «tipo» de leishmaniasis requiere de la comprensión de la biología celular de la especie de parásito en cuestión y de las presiones selectivas a las cuales ese organismo está sometido a lo largo de su ciclo de vida (ver **Figura 1**). Finalmente, dado que los humanos constituimos «un hospedero accidental», y no somos el principal reservorio dentro del espectro de los vertebrados para este parásito, la calidad de la respuesta individual estará influenciada por la respuesta inmunitaria y el tropismo tisular [17].

## 1.1 Aspectos generales de la leishmaniasis

Adicionalmente, las interacciones entre los vectores y los reservorios definen el espectro de leishmaniasis que se presenta en un área geográfica específica. A medida que ese hábitat sufre las consecuencias del cambio climático y los conflictos sociales, los ecosistemas sobrellevan alteraciones que impactan la distribución y tipos de leishmaniasis [18], entre otros.

Otro tema importante de resaltar lo constituye el hecho de que la quimioterapia contra la leishmaniasis es un desafío constante debido a diversos factores, que incluyen altos costos del tratamiento y fracaso terapéutico. En múltiples ocasiones este último se relaciona con prevalencia de resistencia –de los parásitos– a los medicamentos. Esto implica que es fundamental resguardar la eficacia terapéutica de los pocos medicamentos existentes, así como de los nuevos que se diseñen, contra la potencial emergencia de resistencia a ellos.

## 1.2 Leishmaniasis tegumentaria americana, caso Venezuela

Los protozoarios del género *Leishmania* producen diversas manifestaciones de la enfermedad. Los síntomas están determinados por factores ligados al hospedero y a la especie infectante [5]. Clínicamente, se han descrito dos categorías de la dolencia, ya mencionadas: LV, causada por especies viscerotrópicas, que se desarrollan mejor a temperaturas superiores a 37 °C, y LT, causada por especies dermatotrópicas, adaptadas a temperaturas cercanas a 35 °C; estas últimas crecen preferencialmente en áreas expuestas de la piel y mucosas [20-22]. En el Nuevo Mundo, la LT se conoce como Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA), y puede presentarse como: Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL), Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LD), Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) y Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) [8, 20, 23, 24]. Una forma poco común de LT frecuente en pacientes de India, Nepal, Sudán y Etiopía, ocurre luego de tratamientos repetidos e ineficaces contra LV. La misma se denomina Leishmaniasis Dérmica Post kala-azar (LDPK), y está asociada a infecciones recurrentes con *L. (L.) donovani*. [5].

El estatus inmunológico del paciente determina, en gran medida, el tipo de leishmaniasis que lo afecta. Individuos anérgicos, sin respuesta inmunitaria adecuada, desarrollan LCD, con abundancia de parásitos en las lesiones [24-26]. Personas normérgicas, con reactividad inmunitaria normal, suelen desarrollar LCL, benigna y autolimitante; individuos hipérgicos, con hiperreactividad inmunitaria a los parásitos, desarrollan LMC, lesiones amplias, escasa presencia de parásitos y abundante infiltrado celular [23, 27].

Desde la década de los 90, la coinfección de *Leishmania* con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) constituye un problema recurrente [28]. Muchos casos están

asociados con LV, mas también se reportan casos de LT [29]. Incluso especies de *Leishmania* típicamente dermatrópicas, producen LV en pacientes portadores del virus [29,30]. Ambos patógenos actúan de forma sinérgica, favoreciendo la infección recíproca. Así, *L. (L.) donovani* induce la expresión de VIH *in vitro* en células infectadas, mediado por el lipofosfoglicano de la membrana celular del parásito, que estimula la producción de del factor de necrosis tumoral a (TNF-a) [31]. Individuos inmunodeficientes son más vulnerables a la leishmaniasis, aumentando 100 a 1000 veces el riesgo de infección por *Leishmania* spp. [25].

De Lima y colaboradores [32] describen que Iturbe y González documentaron el primer caso de leishmaniasis en Venezuela, en 1917. Posteriormente, con la creación del Instituto Nacional de Dermatología y, a partir de 1971, el registro regular de casos se sistematizó. Y la creación del Instituto de Biomedicina, en 1984, optimizó aún más la frecuencia de los reportes de nuevos casos de la enfermedad. Para el año 2012, Venezuela ocupaba el quinto lugar en América, en cuanto a incidencia anual de la enfermedad, con 2520 casos reportados, después de Brasil (29 489 casos), Colombia (17 480 casos), Perú (6405 casos) y Bolivia (2647 casos) [33].

En la actualidad, el programa de control de la leishmaniasis es responsabilidad del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina (SAIB), ente adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) con sede en la ciudad de Caracas [25,34]. El SAIB dirige, a nivel nacional, los Servicios Regionales de Dermatología Sanitaria (SRDS), destacados en cada una de las entidades federales del país.

La LV tiene escasa incidencia en Venezuela (0,03 a 0,24 por cada 100 000 habitantes) [25], con unos 40 casos cada año [33]; epidemiológicamente, 12 de los 23 estados del país (Anzoátegui, Aragua, Bolívar, Carabobo, Cojedes, Falcón, Guárico, Lara, Nueva Esparta, Portuguesa, Sucre y Trujillo) están afectados. Se describen tres zonas endémicas (regiones central, oriental y occidental de la geografía nacional) [33-36], con notable subregistro de casos [35]. La LT constituye oficialmente un problema de salud pública [25], presente en todas las entidades federales, excepto en los estados Nueva Esparta y Delta Amacuro. Los perros constituyen reservorios importantes de tomar siempre en cuenta [37]. Para el período 1998-2012, hubo un total de 35 653 casos en las diversas formas clínicas, con una tasa de incidencia anual que varió a lo largo de este período entre un mínimo de 5,3 por cada 100 000 habitantes (2011) y un máximo de 11,8 por cada 100 000 habitantes (2003) [25]. La LT representa el 98,4 % de los casos reportados cada año [33], de los cuales 98,67 % corresponden a LCL; 1,11 % LMC y 0,22 % LCD [32].

Varios vectores están asociados a la transmisión de LT en Venezuela: *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. ovallesi*, *Lu. youngi*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. trinidanensis*, *Lu. reducta*, *Lu. spinocrassa*, *Lu. umbralitis* y *Lu. hartmanni*; en tanto que *Lu. longipalpis*,

*Lu. evansi* y *Lu. pseudolongipalpis* son responsables de LV [38,39] (Tabla 1) mas no se ha descrito especificidad estricta vector-parásito o vector-forma clínica.

**Tabla 1.** Leishmaniasis en Venezuela, especies de *Leishmania* y sus vectores

Siglas enfermedad	Parásitos identificados <i>Leishmania</i> spp.	Vectores involucrados <i>Lutzomyia</i> spp.	Referencias
LV (1,6 %) <sup>a</sup>	<i>L. infantum</i> ( <i>L. chagasi</i> )	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i> <i>Lu. pseudolongipalpis</i>	[2,33]
LCL (98,67 %) <sup>b</sup>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>Lu. youngi</i> <i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. trinidadensis</i> <i>Lu. spinicrassa</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. flaviscutelata</i> <i>Lu. reducta</i> <i>Lu. olmeca bicolor</i>	[2, 34]
LD (<0,1 %) <sup>b</sup>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>	Sin información	[25]
LCD (0,22 %) <sup>b</sup>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>Lu. flaviscutelata</i> <i>Lu. reducta</i> <i>Lu. olmeca bicolor</i>	[2,34]
LMC (1,11 %) <sup>b</sup>	<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. trinidadensis</i> <i>Lu. spinicrassa</i> <i>Lu. panamensis</i>	[1,33]

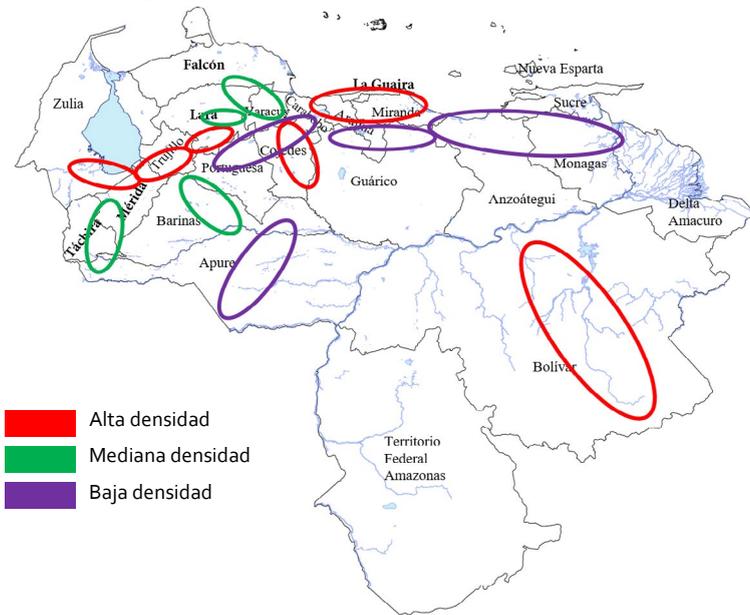
<sup>a</sup> Porcentaje de casos de leishmaniasis visceral según la OMS, período 2004-2008 [33].

<sup>b</sup> Porcentaje de casos de leishmaniasis tegumentaria, período 1988-2007 [32].

LV: leishmaniasis visceral. LCL: leishmaniasis cutánea localizada. LD: leishmaniasis cutánea diseminada. LCD: leishmaniasis cutánea difusa. LMC: leishmaniasis mucocutánea.

Basado en los rangos de incidencia de LT por entidad federal (1988-2007), se describen cuatro regiones epidemiológicas: la primera, de alta incidencia, que incluye Trujillo y Mérida, con tasas superiores a 30 casos por cada 100 000 habitantes; una segunda región de mediana incidencia (Lara, Sucre, Táchira y Cojedes), con tasas de 20 a 30 casos por cada 100 000 habitantes; a esta región le sigue una de baja incidencia (Yaracuy, Miranda y Anzoátegui), con tasas de 10 a 20 casos por cada 100 000 habitantes, y finalmente, el resto de las entidades con una escasa incidencia y tasas inferiores a 10 por cada 100 000 habitantes (Figura 2) [32].

El 17,89 % de la población, que habita en el 26,88 % de las parroquias del país, está en riesgo moderado a alto de contraer la enfermedad, siendo las zonas montañosas las



**Figura 2.** Densidad de distribución de leishmaniasis tegumentaria (LT) en Venezuela (elaboración propia). Mapa: Grisela Velásquez, Unidad de Sistemas de Información Geográfica, UniSIG-IVIC.

más afectadas [32, 35]. Relativo a los casos de coinfección *Leishmania*/VIH descritos durante el período 2000-2013, de 36 de ellos, aproximadamente el 81 % presentó LT. Las formas clínicas predominantes fueron LCL y LMC; las zonas más afectadas fueron los estados Bolívar (31 %), Anzoátegui (22 %), Lara (14 %) y Aragua (11 %) [25].

Los esquemas terapéuticos contra la leishmaniasis están en constante revisión y se aplican acorde a la forma clínica, número y localización de lesiones, especie de *Leishmania*, ubicación geográfica, disponibilidad de medicamentos, factores relacionados con el paciente y consideraciones de salud pública [2,40,41]. En marzo de 2010, la OMS reunió a un «Comité de Expertos en Leishmaniasis» para revisar las recomendaciones sobre el tratamiento y control publicadas en el año de 1990. De allí surgió la publicación *WHO Technical Report Series, 949 - Control of the Leishmaniasis* [2], actualizada por la Organización Panamericana de la Salud [41], mediante la guía *Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento*, que recoge los esquemas terapéuticos efectivos contra la enfermedad en el Nuevo Mundo.

Un ejemplo palpable lo constituye lo que ocurre en el subcontinente de la India. Después de décadas de uso extensivo de los antimoniales (SSG) estos han tenido que ser sustituidos por la miltefosina (MIL), debido a la emergencia masiva de farmacoresistencia contra los SSG. De hecho, en esta geografía, la resistencia a los antimoniales pentavalentes representa uno de los retos más grandes para lograr el control, especial-

mente de la LV. Lamentablemente, al cabo de al menos una década de comenzar el uso generalizado de MIL, su eficacia ha disminuido significativamente, afortunadamente, aún no completamente asociada con resistencia a drogas (RD) MIL-RD [42-44]. La información recopilada sobre SSG-RD y la descripción de mecanismos experimentales de MIL-RD permiten comprender mejor qué sucede.

En ambos casos, la RD puede contrarrestarse con terapia combinada. Qué usar es una pregunta recurrente, especialmente si uno de los objetivos es mantener los niveles de la droga en aquellos que permitan que la acción de la misma sea exitosa. Queda claro entonces que el estudio de la resistencia a drogas debe formar parte de los proyectos de descubrimiento de fármacos contra la leishmaniasis y que los estudios de RD deben estar involucrados en el desarrollo de fármacos. Estos análisis son fundamentales para conocer: (i) la eficacia de nuevos compuestos en conjuntos de cepas que incluyan aislados clínicos recientes que expresen RD, y (ii) optimizar aún más los compuestos potencialmente útiles y monitorear exhaustivamente los ensayos clínicos. De hecho, los ensayos clínicos en curso y guiados por la iniciativa *Drug for Neglected Diseases Initiative* (DNDI), incluyen siempre el análisis de una terapia combinada y ensayos para todos los tipos de leishmaniasis, incluyendo aquellos refractarios a los medicamentos en uso [45,46].

La breve descripción de todos estos enfoques ilustra la complejidad asociada a esta enfermedad y cómo la comprensión de cada uno de los pasos e interacciones puede resultar ventajosa para el desarrollo de nuevas estrategias de control, de prevención y de tratamiento. En este trabajo, exponemos uno de esos procesos relativo a la comprensión de cómo el parásito detecta y procesa las señales del entorno y actúa en consecuencia.

---

## 2. *Leishmania*: una célula que interactúa

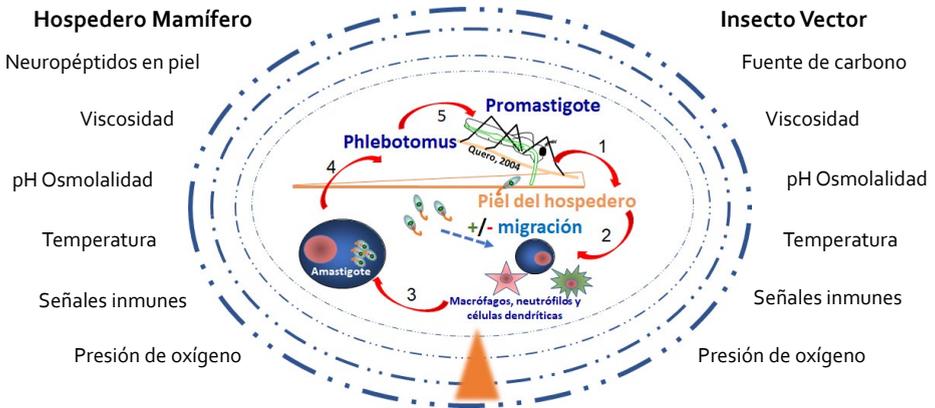


El ciclo de vida de *Leishmania* es digenético. El parásito se transmite entre un vertebrado –generalmente mamífero– y un insecto vector. Es decir, exhiben un ciclo de vida con etapas de desarrollo que representan un desafío constante para estos organismos (ver **Figura 3**). La diferenciación hacia la siguiente etapa de desarrollo implica la expresión de mecanismos y sistemas fisiológicos que colaboran en la «sensación» –detección– del microambiente impuesto por el hospedero y la respuesta consecuente. Este hecho es clave para su supervivencia y los parásitos deben adaptar su biología y fisiología al medio inmediato y expresar sistemas que detecten las oscilaciones externas y las procesen en las respuestas adecuadas [47].

### 2.1 Consecuencias de la dinámica digenética del ciclo de vida de *Leishmania*

Las condiciones dinámicas representadas por los niveles fluctuantes de los químicos, los nutrientes, la presión y la temperatura (ver **Figura 3**), por ejemplo, constituyen una fuente de presión ambiental; esto es lo usual para cualquier célula, en este caso *Leishmania*, en el hospedero vertebrado o en el insecto vector, así como durante su transferencia de uno a otro. La supervivencia durante este tránsito implica que *Leishmania* debe tener capacidad para detectar estos mínimos cambios ambientales externos. Para ello, los mecanismos de interacción célula-célula –cuyo origen se remontan a millones de años– son claves para lograr una infección exitosa [48].

Más aún, el traslado de un hospedero a otro, cada uno, con un *milieu* fisiológico que difiere tremendamente entre ellos, suele ser brusco y repentino y requiere una



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp. y fuentes de estrés a las cuales el parásito está sometido en el hospedero mamífero y el insecto vector. Tomado y modificado de Díaz *et al.* 2022 [155], artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia de Creative Commons (CC BY).

rápida reprogramación molecular y celular. Por ejemplo, los cambios de temperatura y pH son determinantes durante el ciclo de vida de *Leishmania*, para la diferenciación exitosa del parásito; por lo tanto, la comunicación constante entre ambos, el hospedero y el parásito modula e influye el comportamiento del otro mediante, por ejemplo, moléculas liberadas por el parásito que, como veremos, armonizan la respuesta del hospedero [48].

Los parásitos ajustan a nivel fisiológico la expresión de genes específicos, la actividad de ciertas proteínas, o la progresión durante el ciclo celular, como respuesta a estas oscilaciones de señales en el medioambiente. Sin embargo, las vías de señalización utilizadas por estos parásitos, para percibir «lo que hay ahí fuera», y su transducción en respuestas que pudieran ser evaluadas cuantitativamente, han sido esquivas, parcialmente debido a que las moléculas involucradas pueden diferir en el parásito [49] en comparación con las descritas en eucariotas superiores.

En estos patógenos el tamaño del genoma se reduce y se evidencia falta de regulación génica con respecto a la transcripción; los genes se transcriben de forma policistronica, sin constituir operones funcionalmente relacionados o regulados conjuntamente [50]. El significado funcional de este hecho es que los Trypanosomatidae en general, incluyendo *Leishmania*, son incapaces de regular rápidamente la expresión de genes fundamentales para adaptarse, por ejemplo, a los cambios ambientales. Aun así, expresan una variabilidad genética constitutiva, que se traduce en términos prácticos en aneuploidía (implica que los cromosomas pueden ser supernumerarios o no estar presentes), y en la capacidad de seleccionar haplotipos específicos fundamentales para su supervivencia. Ambos procesos representan una ventaja que permite su adaptación

fisiológica, aunque potencialmente implica una posible pérdida de heterogeneidad genética. Este comportamiento, evaluado en diversas especies de *Leishmania*, incluyendo *L. (L.) donovani* [51] evidencia que Trypanosomatidae conserva gran flexibilidad de adaptación como población.

