



Universidad de Granada

Departamento de Parasitología

Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina

Nuevas Perspectivas en el Tratamiento de la  
Leishmaniosis: Evaluación de Derivados  
Hidroxámicos y (-)- $\alpha$ -Bisabolol

Victoriano Corpas López

Granada, diciembre de 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Victoriano Corpas López

ISBN: 978-84-9125-479-9

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42208>



Universidad de Granada

Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina

Nuevas Perspectivas en el Tratamiento de la  
Leishmaniosis: Evaluación de Derivados Hidroxámicos  
y (-)- $\alpha$ -Bisabolol

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

D. Victoriano Corpas López para aspirar al grado de

Doctor

Granada, diciembre de 2015

Fdo. Victoriano Corpas López

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. Joaquina Martín Sánchez

Dr. Francisco Morillas Márquez



El doctorando D. Victoriano Corpas López y los directores de la tesis Dr. Joaquina Martín Sánchez y Dr. Francisco Morillas Márquez, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 12 de noviembre de 2015

Directores de la Tesis

Joaquina Martín Sánchez

Francisco Morillas Márquez

Fdo.:

Fdo.:

Doctorando

Victoriano Corpas López

Fdo.:



A mi abuelo



Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la **colaboración** de las siguientes personas e instituciones:

El profesor Dr. José Antonio Gómez Vidal, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada y su equipo, los doctores Mónica Díaz Gavilán, Francisco Franco Montalbán y Sonia Panadero Fajardo, que diseñaron, sintetizaron y purificaron los compuestos utilizados en esta tesis doctoral.

Los profesores e investigadores del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, Dr. Julián López-Viota Gallardo y Dra. Margarita López-Viota Gallardo, que vehiculizaron los compuestos sintetizados, haciendo posible su utilización.

La profesora Dra. Concepción Navarro Moll, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, que proporcionó asesoramiento en los ensayos de evaluación del compuesto (-)- $\alpha$ -bisabolol.

La Fundación Medina (Granada) que realizó los ensayos de seguridad y metabolismo *in vitro* del compuesto MTC-305.

La Sociedad Protectora de Animales y Plantas de Granada (centro inscrito en el registro de explotaciones ganaderas con el número ES190790000096) por alojar la realización del ensayo clínico en perros naturalmente infectados, facilitando sus instalaciones y personal.

El laboratorio de análisis veterinario ANLAVE, que realizó los análisis bioquímicos y hematológicos de los perros.

El grupo de investigación de la Dra. Eva Gluenz (Gluenz Lab) en la Sir William Dunn School of Pathology (University of Oxford), que me permitió realizar la estancia de investigación para la caracterización de las enzimas histona desacetilasas.



Este trabajo de tesis doctoral ha sido **subvencionado** por:

El grupo de investigación de la Junta de Andalucía BIO-176

El proyecto del Ministerio "Sobre el posible establecimiento de *Leishmania tropica* en España y la expansión altitudinal de los vectores de *Leishmania infantum* en el sudeste de España" del Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2010-22368-C02.02), de 3 años de duración (2011-2013).

El proyecto "Valoración de un nuevo inhibidor de la histona desacetilasa con actividad leishmanicida in *vitro* en el tratamiento de la leishmaniosis experimental en modelos animales", del subprograma GREIB Translational Projects de la Universidad de Granada, de un año de duración (2011).

El proyecto "Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de las histona desacetilasas" del CEI-Biotic Granada, de un año de duración (2012).

El proyecto "Evaluación de la eficacia y seguridad de un nuevo fármaco antiparasitario" del CEI-Biotic Granada, de un año de duración (2013).

El Programa de Ayudas a la Transferencia de Investigación, de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación de la Universidad de Granada, a través de la concesión de ayudas para la Realización de Prototipos y Experiencias Piloto (2013).



## **Agradecimientos**

A toda mi familia y en particular a mis padres, Victoriano y Herminia, por apoyarme e impulsarme en mi carrera investigadora de forma incondicional. Un emotivo recuerdo por los que ya no están y más recientemente por mi abuelo Evaristo, que desde pequeño me inculcó una profunda cultura científica.

A Gema, mi compañera, pareja y parte de mi familia, por su cariño, apoyo y comprensión en los momentos duros, tanto en el laboratorio como fuera de éste.