Los genomas de Trypanosomatidae han sido secuenciados [52-54], pero la mayoría de los tipos de proteínas de membrana que median la detección sensorial ambiental en eucariotas, i.e., receptores acoplados a proteína G (GPCR), proteínas G heterotriméricas, o receptores tirosina quinasas, parecieran no estar presentes en estos eucariotas unicelulares [55], al menos como proteínas homólogas a las descritas en los eucariotas superiores. Además, aún no se conocen completamente los mecanismos de señalización mediados por proteínas ortólogas.

¿Cómo entonces estos patógenos detectan y responden a los cambios ambientales?, es una pregunta abierta [55]. Hay evidencias, al menos, en parásitos Apicomplexa [56], que describen en *Plasmodium (P.) falciparum* un GPCR putativo (PfSR25) [57]. Este GPCR putativo parece similar en todas las especies de *Plasmodium*, y no hay indicios de proteínas homólogas a ella en humanos. PfSR25 parece un sensor iónico para la detección de cambios en la concentración de  $K^+$  extracelular durante el proceso de salida/invasión celular. Por otra parte, los sistemas de señalización de nucleótidos cíclicos existen en parásitos protozoarios y comparten características, –pero con llamativas diferencias–, con sus hospederos mamíferos. Un ejemplo de ello es el caso de los bloques canónicos de cascadas de transducción tipo ciclasas, fosfodiesterasas y proteínas quinasas específicas de nucleótidos. Estas cascadas, también expresadas en estos parásitos, tienen un modo de activación y acción aún no completamente dilucidado [58].

Pero, ¿podría ser que las vías de señalización mediadas por proteína G estén completamente ausentes en Trypanosomatidae? Para analizar en profundidad estas preguntas, en este trabajo examinamos la perspectiva evolutiva de esta señalización, seguida de una breve descripción de su esquema, que incluye lo detallado en estos parásitos. La discusión se centra en lo descrito en *Leishmania*, y la contribución de nuestro laboratorio a este tema, especialmente en lo que respecta a las denominadas proteínas modificadoras asociadas al receptor (RAMP), finalizando con un análisis más extenso que se abre a otros organismos.

## 2.2 Importancia de la interacción parásito-hospedero, quimiotaxis

Las respuestas quimiotácticas son fundamentales para identificar los cambios constantes que ocurren en el ambiente a través del cual transcurre el parásito durante su ciclo de vida. Por ejemplo, factores liberados por las células inmunitarias de la piel modulan la motilidad del parásito a fin de promover la invasión e infección de la célula hospedera [59]. Aunque los flebotomos machos se alimentan de jugos de plantas,

los flebótomos hembras necesitan sangre para la maduración de los huevos [60], por ello son hematófagos. Mientras se nutre de un hospedero infectado, la hembra ingiere la forma amastigota del parásito, que se transforma en promastigote flagelado en la luz intestinal del flebótomo [61]. La alcalinización y modulación de los niveles de proteasas en el intestino medio del insecto –después de la ingestión de sangre–, así como la posterior disminución del nivel de actividad proteolítica al consumirse la sangre, promueven el desarrollo del promastigote en el intestino de los flebótomos hasta diferenciarse en parásitos infecciosos. Esto significa que la dinámica de crecimiento y diferenciación dentro del insecto vector está relacionada con cambios en el pH, hemolinfa, azúcares y entre otros, los niveles de aminoácidos [62]. Los procesos de quimiotaxis podrían ser un elemento clave en estos eventos para inducir la diferenciación del parásito a infeccioso, y su posterior migración desde las porciones anteriores del sistema gastrointestinal a la válvula cardioesofágica [63].

¿Qué tipo de sistemas sensoriales expresan?, ¿qué tipo de señales detectan y cómo integran la información recibida en una conducta medible?, son cuestiones clave a analizar, como hemos mencionado anteriormente. La comprensión de estos temas es fundamental para entender la virulencia y la patogenicidad de *Leishmania*. Por ejemplo, trabajos recientes se han centrado en la influencia de la microbiota residente en la infección del vector por *Leishmania*, describiendo que en el flebótomo este elemento es fundamental para el desarrollo del parásito y la transmisión al próximo hospedero. Incluso se sugiere que su eliminación altera la osmolaridad del ambiente intestinal y es perjudicial para el desarrollo y la diferenciación de *Leishmania* [64].

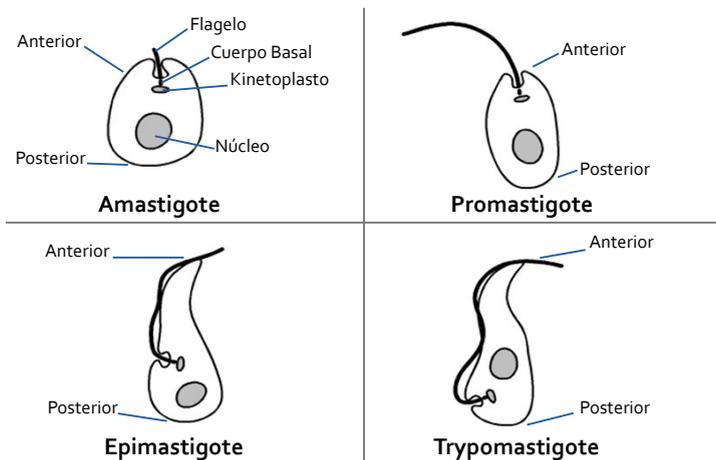
La inoculación de promastigotes (metacíclicos) en la piel (reservorios humanos o mamíferos) por la picadura del vector inicia la infección, lo que significa un cambio brusco en el medioambiente del parásito. Los parásitos «invasores» se reconocen como agentes extraños, que desencadenan respuestas fisiológicas y guían las acciones del hospedero a fin de aislar y eliminar el patógeno invasor presente en la piel. La respuesta incluye la activación de células y moléculas inflamatorias e inmunológicas, entre ellas los neuropéptidos, las citocinas, etc., que modulan e impactan en el resultado final y que orientan el sistema hacia la instalación de la enfermedad (con supervivencia del parásito) o hacia tasas variables de curación, incluyendo la espontánea (si el hospedero puede controlar la infección) [7]. Esto significa la participación de los parásitos de *Leishmania* y de las funciones del sistema nervioso cutáneo para lograr una interacción exitosa entre macrófagos y promastigotes, y promover el inicio de procesos inflamatorios son fundamentales para tener uno u otro resultado [65].

El éxito final dependerá de la respuesta a las señales recibidas. La piel es el lugar clave donde se procesan estas señales para construir una respuesta; la piel como órgano, detecta señales circundantes, percibe e integra estímulos ambientales, y reacciona. En este proceso, las proteínas de membrana de *Leishmania* trabajan como una interfaz de

comunicación extra e intracelular. El objetivo, preservar la integridad y la supervivencia del parásito a lo largo de su ciclo de vida. Los péptidos activos biológicos de la piel (autónómicos y sensoriales) se liberan durante la infección por *Leishmania* y al modular la interacción hospedero-parásito juegan un papel clave en el resultado final de la infección. Se han usado diversos modelos de *Leishmania* para evaluar este vínculo íntimo, incluyendo la función de los macrófagos durante la infección del parásito [66-69].

### 2.2.1 Rol del flagelo

Los flagelos y los cilios se han considerado tradicionalmente organelos asociados a la motilidad. Se sabe que cumplen otras funciones en células eucariotas aisladas y en metazoos. Entre estas otras actividades destaca su papel a nivel sensorial para la detección de las señales del entorno. Debido a ello se les compara con «antenas» que transmiten información sobre el medio extracelular al interior de la célula. Muchos patógenos unicelulares tienen flagelo y este organelo es crucial para actividades, por ejemplo, durante la colonización de los hospederos, constituyendo una interfaz clave entre el parásito y las células hospederas. En los Trypanosomatideos, incluyendo *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*, así como muchas especies de *Leishmania*, el flagelo es característico de su morfología extracelular durante varias etapas del ciclo de vida, y su función en la biología del parásito ha sido explorada durante décadas; estos estudios están muy bien detallados en el artículo de Kelly *et al.* 2020 [70]. El tamaño y morfología del flagelo varía según la especie y la etapa del ciclo de vida, como se muestra en la **Figura 4** y se describe magistralmente en el artículo de Kelly *et al.*, 2020 [70]. *T. brucei* presenta un flagelo que se adhiere al cuerpo celular a lo largo de la mayor parte de su longitud, con solo la punta anterior libre, mientras los flagelos de la forma epimastigote de *T. cruzi* tienen una región extensa de unión al cuerpo, con una larga sección de flagelo libre.



**Figura 4.** Formas celulares de los Trypanosomatidae. Por Richard Wheeler (Zephyris) 2006. Tomado de Wikipedia: [https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Trypanosomatid\\_Cellular\\_Forms.png](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Trypanosomatid_Cellular_Forms.png)

De hecho, estos parásitos, especialmente *T. brucei*, se considera un organismo modelo para el estudio de la estructura y función flagelar [71,72], con enfoques cada vez más sofisticados de genética molecular y biología celular que facilitan la disección de la función de este organelo. Una característica interesante de estos parásitos es la capacidad del flagelo de participar en los procesos de interacción parásito-hospedero durante los eventos que llevan a la instauración y mantenimiento, así como transmisión de la infección. Gran parte de la investigación realizada hasta la fecha sobre flagelos de Trypanosomatidae se ha centrado en sus propiedades motiles y las características estructurales y bioquímicas de las estructuras orgánicas internas, como el axonema, en la promoción de la motilidad del parásito [71-74]. Adicionalmente, el flagelo juega un rol central en definir la forma celular, la morfogénesis y la polaridad [75, 76] celular, y muchos estudios relacionados con esta función se han centrado en los componentes internos flagelares.

Los flagelos de los promastigotes de *Leishmania* están en gran parte libres con relación al cuerpo celular, emergiendo sin ataduras del bolsillo flagelar [74], invaginación de la membrana plasmática desde la cual se extienden estos organelos en estos organismos. Los amastigotes intracelulares de cualquiera de las especies de *Leishmania* o *T. cruzi* tienen flagelos cortos que apenas emergen del bolsillo flagelar [77].

Estas diferencias estructurales de los flagelos determinan la especialización funcional que cumple este organelo en las diversas especies y etapas del ciclo de vida. En formas procíclicas de *T. brucei* el flagelo les permite nadar «direccionalmente» por largas distancias, los promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*, con un flagelo «más libre» hacen cambios frecuentes de dirección y participan en actividades de «volteretas» [78]. Más aún, el comportamiento direccional natatorio puede diferir dependiendo de la composición física del medio, y del estadio de ciclo de vida [2], como se ha demostrado en formas sanguíneas de *T. brucei* [79,80].

Las formas flageladas de *Leishmania* con flagelos extendidos son móviles y pueden cambiar o invertir la dirección del movimiento y dar vueltas sobre sí mismos con frecuencia. Esta propiedad puede ser crítica para la colonización de los insectos vectores [81] o los vertebrados [82]. El movimiento tipo látigo de estos organelos promueve la migración a través de espacios intersticiales constreñidos en los tejidos del hospedero mamífero al permitir la motilidad direccional, y colaborar en la deformación del cuerpo celular del parásito, para penetrar a través de aberturas que son más pequeñas que el diámetro máximo del cuerpo del parásito [83].

La función de los flagelos en infecciones en flebotomos y hospederos vertebrados por *Leishmania*, se ha explorado exhaustivamente. Por ejemplo, la proteína-G LdARL-3A, un homólogo del gen humano ARL-3 (factor de ribosilación de ADP que funciona como una GTPasa) se aisló de *L. (L.) donovani*, quien la expresa en los flagelo-

los de las formas promastigotes. Los parásitos que presentan una expresión elevada de LdARL-3A silvestre, alcanzan altas densidades celulares en cultivo, aunque secretan menor cantidad de fosfatasa ácida al medio extracelular, lo que sugiere que son menos infectivos. La sobreexpresión de una mutación Q70L (glutamina-leucina) constitutivamente activa de LdARL-3A en promastigotes de *Leishmania (L.) amazonensis* se traduce en parásitos con flagelos cortos [84]. Estos promastigotes «aflagelados» infectan macrófagos murinos derivados de la médula ósea con una cinética equivalente a los parásitos tipo silvestre, resultado que sugiere que los flagelos largos no se requieren para invadir la célula hospedera; sin embargo, la colonización de las moscas de arena de *Lu. longipalpis* no parece tan robusta; los mutantes aflagelados desaparecen del intestino medio después de la expulsión de la sangre, consistente con un rol del flagelo en los procesos de adhesión y motilidad flagelar para la infección exitosa del insecto vector [85].

Otro estudio aisló de un paciente un mutante «disflagelar» (sin flagelo) de *L. (V.) braziliensis* [86] de naturaleza genética desconocida que expresaba motilidad deteriorada. En micrografías electrónicas de barrido, estos parásitos exhibieron una pequeña protuberancia de material desorganizado en lugar del flagelo. Este mutante infectó macrófagos derivados de la médula ósea de ratones BALB/c o C57BL/6 con la misma eficacia que una cepa de referencia de *L. (V.) braziliensis* y colonizó el insecto vector *Lu. longipalpis* igual que la cepa de referencia, datos que sugieren que no se requieren flagelos normales para la infectividad de los parásitos en mamíferos o la mosca de arena.

Como mencionamos, los flagelos están asociados a la motilidad del organismo. Esto no descarta que los mismos pueden mediar interacciones entre los parásitos entre sí utilizando mecanismos potencialmente diferentes y para funciones diversas. Un ejemplo de ello, es el intercambio genético que ocurre entre parásitos de *T. brucei* mediante recombinación sexual; este evento transcurre dentro de la glándula salival de la mosca tse-tse [70]. Existen evidencias que indican que *Leishmania* spp. también experimenta intercambio genético en el insecto vector, la mosca de la arena; sin embargo, los parásitos apareados no se han observado directamente [87]. Debido a ello, el papel de los flagelos en la formación de híbridos genéticos de *Leishmania* es aún incipiente y la comunicación entre las células es un tema poco explorado en la investigación en *Leishmania*.

Además de esta interacción observada entre células haploides, los flagelos de Trypanosomatidae también están involucrados en el intercambio de proteínas no sexuales. Este intercambio de proteínas no forma parte de la reproducción sexual, ya que no intercambian material genético, y adicionalmente los parásitos al desacoplarse reanudan su crecimiento como células individuales, y la proteína transferida se pierde eventualmente debido al natural recambio de proteínas. Se desconoce el mecanismo molecular de esta interacción flagelar, las microscopías electrónicas y de fluorescencia

de alta resolución muestran fusión flagelar cuya función y mecanismo fundamental está aún por describirse [71].

## 2.2.2 Actividad sensorial de los flagelos

Los cilios primarios de los organismos multicelulares son organelos sensoriales que presentan receptores en su membrana, los cuales median la transducción de señales extracelulares al interior de la célula [88]. Los flagelos móviles, como los descritos en los parásitos Trypanosomatideos, están relacionados estructuralmente con los cilios primarios y también son capaces de detectar cambios en el ambiente [89].

Durante el ciclo de vida de los Trypanosomatideos que como hemos visto se caracteriza por su crecimiento y transformación en una amplia variedad de condiciones, los parásitos requieren de elementos metabólicos que no pueden sintetizar, por lo que necesitan modificar la absorción de nutrientes y la funcionalidad de las vías metabólicas en respuesta a su disponibilidad. De hecho, estos parásitos pueden regular la expresión de ARNm y proteínas al detectar cambios en el medioambiente, tales como alteraciones en los niveles de nutrientes como glucosa, purinas, hierro y aminoácidos [71]. En la mayoría de los casos, se desconoce cómo detecta el parásito el cambio en los nutrientes, pero ejemplos recientes sugieren que los transportadores localizados en los flagelos podrían estar actuando como sensores para monitorear los niveles extracelulares de los mismos. El papel sensorial para algunos transportadores es un concepto que se ha establecido en algunos eucariotas, y la función dual de los transportadores-receptores ha permitido que se les denomine «transceptores» [90-92], cuya funcionalidad está cada día más consolidada.

Por ejemplo, los parásitos *L. (L.) mexicana* están expuestos a niveles cambiantes de azúcares a medida que migran a través del sistema digestivo de la mosca de la arena. Un transportador de glucosa (GT1), se localiza selectivamente en la membrana del flagelo; y la expresión de GT1 aumenta en respuesta a la reducción de glucosa extracelular. El rol de GT1 en la detección de glucosa está respaldado por la observación de que los promastigotes de un mutante nulo  $\Delta gt1$  no logran la transición de fase logarítmica a fase estacionaria de crecimiento cuando la glucosa se agota en el medio de crecimiento; el mutante sufre una catastrófica pérdida de viabilidad, lo que sugiere que la permeasa GT1 podría estar actuando como un sensor de glucosa cuya actividad es necesaria para promover esta fase transición [93-96].

La arginina, un aminoácido esencial en *Leishmania*, y en *L. (L.) donovani* es internalizada por un transportador de arginina de alta afinidad (AAP3) que se encuentra en la membrana flagelar, así como en el glicosoma. Cuando los promastigotes de *L. (L.) donovani* están ávidos de arginina, aumenta la expresión de la proteína AAP3 y la del ARNm que codifica varios otros transportadores; esta respuesta requiere la activación por la proteína quinasa mitógeno (MAP) MAPK2. Los parásitos sufren cambios en la fosforilación de AAP3 y unas 100 proteínas más como respuesta a la

deprivación de arginina; esto sugiere una respuesta celular coordinada a la inanición, la cual está mediada por los mismos aminoácidos. Los parásitos también aumentan la fosforilación de AAP3 al entrar en los macrófagos y transformarse en amastigotes; esta respuesta les debe permitir competir con el hospedero mamífero, por la arginina intracelular. Sin embargo, las evidencias sugieren que el transporte de arginina *per se* no es la señal principal para detección de los niveles de arginina, y la permeasa probablemente tiene funciones separadas de transporte y sensorial [97-100].

Otro ejemplo de participación de proteínas flagelares en la respuesta a cambios en el entorno es la regulación osmótica mediada por el transporte de pequeños sustratos metaloides neutros y trivalentes a través del canal de acuagliceroporina AQP1 [101]. La AQP1 se localiza en la membrana flagelar y en el bolsillo flagelar de promastigotes y, probablemente, en el flagelo acortado de los amastigotes, ubicado dentro del bolsillo flagelar. AQP1 es permeable al agua, glicerol, metil glioxal y otros solutos no iónicos y en *Leishmania (L.) major*, sobreexpresión de AQP1 confiere sensibilidad a iones Sb(III) y As(III) [102].