A mis directores de tesis, la Dra. Joaquina Martín Sánchez y el Dr. Francisco Morillas Márquez, por confiar en mí en un principio, introducirme en el mundo de la investigación y apoyar esta investigación mediante su esfuerzo y los medios a su alcance.

A los compañeros de laboratorio, particularmente Magdalena, Gema, Lola, Patri, Ana, Nieves, Lidia y Víctor, por los grandes momentos dentro y fuera de éste, amenizando las horas con nuestras bromas y paseos a la cafetería. Una especial mención para Manolo y Fernando, a los que considero mis mentores por enseñarme y orientarme al principio de mi etapa investigadora.

Al Departamento de Parasitología, sus profesores, técnicos de laboratorio y administración, que siempre me han mostrado su disposición y simpatía, con un especial recuerdo a José Antonio.

A todos los que colaboraron en este trabajo y lo hicieron posible: los integrantes del grupo de investigación del Dr. Gómez Vidal, la profesora Concepción Navarro, los doctores López-Viota Gallardo, los trabajadores de la sociedad protectora de animales de Granada y a la Dra. Carmen Acedo.

And last but not least, I'd like to show my gratitude to each and one of the members of the Gluenz Lab and Gull Lab, who taught me and helped me carry out the research there, particularly Dr. Gluenz who allowed me to work at her lab and supported this research.

A todas las personas que han compartido conmigo la realización de esta tesis, mis amigos, compañeros de la facultad y de la carrera.

A todos, Gracias.



"A better drug is obviously not  
a new molecule which injected  
into mice produces a paper"

Paul Janssen



# Indice

I.	ABSTRACT.....	5
II.	INTRODUCCIÓN .....	11
<b>1.</b>	<b>Leishmaniosis: Concepto y generalidades.....</b>	<b>13</b>
1.1.	Clasificación taxonómica.....	18
1.2.	Morfología.....	21
1.3.	Ciclo biológico.....	22
1.4.	Formas clínicas de la Leishmaniosis.....	23
1.5.	El Vector.....	25
<b>2.</b>	<b>Diagnóstico de la leishmaniosis .....</b>	<b>27</b>
2.1.	Diagnóstico de la leishmaniosis visceral.....	27
2.2.	Diagnóstico de la leishmaniosis cutánea y cutáneo-mucosa.....	29
2.3.	Leishmaniosis dérmica post kala-azar.....	30
2.4.	Diagnóstico en caso de coinfección <i>Leishmania</i> y VIH.....	30
<b>3.</b>	<b>Tratamiento de la leishmaniosis .....</b>	<b>31</b>
3.1.	Arsenal terapéutico.....	31
3.2.	Opciones terapéuticas en las leishmaniosis.....	35
3.3.	Seguimiento y monitorización de la leishmaniosis visceral.....	40
3.4.	Nuevas perspectivas en el tratamiento de la leishmaniosis.....	41
3.5.	Productos naturales en el tratamiento de la leishmaniosis.....	44
<b>4.</b>	<b>La leishmaniosis canina.....</b>	<b>47</b>
4.1.	Epidemiología de la leishmaniosis canina.....	47
4.2.	Mecanismos de la enfermedad.....	48
4.3.	Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis canina.....	49
4.4.	Diagnóstico de la leishmaniosis canina.....	50
4.5.	Tratamiento de la leishmaniosis canina.....	51
<b>5.</b>	<b>Las enzimas histona desacetilasa .....</b>	<b>53</b>
5.1.	Las enzimas histona desacetilasa en <i>Leishmania</i> y otros protozoos parásitos 54	
5.2.	Inhibidores de histona desacetilasa.....	56
III.	AIM AND OBJECTIVES.....	59