Los promastigotes de *Leishmania* migran contra un gradiente osmótico, y la taxis puede ser importante durante su desarrollo en el insecto vector [103]. La osmotaxis en los promastigotes de *L. (L.) donovani* contra niveles más altos de glucosa es más rápido en parásitos que presentan una expresión aumentada de AQP1, pero no en parásitos que expresan canales mutados no funcionales; esto sugiere el rol de AQP1 en la detección y respuesta a gradientes osmóticos; la localización flagelar de AQP1 puede resultar confusa en cuanto a su rol en esta función. Lo que queda claro es el rol dual que estos transportadores transmembrana flagelares, los cuales simultáneamente parecen estar involucrados en la detección de cambios en el entorno.

Un ejemplo final de proteínas de membrana flagelar probablemente involucradas en la señalización son las enzimas adenilato ciclasa (AC) de *T. brucei* que afectan la motilidad del parásito. No está claro cómo se activan estas AC; sus grandes dominios extracelulares sugieren que pueden unirse a algún ligando extracelular que induce la actividad AC en el flagelo [71].

En resumen, la superficie flagelar sirve como organelo sensorial especializado que media la comunicación entre el entorno externo y el interior del parásito, conclusión que concuerda con la observación de que los cilios móviles y los cilios más pequeños, como el cilio primario de las células de mamíferos, pueden mostrar funciones sensoriales [89].



---

### 3. Señalización y comportamiento fisiológico



---

#### 3.1 Evolución de la señalización en *Leishmania*

En comparación con las formas de vida multicelulares, los organismos unicelulares expresan un número limitado de genes y proteínas. Sin embargo, ambos tipos de formas de vida procesan las señales circundantes y las convierten en un comportamiento fisiológicamente significativo.

Adicionalmente, las redes de transducción de señales, por sus características dinámicas, están constantemente bajo presión y selección, tanto en organismos unicelulares como en aquellos multicelulares. Finalmente, un sistema fiable de transducción de señales necesita ser específico y contar con sistemas de amplificación, incluso a nivel unicelular, aunque los mecanismos de señalización puedan no ser tan complejos como en organismos multicelulares. Debido a ello es necesario un procesamiento correcto de los estímulos mediante redes sofisticadas [71,104] y con mecanismos precisos para amplificar las señales que llegan a los transductores (retroalimentación positiva, o unión cooperativa de señalización intracelular moléculas a receptores, o interacciones de moléculas receptoras) [105,106]. Es decir, que incluso para eucariotas primitivos, i.e., los Trypanosomatídeos, un factor decisivo en la evolución incluye la amplificación exitosa de la señal y la comunicación intercelular eficaz para garantizar la supervivencia.

Este grupo de organismos, los Trypanosomatídeos, es extremadamente diverso y flexible a las condiciones ambientales, y se consideran un linaje evolutivo divergente, que no conforma un modelo clásico de eucariotas [107]. Esto incluye también los sistemas de transducción de señales. Sin embargo, similar a lo que ocurre en otros orga-

nismos, la detección de estímulos externos se realiza mediante la interacción dinámica entre receptores de la superficie celular y ligandos extracelulares [108].

De hecho, el concepto receptor-ligando es un dúo antiguo que ejemplifica cómo en biología, cuando una serie de pasos que interactúan causalmente y producen uno o más efectos funciona con éxito, se usa repetidamente, ya sea de forma original o modificada, pero en principio, siempre el mismo. Recientes avances en la comprensión de esta relación incluyen el uso de modelos computacionales que simulan de manera realista el proceso de unión entre ligandos y receptores, en las membranas y superficies celulares, modelando el receptor y sitios de unión con un sistema de ligandos en el contexto de una estructura rígida. De esta manera, ha sido posible probar la unión de ligandos y la afinidad de sus sitios de unión [108].

La evolución incorpora complejidad a este concepto a través de un creciente número de procesos que deben ser controlados y que trabajan de forma coordinada. La evolución del par receptor-ligando está más allá del alcance de esta contribución, por lo cual invitamos a los lectores a revisar la publicación de Nair *et al.*, 2019 [106], para una breve reseña del tema.

La diversidad celular y morfológica surge de la función de vías conservadas; sin embargo, la especificidad de la ruta requiere características estructurales, bioquímicas y biofísicas del tipo de célula, así como una profunda diafonía (*crosstalk* = diálogo) entre varias vías de señalización [109]. En otras palabras, la especificidad debe haber evolucionado en la estructura de ambos, ligando y receptor en forma continua [110], y probablemente, en paralelo surgieron receptores desprovistos de ligandos; la interacción receptor-ligando se produjo más tarde en la evolución [111], y no necesariamente de manera interactiva [112]. Además, el arribo de las señales ambientales a las superficies celulares dispara sistemas de señalización que comparten mensajeros intracelulares desde hace millones de años. Esto sugiere que las variaciones en la magnitud y ubicación espacio-temporal de estos mensajeros, sus receptores y efectores, introdujeron el concepto de diversidad [113], tan fundamental en biología como en evolución. Esto también significa que la evolución del concepto par receptor-ligando fomentó el desarrollo concomitante de procesos de transmisión de información. Como consecuencia, surgieron elementos interactuantes, en múltiples vías, haciendo más intrincado el sistema y enriqueciendo la complejidad potencial de la comunicación. El alcance de este proceso es fundamental, no solo para la comprensión de la patología de la enfermedad, sino además para el diseño exitoso de medicamentos selectivos contra el parásito.

### 3.2 Mecanismos de señalización acoplados a proteínas G

Mencionamos que al ocurrir cambios en el medioambiente [mecánico (mecano-transducción), eléctrico (electrotransducción), o químico (quimiotransducción), la

más común)], las células responden con respuestas fisiológicas necesarias en la preservación de la homeostasis celular.

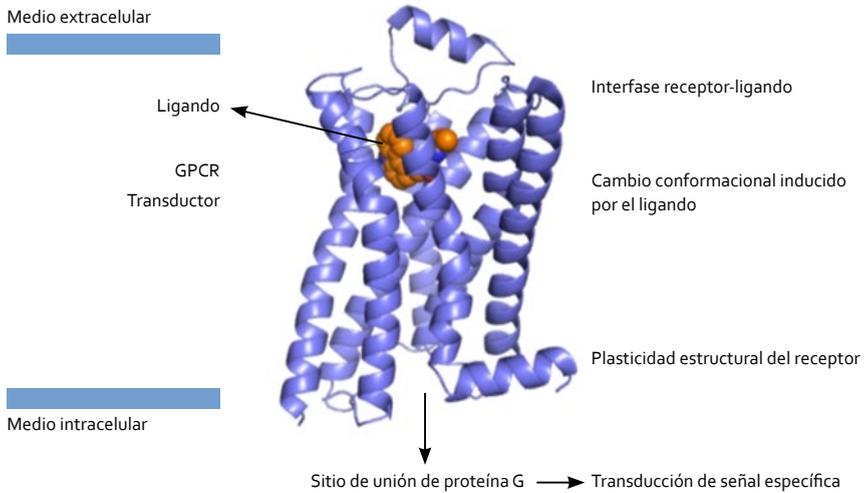
Ante estos cambios, los receptores celulares transducen las señales extracelulares hacia redes celulares que activan la reprogramación de procesos bioquímicos, genéticos y estructurales a través de sistemas que amplifican la señalización y terminan en la respuesta fisiológica requerida. Por lo tanto, la unión del ligando (la señal) a su receptor: (i) promueve cambios en la conformación del receptor, (ii) activa reacciones bien controladas, a través de la coordinación y el trabajo de intermediarios de señalización (segundos mensajeros), y (iii) transduce el mensaje de los receptores a los sistemas efectores para producir una respuesta celular [114].

La transducción de señales no implica una cascada de activación secuencial lineal de moléculas de señalización. Por el contrario, representa la función de una «orquesta» en la que los nodos de señalización intracelular (red) establecen el mecanismo de comunicación.

De hecho, un estímulo desencadena la señalización aguas abajo, pero, como ocurre usualmente, los receptores unidos a sus ligandos reclutan conectores y activan una variedad de intermediarios de señalización que transmiten la señal durante diversos segundos mensajeros adicionales. La diafonía entre ellos integra la información y la transmite al citosol o moléculas diana del núcleo para desencadenar funciones efectoras.

Las principales categorías de receptores incluyen intracelulares y de superficie celular; estos últimos abarcan la membrana plasmática y se caracterizan por poseer un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio citoplasmático. Otras clasificaciones incluyen los receptores ionotrópicos, receptores de tirosina, quinasas y receptores acoplados a proteína G (GPCR). En este trabajo nos concentramos en estos últimos.

Los GPCR (ver **Figura 5**) son proteínas transmembrana unidas a moléculas de señalización intracelular, como son las proteínas de unión a trifosfato de guanosa (GTP) [115]. Estas proteínas señalizadoras se definen como complejos multiproteicos que regulan de forma estrictamente controlada la localización, duración y especificidad de la señal. Por ejemplo, cambios mínimos en la concentración del ligando producen una respuesta, por ejemplo, quimiotáctica, que se amplifica incluso con cambios pequeños en la ocupación general del receptor, como se describió inicialmente en bacterias [116,117]. Alternativamente, pueden ocurrir ensamblajes de receptores, i.e., complejos formados por múltiples receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de células T de mamíferos que se asocian a antígenos peptídicos en la superficie de una célula presentadora de antígeno vecina [118]. Estos ensamblajes de receptores de alto orden implican comunicación entre receptores, y se traducen en



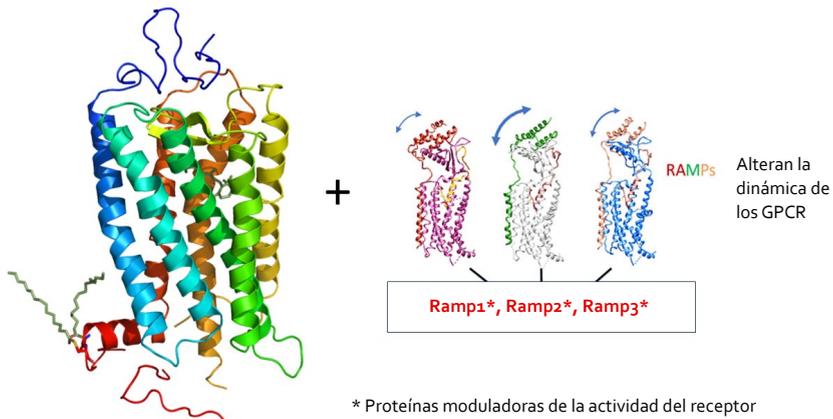
**Figura 5.** Esquema simplificado de la estructura de un GPCR. Modificado de <https://www.uab.cat/web/news-detail/computational-methods-help-finding-drug-binding-sites-on-cellular-receptors-1345680342044.html?noticiaid=1345841482523>.

consecuencias funcionales que aumentan la capacidad de procesamiento de información del sistema.

La historia evolutiva de los complejos multiproteicos de GPCR, incluyendo los receptores, los sistemas de transducción y la señalización mediante moduladores, está bien descrita en el trabajo, realizado por de Mendoza *et al.* 2014 [119]. Sus resultados sugieren que los principales elementos que componen el sistema GPCR están presentes en los organismos vivos desde tiempos remotos (incluso antes de la aparición del llamado ancestro común de los eucariotas, LECA) y se caracterizan por una evolución independiente, modular y conservada. Los resultados sugieren además que LECA expresó un repertorio complejo de GPCR y que la expansión del sistema de señalización de GPCR ocurrió inicialmente en especies unicelulares o colonias cuyos estilos de vida –similar a los de los multicelulares– requieren complejas maquinarias de señalización. Aunado a esto, sugieren que la explosión de la diversidad de los receptores, se originó [120] concomitantemente con la transición a la pluricelularidad, y de forma paralela. Es fundamental hacer notar que dado el conjunto actual de estructuras cristalinas de GPCR conocidas se constata la modularidad divergente entre las regiones extracelular (unión de ligando) e intracelular (señalización) del receptor [121].

Más allá de la diversidad de la arquitectura molecular de los GPCR y los complejos multiproteicos asociados, existen proteínas que interactúan con algunos de ellos, las denominadas proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMP) (ver **Figura 6**) que modulan la función de los GPCR y son importantes para nuestra discusión actual. Las RAMP son proteínas únicas que, al unirse a los GPCR, cambian su forma y

actúan como interruptores farmacológicos, o chaperonas, que regulan la señalización y el tráfico de forma dependiente del receptor [122]. En los mamíferos, las RAMP constituyen una pequeña familia de tres proteínas capaces de introducir diversidad funcional al interactuar con los GPCR [123].



**Figura 6.** Asociación del GPCR con las RAMP. Modificado de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acspsci.9b00080>

Inicialmente, se identificaron como chaperonas que mejoraban la expresión en la superficie celular del receptor similar, a la calcitonina (CLR, históricamente conocido como CRLR). Las interacciones de RAMP con GPCR proporcionan una forma estratégica y eficiente de controlar la función de GPCR que puede brindar oportunidades para el desarrollo de fármacos.

Como resumieron Hay *et al.* 2016 [124], se han descrito cuatro funciones principales para las RAMP: (i) permitir el tráfico de algunos GPCR hacia la superficie celular; (ii) alterar la farmacología de los GPCR, cambiando su selectividad al ligando; (iii) influir en el acoplamiento a las vías de señalización de los GPCR, y (iv) alterar el tráfico de algunos GPCR desde la superficie celular, mediante el uso de diferentes RAMP que controlan el destino del receptor a través de vías de reciclaje o degradación.

Estructuralmente, las RAMP de vertebrados comprenden un solo dominio transmembrana, un N-terminal extracelular, un dominio de  $\approx 90$ –100 aminoácidos (RAMP2 tiene la secuencia más larga) y un dominio C-terminal intracelular corto de  $\approx 9$  aminoácidos. Los sitios de glicosilación potenciales parecen fundamentales para la función del receptor mediada por RAMP, ya que en general las RAMP1 de mamíferos parece no estar glicosilado, aunque las RAMP2 y RAMP3 tienen múltiples sitios de glicosilación [125]. La **Figura 6** ilustra un diagrama esquemático de la interacción de RAMP con GPCR de eucariotas pluricelulares (mamíferos).

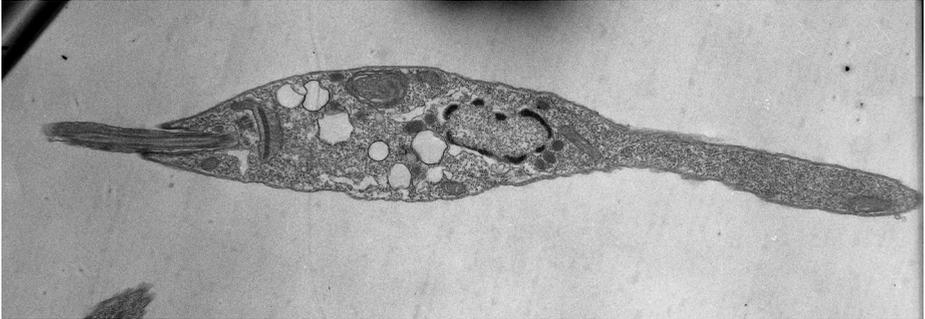
Las interacciones de las RAMP de vertebrados con la clase B-GPCR (CRLR) son las más estudiadas hasta ahora [123]. Las RAMP son necesarias para guiar al receptor CRLR a la superficie celular, donde los complejos RAMP/CRLR actúan como receptores de hormonas peptídicas como son el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) o la adrenomedulina (AM), dependiendo de la coexpresión de RAMP [90]. Las RAMP parecen interactuar con otros GPCR, aunque como se mencionó, las propiedades de las RAMP solo se han estudiado ampliamente para CRLR o receptores de calcitonina (CTR).

### 3.3 Sistemas de transducción, mensajeros intracelulares

Como bien describe Nair *et al.* 2019 [106] y mencionamos anteriormente, al unirse al ligando, el receptor de la superficie celular experimenta un cambio conformacional que culmina en la activación de transductores citoplasmáticos a través de procesos específicos que caracterizan cada tipo de receptor. Para los GPCR, los cambios conformacionales promovidos por la unión del ligando activan proteínas G heterotriméricas asociadas. Esto está mediado por la unión de GTP y la posterior disociación en sus subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ , activadoras de diversos segundos mensajeros, canales, quinasas, fosfolipasa e isoformas de adenilato ciclasa) [106].

Los GPCR también pueden funcionar independientemente de las proteínas G a través de las quinasas receptoras acopladas a proteína G (GRK), la  $\beta$ -arrestina y las enzimas tirosina quinasas no receptoras (Srcs). Además, pueden activar pequeñas GTPasas monoméricas, a saber, Ras, como la proteína homóloga a Ras (Rho), proteínas de unión asociadas a Ras (Rab), factor de ribosilación de ADP (Arf) y proteínas nucleares relacionadas con Ras (Ran). Estas pequeñas GTPasas actúan como transductores centrales para diversas vías de señalización. Finalmente, los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) pueden activar la GTPasa a través del reemplazo de guanosina difosfato (GDP)/GTP [106].

Las GTPasas son específicas, desencadenan secuencialmente la activación de determinados efectores aguas abajo para generar diversos segundos mensajeros o pequeñas moléculas «dedicadas» (AMP, cGMP, IP3, diacilglicerol, calcio, entre otros), cuyos niveles intracelulares son críticos y deben ser estrictamente regulados para garantizar la homeostasis celular [106].



## 4. Tipos de señalización presentes en *Leishmania*

Comprender las respuestas conductuales, sensoriales y efectoras de las células a las señales ambientales, y cómo interactúan para preservar la homeostasis y el rendimiento celular, son temas fascinantes que pueden analizarse mediante estudios de fisiología celular, molecular y genómica. Lo mismo ocurre con la comprensión de la organización y expresión de genes que influyen en la señalización celular, así como con las relaciones moleculares que existen entre los intermediarios de señalización [126], puesto que *Leishmania* se enfrenta a gradientes de diversas moléculas en el intestino del vector (metabolitos) y en la piel (señales diversas) antes de ser fagocitado por su célula hospedera y debe responder a estos cambios con conductas que permitan su supervivencia.

Por otro lado, la integración experimental y computacional de datos es un medio fundamental para desarrollar modelos de red de la señalización. Su comprensión puede ser útil en la comprensión del desarrollo de la señalización intercelular y entre organelos (compartimentada) [127,128]. Veamos un poco qué se conoce en *Leishmania*.

### 4.1 Nutrientes (glucosa, aminoácidos)

Los promastigotes que viven en el intestino de los flebótomos hembra son largos y delgados (14–20  $\mu\text{m}$  de largo y 2–4  $\mu\text{m}$  de ancho). Su crecimiento y diferenciación en la mosca de la arena es un proceso dinámico ligado a variaciones, entre otros, en los niveles circundantes de aminoácidos (AA). La quimiotaxis guía al parásito a través de estos estadios [63,106,129].

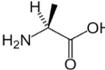
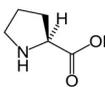
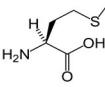
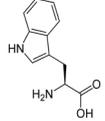
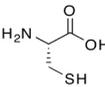
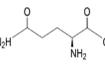
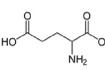
Dada la importancia de los fenómenos «sensoriales» que inducen quimiotaxis en la supervivencia, diferenciación e interacción exitosa del parásito con la célula hospedera, inicialmente en el Laboratorio de Fisiología Molecular en el Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UCV, nos avocamos a analizar qué moléculas podrían estar involucradas en la quimiotaxis y respuestas migratorias de *Leishmania*. Así, ensayamos elementos que constituyen las principales fuentes de energía para el parásito (carbohidratos, aminoácidos) cruciales para su diferenciación, y motilidad en el vector. Estudiamos el efecto quimiotáctico *in vitro* de ligeras variaciones en la concentración de AA en los comportamientos migratorios de promastigotes de *Leishmania* spp. Además, dado que los parásitos transitan entre ambientes donde pueden ocurrir cambios agudos en la osmolaridad, el estudio evaluó modificaciones en las características morfológicas (área celular y longitud flagelar) producidos en promastigotes expuestos a cambios agudos en osmolaridad y concentraciones quimiotácticas de los AA probados [129].

Los resultados sugieren que las propiedades químicas de diversos AA alifáticos, monocarboxílicos, dicarboxílicos, heterocíclicos y que contienen azufre no garantizan la respuesta táctica de *Leishmania* (quimiorrepelente o quimioatrayente) (ver **Tabla 2**) e indica que la quimiotaxis en *Leishmania* es un fenómeno complejo modulado por factores biológicos, físicos y químicos, y que los AA, amén de ser metabolitos podrían tener roles sensoriales, útiles para que *Leishmania* enfrente los cambios constantes del ambiente en el intestino del vector [129].

Los AA constituyen bloques de construcción celular. Por ejemplo, los Trypanosomatideos mantienen reservorios de prolina y alanina como fuentes alternativas de carbono. La hemolinfa de los insectos vectores es excepcionalmente rica en estos dos AA [130]. Sus niveles en el intestino podrían modular el comportamiento fisiológico del parásito. La alanina influye en los cambios de volumen igual que la prolina. El transportador de AA neutros parece el único proveedor para la reserva intracelular de prolina y alanina en *L. (L.) donovani* [130,131]; este transportador controla además el transporte y homeostasis de los AA glutamato y arginina, aunque no son sustratos directos para él. Resultados de nuestro laboratorio sugieren que L-alanina, pero no L-prolina, estimulan quimiorrepelencia, y que este comportamiento, orienta la migración de los promastigotes hacia regiones anteriores del intestino del insecto vector, acercándolo a la proboscis, aumentando la probabilidad de ser transmitido al hospedero vertebrado [129].

Estos cambios pueden adicionalmente ser cruciales en el proceso de diferenciación de parásitos de no infecciosos (procíclicos) a infecciosos (metacíclicos) y en su migración desde el tracto gastrointestinal anterior a porciones en la válvula cardioesofágica. De hecho, la alcalinización, la modulación de niveles de proteasas, y los cambios en la

**Tabla 2.** Propiedades físico-químicas de los aminoácidos ensayados [175], efecto sobre la quimiotaxis. Modificado de [129\*].

Amino ácido Abr/Símb	Estructura	Grupo	MW (g/mol)	pK1 -COOH	pK2 -NH <sub>2</sub>	pK3 (-R)	pI (pH)	Índice de hidropatía	Quimio-repelencia	Quimio-atracción
Alanina (Ala, A)		No polar alifático	89,09	2,34	9,69	----	6,10	1,8	10 <sup>-7</sup> M	----
Prolina (Pro, P)		No polar alifático	115,13	1,99	10,96	----	6,30	1,6	----	----
Metionina (Met, M)		No polar con azufre	149,21	2,28	9,21	----	5,74	1,9	10 <sup>-7</sup> M, 10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-12</sup> M
Triptofano (Trp, W)		No polar aromático	204,22	2,38	9,39	----	5,88	-0,9	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-12</sup> M
Cisteína (Cys, C)		Polar, no cargado, con azufre	121,16	1,71	10,78	8,33	5,02	2,5	----	----
Glutamina (Gln, Q)		Polar, no cargado	146,15	2,17	9,13	---	5,65	-3,5	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-6</sup> M
Ácido glutámico (Glu, E)		Polar, negativo	147,13	2,19	9,67	4,25	3,08	-3,5	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-6</sup> M

\*Como autor de este artículo no se requiere permiso para este uso.

presión osmótica, ocurren en el intestino de la mosca de la arena hembra [61,62,132]. Similar a lo descrito previamente en *L. (L.) major* [133], no hubo cambios determinantes en la morfología y probablemente en el volumen de *L. (V.) braziliensis* o *L. (L.) amazonensis* por concentraciones efectivas de los AA probados en condiciones hipo, iso e hiperosmóticas. Esto sugiere que estos parásitos mantienen una estructura celular estable frente a cambios bruscos de osmolaridad, o, alternativamente, superan eficazmente los desafíos osmóticos mediante mecanismos celulares que potencialmente incluyen la síntesis de L-alanina y el consiguiente aumento de la osmolaridad intracelular que colabora para evitar los cambios en la morfología [134]. Las sustancias tácticas podrían provenir de las piezas bucales del insecto (saliva, alimentos ingeridos, etc.), producidas en el intestino medio (enzimas digestivas, productos de digestión, p. ej. AA), o ser factores liberados por el parásito [129-131].

Durante el ciclo de vida de *Leishmania*, el flagelo cambia su longitud y posición, presumiblemente como respuesta a las señales ambientales [47]. El flagelo es esencial para la motilidad y la migración a la porción anterior del intestino medio en el vector, y su función es crítica para la transmisión eficiente al hospedero [103]. Ergo, concentraciones de AA que inducen acortamiento del flagelo podrían comprometer la supervivencia del parásito. El flagelo promueve la adhesión al epitelio gastrointestinal del insecto y es fundamental durante la migración a la proboscis, en la supervivencia en el torrente sanguíneo de los mamíferos y en la interacción del parásito con su célula hospedera [47,135-137]. La regulación de la longitud del flagelo parece un simple proceso unidimensional, siendo la punta el sitio crucial para el montaje y desmontaje de los elementos flagelares estructurales.

Por otra parte, la longitud del flagelo de *L. (V.) braziliensis*, pero no de *L. (L.) amazonensis*, disminuyó significativamente al incubar los parásitos en condiciones hiperosmóticas. Adicionalmente, el ácido L-glutámico, a concentraciones quimiotácticas, disminuye el largo del flagelo cuando se incuba en condiciones hiposmóticas a diferencia de L-alanina y L-metionina que producen una disminución de la longitud del flagelo a concentraciones quimiotácticas al ensayarlos en condiciones hipo e hiperosmóticas; L-triptófano no acorta la longitud del flagelo. [129,137].

Finalmente, aunque no está claro cómo los diferentes AA establecen gradientes en el intestino del parásito, deberían existir sistemas especiales para su percepción e incorporación al parásito. Por ejemplo, los receptores de membrana distribuidos a lo largo del flagelo, incluyendo el bolsillo flagelar, podrían constituir moléculas de detección [47] especializadas para detectar cambios en gradientes de moléculas clave, incluyendo los AA [138].

La expresión de receptores con diferentes afinidades podría explicar la respuesta quimiotáctica de parásitos a diferentes AA, activados a niveles de concentración ligeramente diferentes, modulando así la diversidad de respuesta quimiotáctica [139], por el concurso de mecanismos intracelulares aún desconocidos (efectos sobre el citoesqueleto o procesos metabólicos). Incluso, podría ocurrir que el mismo receptor podría ser capaz de unir un gran número de compuestos relacionados [130]. Alternativamente, los receptores pueden ser similares, pero sus afinidades, interacciones con los ligandos (AA), niveles de saturación, constantes de disociación, etc. sean diferentes, haciendo que la señalización sea única, incluso a este bajo nivel.

Los parásitos, al percibir el gradiente químico a través de los receptores, se dirigen hacia el gradiente quimioatrayente y lejos de sustancias tóxicas repelentes. El movimiento del parásito bajo estrés quimiotáctico tiene dos componentes: el primero, nadar en círculos de tres a cinco veces seguidas; el segundo, recorrer un breve trayecto direccional, y repetir todo el ciclo. En contraste, un movimiento errático, no direccio-

nal, ocurre bajo gradiente químico cero. A concentraciones más altas del compuesto quimioatrayente la direccionalidad del movimiento y la fuerza del movimiento está más definida y es mayor [140]. Los gradientes usados en nuestro laboratorio fueron menores a los utilizados por Pozzo et al. 2009 [140] lo cual sugiere la presencia de mecanismos alternativos en estas condiciones. De hecho, la respuesta diferencial a los diferentes AA puede relacionarse con la eficiencia de incorporación o uso para el metabolismo energético: AA transportados más eficientemente o mejor metabolizados para generar ATP podría ser más quimiotáctico.

Nuestros resultados aportan datos fundamentales para la comprensión de los mecanismos sensoriales involucrados en el comportamiento del parásito en su trayectoria hacia una infección exitosa y nos permiten sugerir que *Leishmania* discrimina entre mínimas diferencias en la concentración de moléculas pequeñas y estructuralmente estrechamente relacionadas entre sí y apoyan la idea de que además de sus efectos metabólicos, los AA juegan un papel clave vinculado a los mecanismos sensoriales que podrían determinar el comportamiento del parásito. Una conclusión adicional fue que estas respuestas podrían involucrar sistemas de transducción de señales y tipos de receptores aún no descritos en estos parásitos.

## 4.2 Sistemas acoplados a nucleótidos cíclicos

En Trypanosomatidae, se han descrito mecanismos únicos de señalización mediados por nucleótidos cíclicos. Estos parecen esenciales para la proliferación y diferenciación de estos organismos. Por ejemplo, desde la década de los 90, se han detectado elementos funcionales específicos de las proteínas G en *T. (brucei) brucei* [141], así como en *T. cruzi* [142]; sin embargo, las proteínas G canónicas parecen ausentes, al menos en el genoma. El análisis bioinformático sugiere la existencia de elementos que codifican receptores acoplados a proteína G (GPCR) con escasas pruebas funcionales; las pequeñas GTPasas o sus efectoras secundarias, con diferencias estructurales con los ortólogos del hospedero, parecen constituir el principal medio molecular de expresión de los sistemas de nucleótidos cíclicos [143].

A pesar de la aparente ausencia de subunidades de proteínas G canónicas con la presencia de componentes clave de estas vías de señalización, la investigación en señalización mediada por GPCR se ha visto estimulada, como en muchos otros casos, por la secuenciación del genoma de los Trypanosomatideos. Incluso, algunas bases de datos resaltan la existencia de proteínas con «motivos serpentinos» que podrían tener funciones similares a GPCR.

En 2019, el grupo de Keith Matthews identificó una molécula, parte de la familia de proteínas GPR89, asociadas en mamíferos a la actividad de canales aniónicos voltajes dependientes. La proteína en el parásito *T. (b.) brucei* está ubicada en su superficie y regula la diferenciación celular [144]. La proteína TbGPR89, transporta oligopépti-

dos y está presente en los tripanosomas de «forma delgada» presente en el torrente sanguíneo; al expresarse ectópicamente, TbGPR89 promueve la formación de parásitos *stumpy* (cortos y gruesos) en un proceso dependiente del factor inductor de diferenciación (SIF) a este estadio. Este sistema parece constituir un mecanismo de «señal» y «receptor» para la detección de la densidad de parásitos (*quorum sensing*) en la infección por tripanosoma [145] y su secuencial diferenciación celular a la forma *stumpy*. Los miembros de la familia GPR89 (GTG1 y GTG2) expresados en plantas se consideran GPCR huérfanos [146]. TbGPR89 constituye la primera demostración de la presencia de proteínas relacionadas con receptores acoplados a proteína G huérfanas en Trypanosomatidae.

El AMPc constituye un segundo mensajero importante y fundamental en Trypanosomatidae. El par molecular AMPc/AMP parece desempeñar un rol primordial en casos como la señalización de *quorum sensing* en *T. (b.) brucei*; por su parte, los niveles de expresión de las proteínas de respuesta a AMPc (CARP) se correlacionan con la sensibilidad a los inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) [58]. Más de 80 genes y pseudogenes codifican la enzima AC en el genoma del tripanosoma, su estructura por rayos X ha sido descifrada en *T. (b.) brucei* [147]. La AC de *T. (b.) brucei* pertenece a la clase tipo II de protozoos; con un dominio transmembrana, y un gran dominio extracelular variable para la supuesta unión al receptor; sus contrapartes en mamíferos presentan 12 dominios transmembrana.

La enzima de mamífero y de tripanosoma parecen compartir un mecanismo de acción con una región catalítica citosólica [49]. La dimerización de AC en *T. cruzi*, parece tener un rol esencial durante la metaciclologénesis, en la conversión de epimastigotes en el intestino medio del insecto, y luego en el intestino posterior, en tripomastigotes metacíclicos no proliferativos, infecciosos para los humanos. Más aún, *in vitro*, la metaciclologénesis inducida por estrés nutricional provoca un aumento en la producción y niveles de AMPc. Estos datos sugieren que la modulación por AMPc podría ser un requisito previo a lograr la diferenciación final a tripomastigotes metacíclicos y que la señalización por AC en Trypanosomatidae podría constituir una cascada compleja, en la cual las fosfodiesterasas expresadas están altamente conservadas, pero son casi insensibles a los inhibidores de mamíferos. Estos mecanismos están bellamente descritos por Kayser, 2019 y Tagoe *et al.*, 2015 y las referencias incluidas en estos trabajos [58, 143].

Las GTPasas pequeñas, la mayoría pertenecientes a la superfamilia Ras [147], también se expresan en Trypanosomatidae. Ellas actúan como interruptores moleculares y parecen fundamentales para el éxito de la infección en el hospedero en ausencia de proteínas G canónicas y GPCR putativos. El control de la expresión génica y la proliferación celular, el recubrimiento de vesículas, el transporte núcleo-citoplasmático y la regulación de la progresión del ciclo celular necesitan de la acción de la superfamilia

Ras. Ya mencionamos que los Trypanosomatideos también expresan proteínas Rab (proteínas relacionadas con Ras en el cerebro) que controlan el transporte intracelular, y vesicular y las Rho GTPasas que participan en la interacción patógeno-hospedero y controlan las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas [148].

Curiosamente, los estímulos iniciados en los parásitos pueden desencadenar la señalización mediada por GPCR en las células hospederas durante el proceso de invasión y egreso del parásito, tal y como Kayser 2019 [143] explica. Los resultados sugieren que el parásito modula el uso de la señalización disponible para decidir las vías y las moléculas a utilizar durante la invasión [149].

Sugieren además que, dependiendo de la isoforma de Ras usada, el resultado de una infección, por ejemplo, por *L. (L.) major* puede diferir debido a la capacidad del parásito para cambiar la señal.

En *T. cruzi*, una GTPasa relacionada con Ras unida a GTP, se localiza cerca del aparato flagelar [150]. Su función es necesaria para el crecimiento celular y su sobreexpresión bloquea la metacicloogénesis de *T. cruzi*. Además, la Rho GTPasa Rac1, es fundamental para una invasión independiente de la acción de la célula hospedera por amastigotes de *T. cruzi* [151].

En *Leishmania* hay una variedad de GTPasas con funciones en el tráfico intracelular, vías secretoras, endocitosis y patogenicidad. De hecho, se ha caracterizado un homólogo monomérico de GTPasa Rab1 en la vía secretora de *Leishmania* [152]. Por otro lado, el tráfico y secreción de gp63, el factor de virulencia de *Leishmania*, está regulado por la GTPasa Sar1 [153] y es esencial para la supervivencia del parásito. Curiosamente, las isoformas Rab5 de *Leishmania* regulan la endocitosis en fase fluida o mediada por receptor [154].

Estos ejemplos sugieren que: (i) aunque la información en Trypanosomatidae se relaciona principalmente con la presencia y función de pequeñas GTPasas, no se puede descartar la existencia de proteínas G canónicas o proteínas sucedáneas (con funciones similares), como podría deducirse de la existencia de una supuesta subunidad alfa de la proteína de unión a nucleótidos de guanina reportada en *L. (L.) donovani* (código UniProtKB P43151), además de tres proteínas que contienen el dominio gamma de la proteína G encontrada en *L. (L.) donovani* (cepa BPK282A1), *L. (L.) mexicana* (cepa MHOM/GT/2001/U1103) y *L. (L.) major* (códigos UniProtKB E9BTQ7, E9ASW2 y Q4Q1N4, respectivamente) [The UniProt Consortium. UniProt: la base de conocimiento universal de proteínas en 2021. Nucleic Acids Res. 49: D1 (2021)]; y (ii) que el parásito utiliza las vías canónicas de nucleótidos cíclicos expresadas en el hospedero para promover la patogenicidad. El siguiente capítulo se centrará en más evidencias de su presencia en *Leishmania*.

### 4.3 Sistemas GPCR

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son proteínas de la superficie celular esenciales para transmitir señales a través de la membrana. La arquitectura general de estas proteínas consiste en dominios heptahelicoidales transmembrana interconectados con bucles extra e intracelulares. Los GPCR son flexibles en su arquitectura molecular, incluyendo las proteínas RAMP comunes entre los eucariotas multicelulares, como moduladores que interactúan con los GPCR para modificar su función.

Nuestro objetivo ha sido explorar la función y los roles de los potenciales GPCR y sus moléculas asociadas (RAMP) en la detección de los cambios ambientales en *Leishmania*, subrayando cómo la forma en la que funcionan los GPCR en estos organismos podrían constituir un indicador del desarrollo de la función sensorial transducida por este tipo de receptor en estos parásitos, así como su papel en la evolución adaptativa. Las RAMP aún no se han definido en eucariotas unicelulares; su descripción en estos organismos puede ser crucial, ya que la intervención farmacológica de las vías de señalización y modulación de proteínas G –de estar presentes– potencialmente útiles para diseccionar la fisiología de patógenos eucariotas unicelulares y constituir dianas terapéuticas para el diseño de herramientas contra la enfermedad [155,156].

Para ahondar en los potenciales sistemas sensoriales de estos parásitos, y contribuir a la representación de los GPCR como un sistema de señalización fundamental en la fisiopatología de la leishmaniasis, evaluamos la migración de parásitos en un sistema controlado en presencia de neuropéptidos que son liberados en la piel lesionada por la picada del insecto vector. Estos neuropéptidos habían sido previamente utilizados en modelos *L. (L.) major*, macrófagos para analizar la función fagocitaria [66-69]. Ensayamos la actividad quimiotáctica de neuropéptidos sensoriales (sustancia P, SP; péptido relacionado con el gen de la calcitonina, CGRP; y adrenomedulina, (AM) y neuropéptidos autonómicos (neuropéptido Y, NPY, y péptido intestinal vasoactivo, VIP).

La **Tabla 3** resume el efecto quimiotáctico producido por neuropéptidos seleccionados sobre la migración de *L. (V.) braziliensis*. La tabla incluye el origen potencial de estos neuropéptidos en los mamíferos, así como la RAMP asociada que normalmente se encuentra en el sistema. Los datos presentados demuestran el efecto *in vitro* de neuropéptidos sensoriales [sustancia P, SP ( $10^{-8}$  M), quimioatrayente] y autonómicos [(péptido intestinal vasoactivo, VIP ( $10^{-10}$  M), y neuropéptido Y, (NPY) ( $10^{-9}$  M), quimiorrepelente] a niveles fisiológicos sobre la taxis de los parásitos, y adicionalmente, el efecto quimiorrepelente de las moléculas vasoactivas como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina [(CGRP) ( $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M)] y la adrenomedulina [(AM) ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M)] [65,155,156]. También demostramos, como se observa en la **Figura 7**, que los efectos quimiotácticos de VIP y NPY son alterados por los correspondientes an-

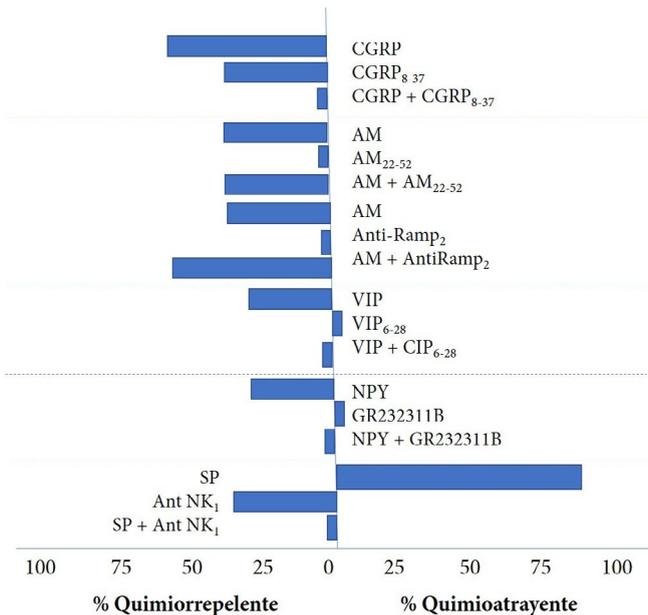
**Tabla 3.** Efecto in vitro de neuropéptidos en la taxis de *Leishmania*.

Neuropéptido	Tipo <sup>1</sup>	Quimiorrepelente <sup>2</sup>	Quimioatrayente <sup>3</sup>	Proteína accesoria asociada <sup>4</sup>	Ref.
CGRP	Sensorial	10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-8</sup> M		RAMP1	[59, 176]
Adrenomedulina	Sensorial	10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-5</sup> M		EAMP2, RAMP3	[59, 177]
VIP	Simpático	10 <sup>-10</sup> M		RAMP2	[177]
NPY	Simpático	10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-9</sup> M		¿?	
SP	Sensorial		10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-7</sup> M	¿?	

Tomado y modificado de Díaz et al. 2022 [155], artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia de Creative Commons (CC BY)

<sup>1</sup>Lugar donde se produce y secreta el neuropéptido, <sup>2,3</sup> Concentración de neuropéptido que ejerce un efecto significativo sobre *L. (V.) braziliensis*, <sup>4</sup> Proteína accesoria descrita en mamíferos.

tagonistas de sus receptores, así como el efecto de la SP es bloqueado por [D-Pro 2, D-Trp7,9]-Sustancia P (10<sup>-6</sup> M)], lo que sugiere que podría estar mediado por receptores transmembrana de neuroquinina-1.



**Figura 7.** Efecto de los neuropéptidos y sus antagonistas y anticuerpos sobre la quimiotaxis en *L. (V.) braziliensis*. Tomado y modificado de Díaz et al. 2022 [155], artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia de Creative Commons (CC BY).

El efecto quimiorrepelente de la molécula vasoactiva CGRP a concentraciones fisiológicas fue bloqueado específicamente por su correspondiente antagonista CGRP8-37; por el contrario, el efecto quimiorrepelente de AM no fue bloqueado por AM22-52, incluso a concentraciones 100 a 1000 veces superiores a las utilizadas para provocar el efecto quimiotáctico. Además, CGRP8-37 produce un efecto quimiorrepelente *per se*, fenómeno que no ocurre al usar AM22-52 solo. Estos resultados sugieren farmacológicamente, la presencia de receptores GPCR o un sistema de señalización similar a GPCR en *Leishmania*. El mismo pareciera ser heterólogo a los expresados en vertebrados [65, 156].

Como se mencionó, las vías de señalización de la proteína G canónica no se han definido a nivel genético en Trypanosomatidae. No obstante, se han predicho dos receptores extracelulares putativos con posible actividad del receptor GABA acoplado a proteína G en los genomas de *L. (L.) major* y *Leishmania (L.) tarentolae* (*Sauroleishmania tarentolae*) (códigos UniprotKB Q4QDF7 y A0A640KFI9, respectivamente).

Los resultados de nuestro laboratorio indican que los neuropéptidos modulan los pasos iniciales de la interacción hospedero-parásito e influyen en el desarrollo de la enfermedad al afectar la migración de los promastigotes. Es de hacer notar, que los experimentos realizados en los modelos BALB/c y C57BL/6 de ratones infectados, las concentraciones de neuropéptidos utilizadas son farmacológicas [66-69,150,157] mientras que en nuestros experimentos las concentraciones utilizadas están en el rango fisiológico lo cual resalta su importancia.

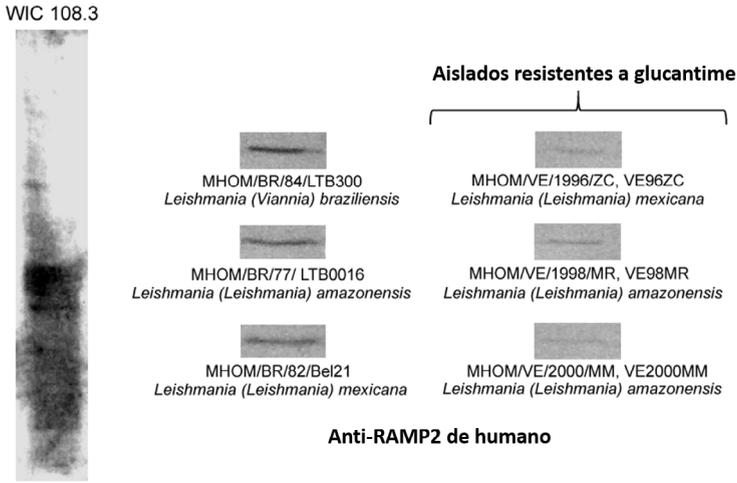
#### 4.4 Rol de las proteínas RAMP o RAMP-Like

En nuestros experimentos, la presencia de un péptido de 24 kDa antigénicamente relacionado (identificado con anticuerpos RAMP-2 humanos) asociado con RAMP o proteínas similares a RAMP se demostró mediante análisis de Western blot en homogeneizados de las cepas *L. (L.) amazonensis* (LTB0016), *L. (L.) mexicana* (Bel21) y *L. (V.) braziliensis* (LTB300) (ver **Figura 8**) [156].

El análisis por Western Blot también confirmó la expresión de esta banda en *Leishmania* [*L. (L.) mexicana* (VE96ZC) y *L. (L.) amazonensis* (VE98MR y VE2000MM)] respectivamente, aislados de pacientes con LCD activa con fracaso terapéutico contra Glucantime®. Estos datos confirman en muchas cepas y especies de *Leishmania* la presencia de epítopes que podrían ser reconocidos por anticuerpos específicos contra RAMP-2, lo que sugiere la presencia de proteínas relacionadas.

Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal WIC108.3 que reconoce al lipofosfoglicano (LPG) de todas las especies de *Leishmania* en sus diversos pesos moleculares y constata la identidad de promastigote los parásitos utilizados.

Para ahondar en estos resultados, enfrentamos la secuencia proteica de la isoforma humana RAMP-2 contra el proteoma predicho de *L. (V.) braziliensis* mediante DEL-



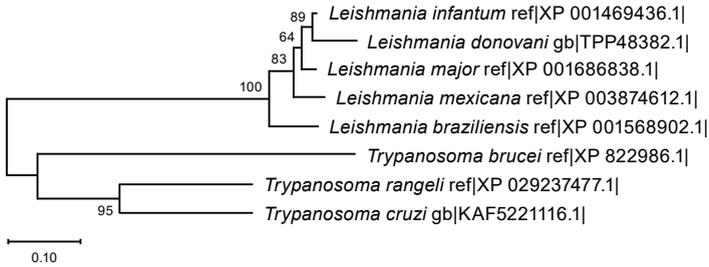
**Figura 8.** Western blot de homogenatos de especies de *Leishmania*, enfrentados a anticuerpos contra RAMP-2. Modificado de [156\*]. WIC108.3, un anticuerpo monoclonal que reconoce el lipofosfoglicano que recubre a *Leishmania* \*Como autor de este artículo no se requiere permiso.

TA-BLAST e identificamos un alineamiento de alta homología con la enzima folilpoliglutamato sintasa (FPGS), XP\_001568902, de *Leishmania*. Al realizar un enfoque similar utilizando la secuencia RAMP-3 humana detectamos una alineación de alta homología contra una proteína hipotética de *Leishmania* con una función aún desconocida, XP\_001566159.1. El valor de estas alineaciones se confirmó con el software prss3, que emplea el algoritmo Smith-Waterman ([https://es.wikipedia.org/wiki/Algoritmo\\_Smith-Waterman](https://es.wikipedia.org/wiki/Algoritmo_Smith-Waterman)) para comparar alineamientos entre secuencias. De esta forma pudimos describir ortólogos de estas proteínas en miembros adicionales de la familia Trypanosomatidae, de las especies de *Leishmania* y *Trypanosoma*, (ver **Figura 9**).

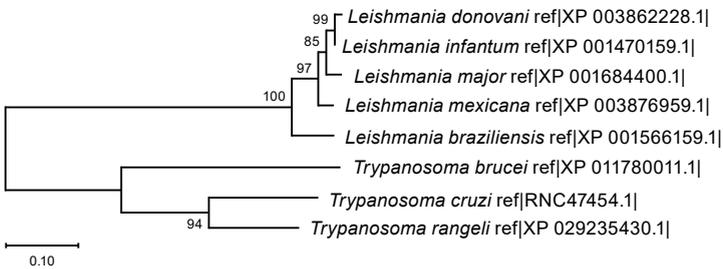
Sin embargo, no se describieron ortólogos en especies más divergentes de la familia, no infectivos para humanos, como *Crithidia* y *Sauroleishmania* [156]. La presencia de hélices transmembrana en estas proteínas, como se predijo con el software *Phyre2* (<https://es.wikipedia.org/wiki/Phyre>), sugiere un papel en la señalización intercelular o intracelular. Las redes de interacción de proteínas de especies de *Leishmania* [150] localiza 17 proteínas de la especie *L. (V.) braziliensis* en la membrana plasmática, con un potencial compartimento funcional predicho en el citosol. Usando Pfam (<https://es.wikipedia.org/wiki/Pfam>) que es una base de datos que reúne una amplia colección de alineamientos múltiples de secuencias y modelos ocultos que cubre buena parte de dominios proteicos y familias comunes, se encontró un dominio homólogo de la ligasa (enzima que puede catalizar la unión (ligadura) de dos moléculas grandes, Mur,

*Leishmania braziliensis*

## A. XP\_001568902



## B. XP\_001566159.1



**Figura 9.** Ortólogos de estas proteínas en miembros adicionales de la familia Trypanosomatidae, de las especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* Modificado de [122\*]. \*Como autor de este artículo no se requiere permiso.

en la proteína alineada con RAMP-2 [157], lo que sugiere un rol en la regulación de la rigidez de la membrana, que podría traducirse en cambios en la motilidad del parásito [156].

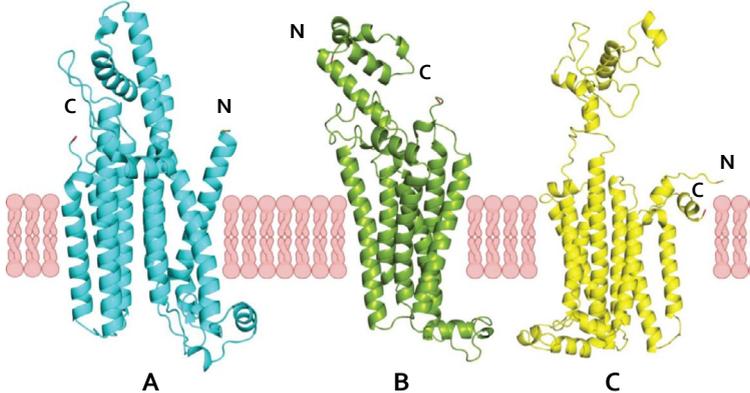
Se ha descrito que las proteínas G pequeñas [158] o los sistemas de transducción celular dependientes del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) [58] desempeñan un papel en la biología de *Leishmania*. Los detalles en cuanto a los mecanismos precisos que orquestan la cinética de estos mensajeros son poco conocidos. *Leishmania* expresa isoformas de las AC con una estructura molecular diferente a la de los eucariotas superiores, tal y como describimos anteriormente [159,160]. Si las proteínas aquí descritas se relacionan con estos mecanismos, sigue siendo una pregunta sin respuesta, pero su conservación entre las diferentes especies de *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Leishmania*) indican un papel fundamental para la supervivencia celular. Nuestros datos también sugieren que los niveles de CGRP y AM en el medio pueden modular, a través de homólogos de RAMP- (-2) y (-3), el comportamiento de taxis del parásito, como se presenta en la **Figura 7**.

## 4.5 Identificación de GPCR-like en otros protozoos

Los avances en las herramientas bioinformáticas han permitido la generación de gran cantidad de datos genómicos y proteómicos. A pesar de ello, aún no se ha podido caracterizar todas las proteínas hipotéticas, como ocurre en malaria, con el parásito *P. falciparum*, que infecta cada año a más de 200 millones de personas en todo el mundo. Hemos mencionado que en este patógeno se ha descrito una proteína estructural y funcionalmente similar a GPCR, el denominado receptor serpentina 25 (Pfsr25), del cual hemos hablado antes en este documento [147]. Por otra parte, los datos del laboratorio sugieren que para los neuropéptidos sensoriales y autonómicos, la señalización en *Leishmania* podría estar hipotéticamente asociada a GPCR y sus proteínas asociadas las RAMP.

Debido a ello y para ampliar el conocimiento sobre la presencia y funcionamiento de los GPCR en organismos patógenos en conjunto con el grupo del Prof. Kuntal Pal, de la India, hemos empleado recursos bioinformáticos para identificar y caracterizar proteínas similares a los GPCR en otros organismos (nota del autor) Para ello usamos diversas herramientas comenzando por el BLAST (<https://es.wikipedia.org/wiki/BLAST>) utilizando la secuencia de aminoácidos de Pfsr25 para identificar proteínas relacionadas u homólogos potenciales inicialmente en otros apicomplejos por la cercanía evolutiva que esto conlleva, que comparten una arquitectura similar a GPCR (excluyendo *Plasmodium taxid: 5820*).

Inicialmente, se identificó a HpSR como un hipotético receptor serpentina (ver **Figura 10**). Este resultado sugiere la existencia de diversas proteínas hipotéticas similares a GPCR en protozoos parásitos.



**Figura 10.** Predicción de estructuras terciarias mediante modelado ab-initio de proteínas hipotéticas identificadas con la ayuda del servidor de predicción de proteínas Robetta (<https://robetta.bakerlab.org/>). (A) HpSR – cian; (B) CcSR - verde; (C) ThPSR1 – amarillo. Los terminales N y C de las estructuras proteicas se mencionan con «N» y «C». Se observaron 8 hélices en (A) y (C), y solo 6 hélices en (B) (nota del autor).

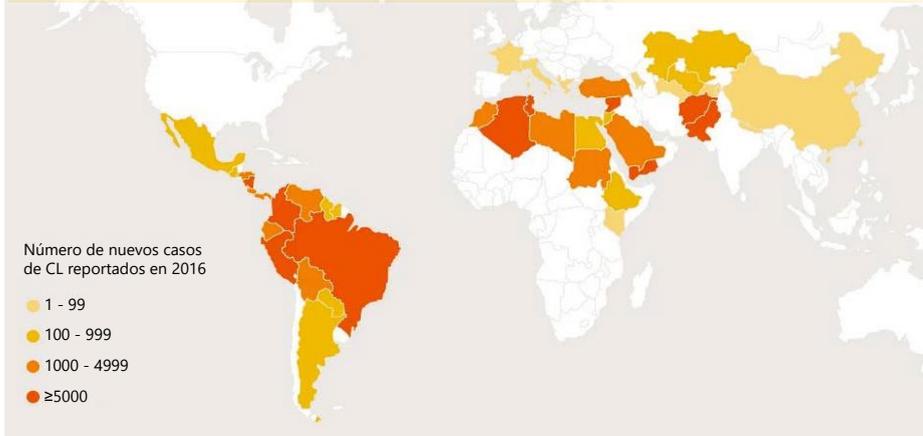
Tras la identificación de HpSR, su secuencia de aminoácidos se utilizó para hacer búsquedas BLAST e identificar más proteínas hipotéticas. La búsqueda arrojó resultados esperanzadores que predicen la existencia de siete proteínas potenciales de interés. Al comprobar sus propiedades fisicoquímicas se determinó que todas tienen dominios hidrófobos. Además, al evaluar la predicción de epítomos de células B de humanos respecto a estas siete proteínas, los resultados mostraron que ThPSR1 podría causar más reacciones inmunes que las otras proteínas debido a su mayor número de epítomos de células B.

La caracterización estructural exitosa condujo a la funcional de las proteínas. Así, se determinó que las mismas presentan de 6 a 8 hélices. Con estas diferencias en el número de hélices se generó un gráfico de hidropatía para comprobar su hidrofobicidad. El resultado caracterizó las proteínas como de transmembrana. Subsiguientes análisis, revelaron características topológicas de estas proteínas. Así, se localizaron los motivos funcionales y se hizo un análisis filogenético con diferentes clases de GPCR. El árbol de filogenia mostró proteínas relacionadas con GPCR de clase C. Adicionalmente, al realizar el análisis filogenético contra varios miembros del GPCR de Clase C se encontró que las proteínas identificadas se asociaban con los receptores GABA B1 y B2 [161].

El ácido aminobutírico (GABA) es un aminoácido no estructural, multifuncional en organismos unicelulares y pluricelulares. Amén de su papel en los mamíferos como neurotransmisor inhibitorio, se han descrito diversas funciones para él, así como el metabolismo del GABA en parásitos protozoarios. GABA actúa como mensajero de célula a célula para mediar una variedad de respuestas celulares que protegen a los parásitos del medioambiente y del estrés propiciado por el hospedero. El metabolismo del GABA está estrechamente regulado en el linaje de los protozoos. Adicionalmente, la interacción GABAérgica hospedero-parásito juega un rol fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Por lo tanto, el sistema GABAérgico parece estar ampliamente involucrado en procesos biológicos y fisiopatológicos esenciales; adicionalmente está bien conservado en protozoos parásitos y de vida libre [162].

Después de determinar la relación con el receptor GABA, se realizó un acoplamiento virtual con la ayuda de PyRX (<https://pyrx.sourceforge.io/>) [163] y se determinó el lugar de acoplamiento de la molécula. GABA se acopló en el dominio extracelular de las proteínas con un acoplamiento satisfactorio. Este tema del acoplamiento proteína-GABA ha dado lugar a un área de investigación que busca comprender el papel del GABA en la interacción hospedero-parásito. Esta novedosa clase de proteínas similares a GPCR entre los protozoos parásitos puede proporcionar dianas farmacológicas en la comprensión de los mecanismos moleculares de regulación de las interacciones hospedero-patógeno [164].

## 5. Reflexiones finales



El estilo digenético del ciclo de vida de *Leishmania* impone que las respuestas migratorias guiadas por la quimiotaxis constituyan pasos clave para la patogénesis del parásito. La comprensión de qué señales químicas están involucradas en el reconocimiento interactivo entre el hospedero y el parásito es determinante para el destino de la infección; lo mismo ocurre con la identificación de moléculas, signos y comportamientos involucrados en las respuestas [7]. Nuestra investigación ha estado orientada hacia una mejor comprensión de la naturaleza de la interacción parásito-hospedero a nivel celular. Esta interacción parásito-hospedero es una de las relaciones ecológicas más íntimas que existe entre los organismos.

El entendimiento de cada uno de los pasos involucrados puede resultar ventajosa para el desarrollo de nuevas estrategias de control, de prevención y de tratamiento contra la enfermedad. El análisis de la quimiotaxis puede constituir una aproximación para la identificación de moléculas o fármacos que afecten la migración del parásito. Nuestra propuesta es su uso como paso previo a la discriminación de compuestos para contrarrestar la infección –entrada a la célula hospedera– por *Leishmania*. La migración permite la evaluación de la taxis (quimioatrayente o quimiorrepelente) a fin de discriminar si las respuestas son interesantes o no para realizar un *screening* farmacológico inicial y orientarnos en posibles dianas terapéuticas [139].

Como una contribución importante de nuestro laboratorio, para dilucidar componentes de esta interacción, (i) el diseño de sistemas *in vitro* para aislar moléculas de la

superficie de *Leishmania* y estudiar su efecto en la respuesta celular del hospedero y (ii) nuestro trabajo pionero en la incorporación de herramientas biofísicas al área de la parasitología, y en la exploración de cómo modula el parásito la respuesta de su hospedero y qué receptores podrían estar involucrados en este proceso. Nuestro trabajo precursor demostró por ejemplo, la presencia de canales iónicos en membranas del parásito en sistemas de bicapas artificiales [165] y que el lipofosfoglicano, una molécula presente en la superficie de la *Leishmania*, puede inhibir la actividad fagocítica y migratoria de células dendríticas involucradas en la respuesta inmune del hospedero [166]; por otra parte, hemos identificado qué señales utiliza el parásito para evadir entornos hostiles y migrar hacia otros más favorables, como algunos neuropéptidos que podrían ser usados por los parásitos como sistemas de señalización de vías de migración como hemos visto en este documento.

En este último caso, los resultados obtenidos en nuestra investigación, así como la estandarización del método de capilares-dos cámaras en la evaluación de la quimiotaxis *in vitro* en promastigotes, nos permiten proponer a *Leishmania* como un modelo celular, para el estudio de la diversidad de receptores de membrana –flagelares o no–, en el que, derivados de neuropéptidos o moléculas diseñadas [137] podrían actuar para intervenir en la fase de infección por *Leishmania*. Así, el estudio de la quimiotaxis *in vitro* en promastigotes de *Leishmania* mediante el ensayo de los capilares dos cámaras, evalúa cuantitativamente la respuesta migratoria de una población de parásitos tal y como ocurre durante la interacción parásito-hospedero en una infección natural [139,167]. Esta metodología constituye una herramienta confiable y útil y sencilla de utilizar en ambientes de escasos recursos de investigación como es el caso venezolano.

Hemos abordado, entre otros, los neuropéptidos que normalmente se liberan en la piel una vez que sufre una alteración. Estas moléculas deberían ejercer su efecto estimulante o inhibitorio a las concentraciones denominadas fisiológicas. Enfatizamos el hecho de que nuestros resultados provienen de experimentos realizados a concentraciones fisiológicas para el hospedero, en este caso el humano, las cuales al desencadenar respuestas quimiotácticas en *Leishmania* modulan la invasión de la piel. Los neuropéptidos del sistema nervioso autónomo VIP y NPY desencadenaron «una respuesta de escape» en los promastigotes que «nadan» alejándose de los estímulos; lo mismo sucedió con CGRP y AM [156,168]. El mensaje final parece ser que a medida que los parásitos y las células hospederas se distancian entre sí, se desarrolla una protección potencial del hospedero contra la infección. De hecho, VIP y NPY disminuyeron el porcentaje de macrófagos infectados en un modelo *L. (L.) major*, apoyando los datos presentados en este documento e indicando un efecto de estos neuropéptidos también sobre la fagocitosis [66]. Por el contrario, SP fue quimioatrayente para los promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, aumentando la migración del parásito, a pesar

de disminuir el porcentaje de parásitos adheridos a la superficie del macrófago [65]. Se necesita más evidencia experimental para respaldar que este es un mecanismo de señalización quimiotáctico altamente conservado todo ello relacionado con el hecho de que las concentraciones de neuropéptidos de vertebrados necesarias para un efecto quimiotáctico óptimo en *Leishmania* o en *Tetrahymena* son similares a la concentración (rango  $10^{-12}$  -  $10^{-9}$  M) que se encuentra en el sistema circulatorio humano/vertebrado [65,155,156].

Las terminales nerviosas autonómicas (que inervan los músculos lisos vasculares y se ubican en la interfaz de la piel) pueden liberar péptidos vasoactivos que producen vasodilatación tras la picadura de insectos, lo que facilita la llegada de los macrófagos al sitio de la infección. Alternativamente, pueden actuar manteniendo los promastigotes en la piel, evitando que entren en la circulación sistémica debido a un efecto quimiorrepelente como se describe en este documento y se demostró previamente [67,69]. VIP puede ser un neuropéptido que actúa como regulador endógeno de la homeostasis inmune; las consecuencias fisiológicas de su presencia en el microambiente inmunitario dependen del momento de liberación del neuropéptido y de la etapa de activación de las células inmunitarias vecinas.

La concentración relativa de diferentes péptidos liberados por las terminales nerviosas sensoriales podría dañar las terminales sensoriales si predomina la SP, debido a su efecto quimioatrayente, o alternativamente en vectores este efecto quimioatrayente podría ser determinante para la migración del parásito hacia las glándulas salivales. En los invertebrados se han descrito las tachiquininas como neuropéptidos diversos y antiguos con funciones pleiotrópicas. Estos pueden actuar como vasodilatadores en las glándulas salivales, o como agentes paralizantes de las glándulas venenosas [168], algo que puede estar ocurriendo en *Leishmania*.

Nuestros datos proporcionan evidencia de que los neuropéptidos vasculares, sensoriales y autonómicos modulan la migración del parásito, y sugieren un rol potencial de los mismos en la interacción hospedero-parásito, modulando el curso natural del ciclo de vida de los protozoos durante su tránsito estresante entre ambos huéspedes y dentro de la célula huésped.

La adrenomedulina (péptido vasoactivo) descubierta en 1993 y obtenida a partir del extracto de feocromocitoma humano. Esta molécula y sus receptores están presentes en múltiples tejidos en el ser humano, tales como el riñón, corazón, cerebro y en otras especies de mamíferos (perro, rata, cochino). Su distribución es ubicua, incluso está presente en algunos fluidos en el humano, tales como la leche y el líquido cefalorraquídeo. La revisión exhaustiva de sus efectos fisiológicos en mamíferos es fundamental y conforma el marco conceptual teórico para comparar con lo que ocurre en organismos unicelulares como es nuestro caso, sin perder de vista la perspectiva clínica.

Nuestro modelo de análisis gira alrededor de la base estructural, por ejemplo, de una actividad funcional como los movimientos migratorios dirigidos por moléculas [95,137,139]. Pocos estudios analizan la presencia y efecto de la adrenomedulina en otros eucariotes. Recientemente, se evaluó la actividad quimiotáctica de la adrenomedulina y otros péptidos vasoactivos en *Tetrahymena*. La misma tiene un efecto quimiorepelente sobre este organismo [169]. Se estudió su influencia sobre la migración de dichas células mediante el estudio de la transición actinaG/actinaF en el citoesqueleto [169]. En esta línea de acción, ampliamos estos resultados utilizando otro modelo unicelular, *Leishmania*.

Es importante elucidar si los receptores GPCR y sus posibles proteínas asociadas están involucrados en los mecanismos intrínsecos de los efectos descritos en este documento, especialmente para la SP. Este neuropéptido podría estar actuando a través de un mecanismo de acción diferente al de los péptidos quimiorrepelentes. Es de destacar que es importante caracterizar mejor el llamado grupo de receptores «huérfanos», especialmente aquellos del repertorio de GPCR sin función conocida. ¿Será posible que en parásitos unicelulares como *Leishmania* estas moléculas conserven las características funcionales de los GPCR canónicos a pesar de ser estructuralmente diferentes? ¿Podría ser que conformen un complejo GPCR-receptor-RAMP? Se necesitan datos adicionales para aclarar estas preguntas.

Los receptores asociados a la enzima adenilato ciclasa (RAC) putativos también podrían estar relacionados con las respuestas quimiotácticas asociadas a neuropéptidos observadas en este documento. Estos receptores catalíticos (enzimáticos) modulan la fosforilación intracelular y los niveles de segundos mensajeros. Aunque los genes que comparten características estructurales con los codificados por *T. brucei* y *Trypanosoma equiperdum* se han descrito en *Leishmania*, es necesario dilucidar mejor su función [65]. En estos parásitos, los genes que codifican las AC han experimentado una expansión y diversificación considerables, aunque las fuerzas evolutivas que dan forma a este fenómeno son poco conocidas. El análisis de las AC de Trypanosomatidea demuestran una correlación con la expansión de la familia de genes AC y el estilo de vida, estas proteínas mediando la evasión inmune, la invasión de tejidos de insectos o incluso la interacción con endosimbiontes [170,171].

Dado que la inhibición de la motilidad flagelar se ha propuesto como diana para el estudio de nuevos fármacos contra tripanosomas africanos [172], el estudio de la quimiotaxis en diferentes cepas de *Leishmania* sería de gran utilidad en fenotipos que deberían expresar diferencias en las respuestas migratorias. Esto daría paso a un enfoque bioquímico, celular, proteómico y genético, que podría conducir a una visión integrada de la participación de la motilidad del parásito durante su ciclo de vida, virulencia o infectividad [139,156]. La intervención farmacológica de las vías de señalización de la proteína G conservadas puede constituir una herramienta en el diseño

de fármacos contra enfermedades causadas por estos parásitos. Su comprensión sería fundamental para diseñar estrategias terapéuticas novedosas para los pacientes con leishmaniasis cutánea crónica y frustrante.

Aunque el presente enfoque se orienta hacia *Leishmania*, la descripción de proteínas similares a GPCR en el parásito de la malaria, PfSR25, y su papel esencial en la detección de cationes monovalentes para modular los niveles de  $Ca^{2+}$  en *P. falciparum* establecen una base molecular de la interacción hospedero-patógeno importante de seguir explorando.

Los hallazgos sugieren que las proteínas y moléculas potencialmente involucradas en la cascada de receptores asociados, con funciones similares a aquellas en eucariotas superiores, señalan la conservación de antiguos sistemas de señalización asociados con respuestas unicelulares, fundamentales para la supervivencia celular, es decir, taxis y migración [167].

La identificación molecular de GPCR en parásitos patógenos, incluyendo *Leishmania* podría ser fundamental en la comprensión de su patogénesis. Nuestro análisis de estas proteínas de membrana en protozoos patógenos podría ayudar a comprender su importante papel en la interacción hospedero-patógeno y la supervivencia de los parásitos dentro de las células hospederas. La caracterización de proteínas hipotéticas ayudará a dilucidar las diferentes vías metabólicas de los protozoos, la progresión de la enfermedad, objetivos farmacológicos alternativos y técnicas para combatir la propagación de enfermedades.

Con los estudios realizados, el LFM ha consolidado el concepto de que estos eventos fisiológicos se modifican de manera coordinada. Su análisis y comprensión sistemáticos pueden ser útiles en el diseño de enfoques quimioterapéuticos a múltiples dianas celulares, identificando así estrategias para eludir potencialmente la quimio-resistencia en *Leishmania* y tratar con éxito la enfermedad. Los hallazgos en esta área de la fisiología celular pueden ayudar a desarrollar moléculas que intervengan en la invasión por *Leishmania* de su célula hospedera, debido a que el parásito al ser inoculado en la piel debe dirigirse a su célula hospedera para continuar su ciclo de vida. El estudio de las respuestas migratorias que determinan la infección sería de utilidad para identificar los pasos fundamentales en el reconocimiento mutuo y exitoso en la leishmaniasis. Un primer paso en el diseño de nuevos fármacos contra la leishmaniasis podría ser la evaluación de la capacidad quimiotáctica de compuestos que intervengan en la interacción del parásito con su célula hospedera.

Los efectos quimiotácticos ante distintos gradientes de concentración, así como los cambios morfológicos frente a diferentes condiciones osmóticas, permiten ampliar los conocimientos acerca de los mecanismos que intervienen en la interacción *Leishmania*-vector, lo cual puede contribuir al desarrollo de blancos para nuevas estrategias terapéu-

ticas y farmacológicas que reduzcan la capacidad vectorial de los flebótomos, o la patogenicidad de los parásitos.

Finalmente, la conversión de ciertos agentes terapéuticos en fármacos para dirigir la terapia al compartimiento intracelular correcto de la célula dañada (*drug targeting*), es lo que hemos intentado con los conjugados poliméricos de metrotexato (MTX), todo ello atendiendo a la susceptibilidad de *Leishmania* a este fármaco citostático [173]. El MTX acoplado a polipéptidos sintéticos reduce el número de parásitos que infectaron los macrófagos, en experimentos *in vitro* e *in vivo* con *L. (L.) donovani* [174]. En *L. (V.) braziliensis* estudiamos exitosamente el efecto del MTX conjugado con polipéptidos sobre la migración de promastigotes *in vitro*.

Así, el estudio de la respuesta quimiotáctica en *Leishmania* como modelo celular no solo tiene utilidad teórica, sino que ofrece aplicaciones en la identificación de moléculas con potencial terapéutico, así como podría ser útil en el diseño de estrategias de control contra la leishmaniasis (Díaz *et al.* 2013). De esta forma, la estructura sintáctica de las tres disciplinas que convergen en nuestros trabajos de investigación se basa en la aplicación del método científico, centrada en modelos que permiten explicar los hallazgos descritos desde una óptica integrada y transdisciplinaria.

---

## Referencias

---

- [1] De Vries, H.J.C., Reedijk, S.H., Schallig, H.D.F.H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **16** (2), 99–109. (2015). <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>.
- [2] World Health Organization. Global Report on Neglected Tropical Diseases. <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/global-report-on-neglected-tropical-diseases-2023> [Revisado el 05 de enero de 2024].
- [3] Savoia, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Countries.* **9** (6), 588–96 (2015). <https://doi.org/10.3855/jidc.6833>.
- [4] Makala, L.H.C., Baban, B. Novel therapeutic approaches to *Leishmania* infection. En: *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, diagnosis and treatment*, Claborn D (ed.). (Int-TechOpen 2014). <https://doi.org/10.5772/58167>.
- [5] Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F. *Leishmania* and the leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* **64**, 1–109 (2007). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3).
- [6] Sanchez-Saldaña, L., Saenz-Alduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra del-Carpio, R., Regis-Roggero, A. Leishmaniasis. *Dermat. Perú* **14**, 82–98 (2004).
- [7] Díaz, E., Ponte-Sucre, A., Leishmaniasis–The Biology of a Parasite. En: *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, Ponte-Sucre, A. and Padrón-Nieves, M. (eds.), (Springer Verlag, Wien, 2018), Introducción pp. 1–16. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_1).
- [8] Bates, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* **37** (10), 1097–106 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>.
- [9] Roy, P., Das, S., Ghosh, R., Mukherjee, A. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. *J. Cell. Anim. Biol.* **6**, 73–87 (2012).
- [10] Singh, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* **123**, 311–30 (2006).
- [11] Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R., Corbellino, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect. Dis.* **8** (3), 191-9 (2008). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70043-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70043-4).
- [12] Boggiatto, P.M., Gibson-Corley, K.N., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K., Petersen, C.A. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5** (4), e1019 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001019>.

- [13] Antonia, A.L., Ko, D.C. Leishmaniasis: A spectrum of diseases shaped by evolutionary pressures across diverse life cycle. *Evol. Med. Public Health* **27**, 139–140 (2020). <https://doi.org/10.1093/emph/eoaa032>. PMID: 32983539; PMCID: PMC7502267.
- [14] Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **392** (10151), 951–970 (2018). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2). PMID: 30126638.
- [15] Akhouni, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10** (3), e0004349 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>. Erratum in: *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10** (6), (2016). e0004770. PMID: 26937644; PMCID: PMC4777430.
- [16] Kaye, P., Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* **9** (8), 604–15 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>. PMID: 21747391.
- [17] Sanz, C.R., Miró, G., Sevane, N., Reyes-Palomares, A., Dunner, S. Modulation of Host Immune Response during *Leishmania infantum* Natural Infection: A Whole-Transcriptome Analysis of the Popliteal Lymph Nodes in Dogs. *Front. Immunol.* **12**, 794627. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.794627>. PMID: 35058931; PMCID: PMC8763708 (2022).
- [18] Lainson, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **321** (1207), 389–404 (1988). <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0099>. PMID: 290715.
- [19] Alcázar, W. *Evaluación de compuestos derivados de la betulina y del Ácido cafeico como potenciales agentes leishmanicidas en Leishmania spp. del Nuevo Mundo*. Tesis doctoral en Ciencias Mención Farmacología (2019).
- [20] Reyes Romero, H., Navarro Rojas, P., Ruíz Montufar, H., Chavez, D.S. Leishmaniasis Tegumentaria Americana. En: *Medicina tropical y enfermedades del viajero*, Reyes Romero, H., Navarro Rojas, P., Reyes Barrios, H. (eds.). (CDCH-UCV, 2011), pp. 441–81.
- [21] Glew, R.H., Saha, A. K., Das, S., Remaley, A.T. Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiol. Rev.* **52**, 412–32 (1988).
- [22] Ponte-Sucre, A. Leishmaniasis - the biology of a parasite. En: *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, Ponte-Sucre, A., Díaz, E., Padrón-Nieves, M. (eds.). (Springer Verlag, Wien, 2013), pp. 1–12.
- [23] Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M.R., Postorino, M.C., Cosentino, S., Serra, A., Capopardo, B., Nunnari, G. Mucosal leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed. Res. Int.* 805108 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/805108>.
- [24] Zerpa, O., Ponte-Sucre, A. American Tegumentary Leishmaniasis. En: *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, Ponte-Sucre, A., Díaz, E., Padrón-Nieves, M. (eds.). (Springer Verlag Wien, 2013), pp. 199–211.
- [25] Ortega Moreno, M.E., Lugo, D.A., Belizario Ochoa, D.C., Galindo Martínez, W.A., Convit, J., Zerpa, O. Comparación clínica de la leishmaniasis cutánea difusa y leishmaniasis diseminada en Venezuela. *Dermatol. Venez.* **51**, 29–35 (2013).
- [26] Zerpa, O., Padrón Nieves, M., Ponte-Sucre, A. American tegumentary leishmaniasis. En: Ponte-Sucre A, Padrón-Nieves M (eds.) *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. (Springer, 2018) p. 177–191.

- [27] Silva-Almeida, M., Pereira, B.A., Ribeiro-Guimarães, M., Alves, C.R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit. Vectors* **5**, 160 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-160>.
- [28] Pasquau, F., Ena, J., Sanchez, R., Cuadrado, J.M., Amador, C., Flores, J., Benito, C., Redondo, C., Lacruz, J., Abril, V., Onofre, J. *Leishmania* HIV Mediterranean co-operative group. Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**, 411–18 (2005).
- [29] Lindoso, J.A.L., Lima, A.C.S., Cunha, M.A., Gomes, C.M.C. Diagnosing neglected tropical diseases in HIV coinfection. *Hum. Parasit. Dis.* **7**, 11–18 (2015). <https://doi.org/10.4137/hpd.s19569>.
- [30] Cota, G.F., de Sousa, M.R., Demarqui, F.N., Rabello, A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6** (5), e1665 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001665>.
- [31] Bernier, R., Barbeau, B., Tremblay, M.J., Olivier, M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor kappa B elements. *J. Immunol.* **160**, 2881–88 (1998).
- [32] De Lima, H., Borges, R.H., Escobar, J., Convit, J. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Malarial. y Salud Ambient.* **50**, 283–99 (2010).
- [33] Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7** (5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> (2012).
- [34] Feliciangeli, M.D. Leishmaniasis en Venezuela: Situación actual, acciones y perspectivas para el control vectorial en el marco de un programa de control multisectorial. *Bol. Malarial. y Salud Ambient.* **LIV**, 1–7 (2014).
- [35] Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., Rodríguez, V., Centeno, M., Negrón, E., Belizario, D., Convit, J. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev. Panam. Salud Pública* **13**, 239–45 (2003).
- [36] Añez, N., Rojas, A., Vargas-Díaz, E., Medina, V., Crisante, G., Yopez, J.Y. Estudio epidemiológico sobre leishmaniasis visceral en la región semiárida del occidente de Venezuela con especial referencia a la detección de infecciones inaparentes. *Bol. Malarial. y Salud Ambient.* **LII**, 245–56 (2012).
- [37] Hernández, D., Rojas, E., Scorza, J.V., Jorquera, A. Infectividad del perro (*Canis familiaris*) para *Lutzomyia youngi* en Trujillo, Venezuela. *Biomédica* **26**, 242–48 (2006).
- [38] Feliciangeli, M.D. Sobre los flebotomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) con especial referencia a las especies conocidas en Venezuela. *Acta Biológica Venezolánica* **26**, 61–80 (2006).
- [39] Sharma, U., Singh, S. Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* **45**, 255–72 (2008).
- [40] Croft, S.L., Coombs, G.H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**, 502–08 (2003).

- [41] Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. (OPS series, 2013) pp.1–43.
- [42] Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* **123**(3), 399–410 (2006) PMID: 16778319.
- [43] Hendrickx, S., Guerin, P.J., Caljon, G., Croft, S.L., Maes, L. Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges. *Parasitology* **145** (4), 453–463 (2018). <https://doi.org/10.1017/S0031182016002031>. PMID: 27866478; PMCID: PMC5989324.
- [44] Ponte Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.C., Barrett, M.P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21<sup>st</sup> century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11** (12), e0006052 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.
- [45] Alcântara, L.M., Ferreira, T.C.S., Gadelha, F.R., Miguel, D.C. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. *Int. J. Parasitol. Drugs & Drug Resist* **8** (3), 430–439 (2018). doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.09.006. PMID: 30293058; PMCID: PMC6195035.
- [46] DNDi. Annual report 20 years. Available at: <https://dndi.org/about/annualreports/>.
- [47] Rotureau, B., Morales, M.A., Bastin, P., Späth, G.F. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signaling and development? *Cell Microbiol.* **11** (5), 710–718 <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01295.x> PMID: 19207727. (2009).
- [48] Zuzarte-Luís, V., Mota, M.M. Parasite Sensing of host nutrients and environmental cues. *Cell Host Microbe* **23** (6), 749–758 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.018> PMID: 29902440.
- [49] Gould, M.K., de Koning, H.P. Cyclic-nucleotide signaling in protozoa. *FEMS Microbiol Rev* **35** (3), 515–41 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00262.x> PMID: 21223322.
- [50] Grünebast, J., Clos, J. *Leishmania*: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 4016–4023 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.058> PMID: 33363698; PMCID: PMC774464.
- [51] Prieto Barja, P., Pescher, P., Bussotti, G., Dumetz, F., Imamura, H., Kedra, D., *et al.* Haplotype selection as an adaptive mechanism in the protozoan pathogen *Leishmania donovani*. *Nat. Ecol. Evol.* **1** (12), 1961–1969 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0361-x> Epub 2017 Nov 6. PMID: 29109466.
- [52] Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309** (5733), 416–22 (2005). <https://doi.org/10.1126/science.1112642> PMID: 16020726.
- [53] El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309** (5733), 404–9 (2005). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112181>. PMID: 16020724.
- [54] Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309** (5733), 436–42 (2005). <https://doi.org/10.1126/mra.00050-20>. PMID: 16020728; PMCID: PMC1470643.

- [55] Landfear, S.M., Zilberstein, D. Sensing what's out there - Kinetoplastid parasites. *Trends Parasitol.* **35** (4), 274–277 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.004>. PMID: 30655057; PMCID: PMC7392150.
- [56] Pereira, P.H.S., Borges-Pereira, L., Garcia, C.R.S. Evidences of G Coupled-Protein Receptor (GPCR) Signaling in the human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* for Sensing its Microenvironment and the Role of Purinergic Signaling in Malaria Parasites. *Curr. Trop. Med. Chem.* **21** (3), 171–180 (2021). <https://doi.org/10.2174/156802662066200826122716>. PMID: 32851963.
- [57] Moraes, M.S., Budu, A., Singh, M.K., Borges-Pereira, L., Levano-Garcia, J., Currà, C., et al. *Plasmodium falciparum* GPCR-like receptor SR25 mediates extracellular K<sup>+</sup> sensing coupled to Ca<sup>2+</sup> signaling and stress survival. *Sci. Rep.* **7** (1), 9545 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09959-8>. PMID: 28842684; PMCID: PMC557331.
- [58] Tagoe, D.N., Kalejaiye, T.D., de Koning, H.P. The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: *vive la difference!* *Front. Pharmacol.* **6**, 185 (2015). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00185>. PMID: 26441645; PMCID: PMC4561360.
- [59] Peters, E.M., Ericson, M.E., Hosoi, J., Seiffert, K., Hordinsky, M.K., Ansel, J.C., et al. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* **126** (9), 1937–47 (2006). <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700429>. PMID: 16912691.
- [60] Santos, V.C., Araujo, R.N., Machado, L.A., Pereira, M.H., Gontijo, N.F. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* **211** (Pt 17), 2792–8 (2008). <https://doi.org/10.1242/jeb.019836>. PMID: 18723537.
- [61] Santos, V.C., Vale, V.F., Silva, S.M., Nascimento, A.A., Saab, N.A., Soares, R.P., et al. Host modulation by a parasite: how *Leishmania infantum* modifies the intestinal environment of *Lutzomyia longipalpis* to favor its development. *PLoS One*, **9** (11), e111241 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111241>. PMID: 25365351; PMCID: PMC4218848.
- [62] Santos, V.C., Nunes, C.A., Pereira, M.H., Gontijo, N.F. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones. *J. Exp. Biol.* **214** (9), 1411–8 (2011). <https://doi.org/10.1242/jeb.051490>. PMID: 21490249.
- [63] Dillon, R.J., Ivens, A.C., Churcher, C., Holroyd, N., Quail, M.A., Rogers, M.E., et al. Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics* **88** (6), 831–840 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.06.011>. PMID: 16887324; PMCID: PMC2675706.
- [64] Telleria, E.L., Martins-da-Silva, A., Tempone, A.J., Traub-Csekö, Y.M. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology* **145** (10), 1336–1353 (2018). <https://doi.org/10.1017/S0031182018001014>. PMID: 29921334; PMCID: PMC6137379.
- [65] Giammarresi, M., Vanegas, O., Febres, A., Silva-López, A., López, E.D., Ponte-Sucre, A. Chemotactic activities of vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y and substance P in *Leishmania braziliensis*. *Exp. Parasitol.* **219**, 108009 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108009>. PMID: 33007296.

- [66] Ahmed, A.A., Ahmed, M., Theodorsson, E., Nordlind, K. Neuropeptide Y concentrations in experimental *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis. *Neuroreport* **9** (14), 3271–7 (1998). doi: 10.1097/00001756-199810050-00025. PMID: 9831463 (v).
- [67] Ahmed, A. A., Ahmed, M., Theodorsson, E., Nordlind, K. Decreased concentrations of CGRP in *Leishmania major* murine cutaneous leishmaniasis. *Neurosci. Lett.* **246** (3), 149–152 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00236-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00236-5).
- [68] Ahmed, A. A., Wahbi, A. H., Nordlin, K. Neuropeptides modulate a murine monocyte/macrophage cell line capacity for phagocytosis and killing of *Leishmania major* parasites. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **23** (3), 397–409 (2001). <https://doi.org/10.1081/IPH-100107339>.
- [69] Ahmed, A.A., Wahbi, A., Nordlind, K., Kharazmi, A., Sundqvist, K.G., Mutt, *et al.* *In vitro* *Leishmania major* promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides. *Scand. J. Immunol.* **48** (1), 79–85 (1998). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00380.x>. PMID: 9714414.
- [70] Kelly, F.D., Sanchez, M.A., Landfear, S.M. Touching the surface: Diverse roles for the flagellar membrane in kinetoplastid parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **84** (2), e00079–19 (2020). doi: <https://doi.org/10.1128/membr.00079-19>. PMID: 32238446; PMCID: PMC7117551.
- [71] Langousis, G., Hill, K.L. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 505–518 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3274>.
- [72] Ralston, K.S., Kabututu, Z.P., Melehani, J.H., Oberholzer, M., Hill, K.L. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 335–362 (2009). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073353>.
- [73] Kohl, L., Bastin, P. The flagellum of trypanosomes. *Int. Rev. Cytol.* **244**, 227–285 (2005). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)44006-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)44006-1).
- [74] Vaughan, S., Gull, K. The trypanosome flagellum. *J. Cell Sci.* **116**, 757–759 (2003). <https://doi.org/10.1242/jcs.00287>.
- [75] Zhou, Q., Liu, B., Sun, Y., He, C.Y. A coiled-coil- and C2-domain containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **124**, 3848–3858 (2011). <https://doi.org/10.1242/jcs.087676>.
- [76] Kohl, L., Robinson, D., Bastin, P. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J* **22**, 5336–5346 (2003). <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg518>.
- [77] Wheeler, R.J., Gluenz, E., Gull, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.* **79**, 647–662 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x>.
- [78] Wheeler, R.J. Use of chiral cell shape to ensure highly directional swimming in trypanosomes. *PLoS Comput. Biol.* **13**, e1005353 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005353>.
- [79] Bargul, J.L., Jung, J., McOdimba, F.A., Omogo, C.O., Adung'a, V.O., Krüger, T., Masiga, D.K., Engstler, M. Species-specific adaptations of trypanosome morphology and motility to the mammalian host. *PLoS Pathog.* **12**, e1005448 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005448>.

- [80] Shimogawa, M.M., Ray, S.S., Kialu, N., Zhang, Y., Geng, Q., Ozcan, A., *et al.* Parasite motility is critical for virulence of African trypanosomes. *Sci. Rep.* **8**, 9122 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27228-0>.
- [81] Shaw, S., DeMarco, S.F., Rehmann, R., Wenzler, T., Florini, F., Roditi, I., *et al.* Flagellar cAMP signaling controls trypanosome progression through host tissues. *Nat. Commun.* **10**, 803 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08696-y>.
- [82] Griffiths, S., Portman, N., Taylor, P.R., Gordon, S., Ginger, M.L., Gull, K. RNA interference mutant induction *in vivo* demonstrates the essential nature of trypanosome flagellar function during mammalian infection. *Eukaryot. Cell* **6**, 1248–1250 (2007). <https://doi.org/10.1128/EC.00110-07>.
- [83] Sun, S.Y., Kaelber, J.T., Chen, M., Dong, X., Nematbakhsh, Y., Shi, J., *et al.* Flagellum couples cell shape to motility in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **115**, E5916–E5925 (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1722618115>.
- [84] Cuvillier, A., Redon, F., Antoine, J.C., Chardin, P., DeVos, T., Merlin, G. LdARL-3A, a *Leishmania* promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity. *J. Cell. Sci.* **113** (Pt 11), 2065–74 (2000). <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.2065>. PMID: 10806117.
- [85] Cuvillier, A., Miranda, J.C., Ambit, A., Barral, A., Merlin, G. Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cell Microbiol.* **5**, 717–728 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00316.x>.
- [86] Zauli, R.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Miguel, D.C., Moura, A.S., Pereira, L., da Silva, I.A., *et al.* A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. *Parasit. Vectors* **5** (11), (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-11>.
- [87] Inbar, E., Shaik, J., Iantorno, S.A., Romano, A., Nzelu, C.O., Owens, K., Sanders, M.J., Dobson, D., Cotton, J.A., Grigg, M.E., Beverley, S.M., Sacks, D. Whole-genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis like sexual recombination in *Leishmania*. *PLoS Genet.* **15**, e1008042 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008042>.
- [88] Wheway, G., Nazlamova, L., Hancock, J.T. Signaling through the primary cilium. *Front. Cell. Dev. Biol.* **6**, 8 (2018). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>.
- [89] Bloodgood RA. Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *J. Cell Sci.* **123**, 505–509 (2010). <https://doi.org/10.1242/jcs.066308>.
- [90] Diallinas, G. Transceptors as a functional link of transporters and receptors. *Microb. Cell* **4**, 69–73 (2017). <https://doi.org/10.15698/mic2017.03.560>.
- [91] Schothorst, J., Zeebroeck, G.V., Thevelein, J.M. Identification of Ftr1 and Zrt1 as iron and zinc micronutrient transceptors for activation of the PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell* **4**, 4–89 (2017). <https://doi.org/10.15698/mic2017.03.561>.
- [92] Thevelein, J.M., Voordeckers, K. Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 2407–2414 (2009). <https://doi.org/10.1093/molbev/msp168>.
- [93] Schlein, Y. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today* **2**, 175–177 (1986). [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(86\)90150-x](https://doi.org/10.1016/0169-4758(86)90150-x).

- [94] Piper, R.C., Xu, X., Russell, D.G., Little, B.M., Landfear, S.M. Differential targeting of two glucose transporters from *Leishmania enriettii* is mediated by an NH<sub>2</sub>-terminal domain. *J. Cell Biol.* **128**, 499–508 (1995). <https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.499>.
- [95] Tran, K.D., Rodríguez-Contreras, D., Shinde, U., Landfear, S.M. Both sequence and context are important for flagellar targeting of a glucose transporter. *J. Cell Sci.* **125**, 3293–3298 (2012). <https://doi.org/10.1242/jcs.103028>.
- [96] Rodríguez-Contreras, D., Aslan, H., Feng, X., Tran, K., Yates, P.A., Kamhawi, S., *et al.* Regulation and biological function of a flagellar glucose transporter in *Leishmania mexicana*: a potential glucose sensor. *FASEB J.* **29**, 11–24 (2015). <https://doi.org/10.1096/fj.14-251991>.
- [97] Shaked-Mishan, P., Suter-Grotemeyer, M., Yoel-Almagor, T., Holland, N., Zilberstein, D., Rentsch, D. A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol. Microbiol.* **60**, 30–38 (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05060.x>.
- [98] Darlyuk, I., Goldman, A., Roberts, S.C., Ullman, B., Rentsch, D., Zilberstein, D. Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **284**, 19800–19807 (2009). <https://doi.org/10.1074/jbc.M901066200>.
- [99] Goldman-Pinkovich, A., Balno, C., Strasser, R., Zeituni-Molad, M., Bendelak, K., Rentsch, D., *et al.* An arginine deprivation response pathway is induced in *Leishmania* during macrophage invasion. *PLoS Pathog.* **12**, e1005494 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005494>.
- [100] Pawar, H., Puri, M., Fischer Weinberger, R., Madhubala, R., Zilberstein, D. The arginine sensing and transport binding sites are distinct in the human pathogen *Leishmania*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007304 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007304>.
- [101] Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, *et al.* Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.* **279**, 31010–31017 (2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M403959200>.
- [102] Figarella, K., Uzcategui, N.L., Zhou, Y., LeFurgey, A., Ouellette, M., Bhattacharjee, H., *et al.* Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol. Microbiol.* **65**, 1006–1017 (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05845.x>.
- [103] Leslie, G., Barret, M., Burchmore, R. *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. *Exp. Parasitol.* **102**, 117–120 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00031-6).
- [104] Van Albada, S. B., ten Wolde, P. R. Enzyme Localization can drastically affect signal amplification in signal transduction pathways. *PLoS Comput. Biol.* **3** (10), 925–934 (2007). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030195>.
- [105] Bray, D., Levin, M. D., Morton-Firth, C. J. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature* **393** (6680), 85–88 (1998). <https://doi.org/10.1038/30018>.
- [106] Nair, A., Chauhan, P., Saha, B., Kubatzky, K. F. Conceptual evolution of cell signaling. *Int J. Mol. Sci.* **20** (13), 3292 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20133292>.
- [107] Yurchenko, V. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology* **146** (1), 1–27 (2019). <https://doi.org/10.1017/S0031182018000951>.

- [108] Chen, J., Almo, S. C., Wu, Y. General principles of binding between cell surface receptors and multi-specific ligands: A computational study. *PLoS Comput. Biol.* **13** (10), e1005805 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005805>.
- [109] Portilla-Martínez, A., Ortiz-Flores, M., Hidalgo, I., González-Ruiz, C., Ceballos, G., Nájera, N. Defining pharmacological terms based on receptor ligand interactions. *Cardiovasc. Metab. Sci.* **31** (3), 66–70 (2020). <https://dx.doi.org/10.35366/95585>.
- [110] Moyle, W. R., Campbell, R. K., Myers, R. V., Bernard, M. P., Han, Y., Wang, X. Co-Evolution of ligand-receptor pairs. *Nature* **368** (6468), 251–255 (1994). <https://doi.org/10.1038/368251a0>.
- [111] Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **19** (3), 207–226 (1997). <https://doi.org/10.1677/jme.0.0190207>.
- [112] Grandchamp, A., Monget, P. The membrane receptors that appeared before their ligand: The different proposed scenarios. *PLoS One* **15** (5), e0231813 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231813>.
- [113] Gerhart, J., Kirschner, M. The theory of facilitated variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (Suppl. 1), 8582–8589 (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0701035104>.
- [114] Kaiser, A., Coin, I. Capturing peptide–GPCR interactions and their dynamics. *Molecules* **25**, 4724 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25204724>.
- [115] Thomason, P. A., Wolanin, P. M., Stock, J. B. Signal transduction: Receptor clusters as information processing arrays. *Curr. Biol.* **12** (11), R399–R401 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00885-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00885-0).
- [116] Segall, J. E., Block, S. M., Berg, H. C. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (23), 8987–8991 (1986). <https://doi.org/10.1073/pnas.83.23.8987>.
- [117] Sourjik, V., Berg, H. C. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (1), 123–127 (2002). <https://doi.org/10.1073/pnas.011589998>.
- [118] Krummel, M. F., Davis, M. M. Dynamics of the immunological synapse: Finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* **14** (1), 66–74 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00299-0).
- [119] de Mendoza, A., Sebé-Pedrós, A., Ruiz-Trillo, I. The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. *Genome Biol. Evol.* **6** (3), 606–19 (2014). <https://doi.org/10.1093/gbe/evu038>. PMID: 24567306; PMCID: PMC3971589.
- [120] Crespi, B. J. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 178–183 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02115-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02115-2).
- [121] Hay, D. L., Pioszak, A. A. Receptor Activity-Modifying Proteins (RAMPs): New insights and roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 469–487 (2016). <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103120>.
- [122] Smith, F. D., Scott, J. D. Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway. *Curr. Biol.* **12** (1), R32–R40 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00646-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00646-7).

- [123] Pioszak, A.A., Hay, D.L. RAMPs as allosteric modulators of the calcitonin and calcitonin-like class B G protein-coupled receptors. *Adv. Pharmacol.* **88**, 115–41 (2020). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2020.01.001>.
- [124] Heldin, C. H. Dimerization of cell Surface receptors in signal transduction. *Cell* **80** (2), 213–223 (1995). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90404-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90404-2).
- [125] Lauffenburger, D. A. Cell signaling pathways as control modules: complexity for simplicity? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (10), 5031–5033 (2000). <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5031>.
- [126] Needham, E. J., Parker, B. L., Burykin, T., James, D. E., Humphrey, S. J. Illuminating the dark phosphoproteome. *Sci. Signal* **12** (565), eaau8645 (2019). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau8645>.
- [127] Dubitzky, W., Bower, J.M., Bolouri, H. Computational modeling of genetic and biochemical networks. *Bio. Med. Eng. Online* **4**, 56 (2005). <https://doi.org/10.1186/1475-925X-4-56>.
- [128] Wang, H., Zhang, M. The Role of Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases in bidirectional synaptic plasticity and brain function. *Rev. Neurosci.* **23**, 67–78 (2012). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2011-0063>.
- [129] Díaz, E., Zacarias, A.K., Pérez, S., Vanegas, O., Köhidai, L., Padrón-Nieves, M., Ponte-Sucre, A. Effect of aliphatic, monocarboxylic, dicarboxylic, heterocyclic and sulphur-containing amino acids on *Leishmania* spp. chemotaxis. *Parasitology* **142** (13), 1621–30 (2015). <https://doi.org/10.1017/S003118201500116X>. PMID: 26396059.
- [130] Barros, V., Gontijo, N., Melo, M. Oliveira, J. *Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Exp. Parasitol.* **112**, 152–157 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.10.005>.
- [131] Inbar, E., Schlisselber, D., Suter Grottemeyer, M., Rentsch, D. Zilberstein, D. A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *Biochem. J.* **449**, 555–566 (2013). <https://doi.org/10.1042/BJ20121262>.
- [132] Burrows, C. Blum, J. Effect of hyper-osmotic stress on alanine content of *Leishmania major* promastigotes. *J. Protozool.* **38**, 47–52 (1991). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1991.tb04799.x>.
- [133] Darling, T. and Blum, J. Changes in the shape of *Leishmania major* promastigotes in response to hexoses, proline, and hypo-osmotic stress. *J. Protozool.* **37**, 267–272 (1990). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1990.tb01254.x>.
- [134] LeFurgey, A., Blum, J. Ingram, P. Compartmental responses to acute osmotic stress in *Leishmania major* result in rapid loss of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molec. Integrat. Physiol.* **128**, 385–393 (2000). [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00319-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00319-6).
- [135] Dillon, R. J., Ivens, A. C., Churcher, C., Holroyd, N., Quail, M. A., Rogers, M. E. *et al.* Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics* **88**, 831–840 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.06.011>.

- [136] Bates, P. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr. Op. Microbiol.* **11**, 340–344 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003>.
- [137] Díaz, E., Köhidai, L., Ríos, A., Vanegas, O., Silva, A., Szabó, R., *et al.* *Leishmania braziliensis*: cytotoxic, cytostatic and chemotactic effects of poly-lysine- Methotrexate-conjugates. *Exp. Parasitol.* **135**, 134–141 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.007>.
- [138] Handman, E., Goding, J., Papenfuss, A. Speed, T. *Leishmania* surface proteins. En *Leishmania*, after the Genome (Fasel, N. y Myler, P., eds.), (Caister Academic Press, England 2008), pp. 177–204. <https://doi.org/10.21775/9781910190272>.
- [139] Díaz, E., Köhidai, L., Ponte-Sucré, A., Ríos, A. Vanegas, O. Ensayos de quimiotaxis in vitro en *Leishmania* spp. Evaluación de la técnica de los capilares-dos cámaras en promastigotes. *Rev. Fac. Farmacia-UCV* **74**, 31–39 (2011).
- [140] Pozzo, L. Y., Fontes, A., de Thomaz, A. A., Santos, B. S., Farias, P. M., Ayres, D. C., *et al.* Studying taxis in real time using optical tweezers: applications for *Leishmania amazonensis* parasites. *Micron* **40**, 617–620 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.02.008>.
- [141] Coulter LJ, Hide G. *Trypanosoma brucei*: characterization of a life cycle stage-specific G-protein. *Exp. Parasitol.* **80** (2), 308–18 (1995). doi: 10.1006/expr.1995.1037. PMID: 7895841. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1037>.
- [142] Oz HS, Huang H, Wittner M, Tanowitz HB, Bilezikian JP, Morris SA. Evidence for guanosine triphosphate-binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50** (5),620–31 (1994). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.620>. PMID: 8203713.
- [143] Kaiser A. Druggable targets in cyclic nucleotide signaling pathways in Apicomplexan parasites and Kinetoplastids against disabling protozoan diseases in humans. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (1), 138 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20010138>. PMID: 30609697; PMCID: PMC6337498.
- [144] Rojas, F., Silvester, E., Young, J., Milne, R., Tettey, M., Houston, D. R., *et al.* Oligopeptide signaling through TbGPR89 drives Trypanosome quorum sensing. *Cell* **176** (1-2), 306–317 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.041>.
- [145] Pandey, S., Nelson, D. C., Assmann, S. M. Two novel GPCR-Type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell* **136**, 136–148 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.026>.
- [146] Jansen, C., Wang, H., Kooistra, A. J., de Graaf, C., Orrling, K. M., Tenor, H., *et al.* Discovery of novel *Trypanosoma brucei* phosphodiesterase B1 inhibitors by virtual screening against the unliganded TbrPDEB1 crystal structure. *J. Med. Chem.* **56** (5), 2087–2096 (2013). <https://doi.org/10.1021/jm3017877>.
- [147] Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A., Valencia, A. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J. Cell Biol.* **196** (2), 189–201 (2012). <https://doi.org/10.1083/jcb.201103008>.
- [148] Thumkeo, D., Watanabe, S., Narumiya, S. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.* **92** (10-11), 303–315 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.jcb.2013.09.002>.

- [149] Chandel, H. S., Pandey, S. P., Shukla, D., Lalsare, K., Selvaraj, S. K., Jha, M. K., *et al.* Toll-Like receptors and CD40 modulate each other's expression affecting *Leishmania major* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **176** (2), 283–290 (2014). <https://doi.org/10.1111/cei.12264>.
- [150] dos Santos Vasconcelos, C. R., de Lima Campos, T., Rezende, A. M. Building protein-protein interaction networks for *Leishmania* species through protein structural information. *BMC. Bioinf.* **19** (1), 85 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2105-6>.
- [151] Bonfim-Melo, A., Ferreira, É. R., Mortara, R. A. Rac1/WAVE2 and Cdc42/N-WASP participation in actin-dependent host cell invasion by extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.* **9**, (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00360>.
- [152] Bahl, S., Parashar, S., Malhotra, H., Raje, M., Mukhopadhyay, A. Functional characterization of monomeric GTPase Rab1 in the secretory pathway of *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **290** (50), 29993–30005 (2015). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.670018>.
- [153] Parashar, S., Mukhopadhyay, A. GTPase Sar1 regulates the trafficking and secretion of the virulence factor Gp63 in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **292** (29), 12111–12125 (2017). <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784033>.
- [154] Rastogi, R., Verma, J. K., Kapoor, A., Langsley, G., Mukhopadhyay, A. Rab5 isoforms specifically regulate different modes of endocytosis in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **291** (28), 14732–14746 (2016). <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.716514>.
- [155] Díaz, E., Febres, A., Giammarresi, M., Silva, A., Vanegas, O., Gomes, C., *et al.* G Protein-Coupled Receptors as potential intercellular communication mediators in Trypanosomatidae. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **12**, 812848 (2022). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.812848>. PMID: 35651757; PMCID: PMC9149261.
- [156] Febres, A., Vanegas, O., Giammarresi, M., Gomes, C., Díaz, E., Ponte-Sucre, A. Is the activity of CGRP and Adrenomedullin regulated by RAMP (-2) and (-3) in Trypanosomatidae? An in-silico approach. *Infect Genet Evol* **61**, 197–206 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.003>. Erratum in: *Infect. Genet. Evol.* **95**, 105002 (2021). PMID: 29626675.
- [157] Campos-Salinas, J., Cavazzuti, A., O'Valle, F., Forte-Lago, I., Caro, M., Beverley, S. M., *et al.* Therapeutic efficacy of stable analogues of Vasoactive Intestinal Peptide Against Pathogens. *J. Biol. Chem.* **289** (21), 14583–14599 (2014). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.560573>.
- [158] Maheshwari, D., Yadav, R., Rastogi, R., Jain, A., Tripathi, S., Mukhopadhyay, A., *et al.* Structural and biophysical characterization of Rab5a from *Leishmania Donovanii*. *Biophys. J.* **115** (7), 1217–1230 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.032>.
- [159] Sánchez, M. A., Zeoli, D., Klamo, E. M., Kavanaugh, M. P., Landfear, S. M. A Family of putative receptor-Adenylate Cyclases from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **270** (29), 7551–7558 (1995). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17551>.
- [160] Kelly, F. D., Yates, P. A., Landfear, S.M. Nutrient sensing in *Leishmania*: Flagellum and Cytosol. *Mol. Microbiol.* **115** (5), 849–859 (2021). <https://doi.org/10.1111/mmi.14635>.
- [161] Geourjon, C. G. Deléage, SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* **11** (6), 681–4 (1995). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/11.6.681>.

- [162] Nugraha, R.Y.B., G. Jeelani, T. Nozaki, Physiological roles and metabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA) in parasitic protozoa. *Trends Parasitol.* **38** (6), 462–477 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.02.004>.
- [163] Dallakyan, S. A.J. Olson, Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.* **1263**, 243–50 (2015). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19).
- [164] Ganea, D., and Delgado, M. Inhibitory neuropeptide receptors on macrophages. *Microb. Infect.* **3** (2), 141–147 (2001). [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01361-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01361-7).
- [165] DiFranco M, Villaroel A, Ponte-Sucre A, Quiñonez M, Drujan D, Dagger F. Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *L. mexicana* into planar bilayers. *Acta Científica Venezolana*, **45**, 206–207 (1995).
- [166] Ponte-Sucre, A., Scharner, A., Moll, H. El lipofosfoglicano de *Leishmania major* modula la expresión de receptores involucrados en la internalización del parásito en células de Langerhans de la piel. *Acta Científica Venezolana*, **53**, 218–224 (2002).
- [167] Díaz López, E., Ríos Díaz, A., Vanegas Calderón, O., Lajko, E., Ponte-Sucre, A., Köhidaí, L. Chemotaxis in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: Evaluation by the two-chamber. *MethodsX* **8**, 101223 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101223>.
- [168] Nässel, D.R., Zandawala, M., Kawada, T., and Satake, H. Tachykinins: Neuropeptides that are ancient, diverse, widespread and functionally pleiotropic. *Front. Neurosci.* **13**, (2019). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01262>.
- [169] Szemes Á, Lajkó E, Láng O, Köhidaí L. Chemotactic effect of mono- and disaccharides on the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Carbohydr. Res.* **407**,158–65 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.02.009>. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25795600.
- [170] Kennedy, P. G. E. Clinical features, diagnosis, and treatment of Human African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness). *Lancet Neurol.* **12**, 186–194 (2013). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X).
- [171] Durante, A. M., Butenko, A., Rašková, V., Charyyeva, A., Svobodová, M., Yurchenko, V., *et al.* Large-scale phylogenetic analysis of Trypanosomatid adenylate cyclases reveals associations with extracellular lifestyle and host–pathogen interplay. *Genome Biol. Evol.* **12** (12), 2403–2416 (2020). <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa226>.
- [172] Broadhead, R., Dawe, H. R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S. R., Portman, N., *et al.* Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440** (7081), 224–227 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04541>.
- [173] Bai KB, Láng O, Orbán E, Szabó R, Köhidaí L, Hudecz F, Mező G. Design, synthesis, and in vitro activity of novel drug delivery systems containing tuftsin derivatives and methotrexate. *Bioconjug. Chem.* **19** (11), 2260–9 (2008). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc800115w>. PMID: 18959436.
- [174] Kóczán G, Ghose AC, Mookerjee A, Hudecz F. Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection in vitro and in experimental animals. *Bioconjug Chem.* **13** (3), 518–24 (2002). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc015530e>. PMID: 12009941.
- [175] Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular 2.<sup>da</sup> edición.* (Editorial Médica Panamericana, Argentina, 2007) 1260 pp.

- [176] Couvineau, A., Laburthe, M. The Family B1 GPCR: Structural Aspects and Interaction with Accessory Proteins. *Curr. Drug Targ.* **13** (1), 103–115 (2012).
- [177] Babin, k., Jordan, K., Gordon, P., Lennon, J., Dickson, A., Pioszak, A. Adrenomedullin 2/intermedin is a slow off-rate, long-acting endogenous agonist of the adrenomedullin2 G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **299**, (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104785>.



### **Alicia Ponte-Sucre**

Profesora titular e investigadora, coordinadora del Laboratorio de Fisiología Molecular de la Cátedra de Fisiología del Instituto de Medicina Experimental (IME), perteneciente a la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV), e investigadora visitante en la Universidad de Würzburg, Alemania. Es Individuo de Número de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Profesora del Postgrado de Ciencias Fisiológicas y Farmacología (UCV). Miembro fundador y vicepresidenta de la Junta Directiva de la Fundación Universitaria Fundadiagnóstica y está incluida en: The World Who's Who of Women, 1996, 1999; International Directory of Distinguished Leadership, 1997; Woman of the Year 1997, 2000, 2008; Outstanding People of the 20th Century, 1998; International Who's Who of Professional and Business Women, 2001, 2003; Top 100 Educators, 2008, Who's Who in Science and Engineering, 2011. Sus investigaciones se centran en los mecanismos moleculares asociados al desarrollo de resistencia a drogas y descripción de nuevos fármacos en parásitos unicelulares. Mantiene relaciones internacionales con Alemania y Gran Bretaña, y países de América Latina. Es además, expresidenta de la Junta Directiva y excoordinadora del Consejo Consultivo de la Asociación Cultural Humboldt, Caracas, Venezuela.

Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales  
Palacio de las Academias, av. Universidad, Apartado de Correo 1421.  
Caracas 1010-A, Venezuela.