IV.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	63
<b>1.</b>	<b>Productos</b> .....	<b>65</b>
1.1.	Fármacos de referencia para el tratamiento de la leishmaniosis .....	65
1.2.	Nuevos compuestos para el tratamiento de la leishmaniosis.....	65
<b>2.</b>	<b>Medios de cultivo</b> .....	<b>66</b>
<b>3.</b>	<b>Parásitos, líneas celulares de mamífero y su cultivo</b> .....	<b>68</b>
3.1.	Especies y cepas de parásito utilizadas .....	68
3.2.	Cultivo de parásitos.....	69
3.3.	Líneas celulares de mamífero.....	70
3.4.	Extracción y cultivo de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón	71
3.5.	Criopreservación de células .....	72
<b>4.</b>	<b>Ensayos <i>in vitro</i></b> .....	<b>73</b>
4.1.	Evaluación de la actividad de los compuestos sobre promastigotes de <i>Leishmania</i> spp.....	73
4.2.	Evaluación de la actividad de los compuestos frente a amastigotes intracelulares de <i>Leishmania</i> spp. o <i>T. cruzi</i> .....	74
4.3.	Ensayos de citotoxicidad celular y determinación de índice de selectividad	75
4.4.	Estrategia de cribado o "screening" de compuestos.....	76
4.5.	Ensayos <i>in vitro</i> para la evaluación del mecanismo de acción .....	77
<b>5.</b>	<b>Ensayos <i>in vivo</i> en animales de laboratorio</b> .....	<b>80</b>
5.1.	Animales de experimentación: Ratones .....	80
5.2.	Ensayos en ratones experimentalmente infectados.....	80
5.3.	Evaluación de la toxicidad .....	86
5.4.	Análisis estadístico.....	88
<b>6.</b>	<b>Ensayo clínico piloto en perros infectados por <i>L. infantum</i> de forma natural</b>	<b>89</b>
6.1.	Condiciones del Ensayo.....	89
6.2.	Muestreo y selección de los perros .....	90
6.3.	Procedimiento de toma de muestras.....	90
6.4.	Modelo experimental .....	93
6.5.	Evaluación de la eficacia de los compuestos en el tratamiento de la leishmaniosis canina.....	95
6.6.	Evaluación toxicológica durante el ensayo:.....	108

<b>7. Estudio de las proteínas Histona Desacetilasa en <i>L. mexicana</i>.....</b>	<b>111</b>
7.1. Cepa del parásito y su cultivo .....	111
7.2. Cepa bacteriana y su cultivo .....	112
7.3. Análisis bioinformático.....	112
7.4. Plásmidos utilizados.....	113
7.5. Estrategia y diseño de etiquetado o "tagging" de proteínas .....	116
7.6. Digestión.....	122
7.7. Reacción de ligación .....	123
7.8. Transformación bacteriana.....	123
7.9. Electroforesis en Geles de Agarosa.....	124
7.10. Purificación de producto de PCR.....	124
7.11. Extracción de ADN plasmídico.....	125
7.12. Transfección del parásito .....	125
7.13. Western Blot.....	127
7.14. Fijación de preparaciones y observación de fluorescencia en mutantes...	129
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>131</b>
<b>1. Ensayos in vitro.....</b>	<b>133</b>
1.1. Ensayos de actividad de diversos compuestos sobre promastigotes de <i>L. infantum</i> .....	133
1.2. Ensayos de actividad sobre amastigotes intracelulares en macrófagos ....	135
1.3. Evaluación del mecanismo de acción del (-)- $\alpha$ -bisabolol .....	151
1.4. Ensayos <i>in vitro</i> frente a amastigotes intracelulares de <i>L. infantum</i> con el compuesto MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y de oro.....	156
<b>2. Experimentos <i>in vivo</i> sobre ratones infectados experimentalmente .....</b>	<b>157</b>
2.1. Optimización de la infección experimental .....	157
2.2. Evaluación <i>in vivo</i> del compuesto MTC-305 libre.....	158
2.3. Evaluación <i>in vivo</i> del compuesto MDG .....	170
2.4. Evaluación <i>in vivo</i> del compuesto natural (-)- $\alpha$ -bisabolol.....	175
<b>3. Ensayos clínicos en perros naturalmente infectados.....</b>	<b>181</b>
3.1. Muestreo y selección de los perros .....	181
3.2. Características clínicas relacionadas con la leishmaniosis de los perros incluidos en los ensayos antes del tratamiento .....	183
3.3. Evaluación del antimonio de meglumina (Glucantime®) en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural.....	195
3.4. Evaluación del MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural .....	202

3.5.	Evaluación del tratamiento con una combinación de antimonio de meglumina (Glucantime®) y MTC-305 en la leishmaniosis canina adquirida de forma natural	209
3.6.	Evaluación del (-)- $\alpha$ -bisabolol administrado por vía oral en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural	216
<b>4.</b>	<b>Estudio de las enzimas histona desacetilasa de <i>L. mexicana</i></b>	<b>223</b>
4.1.	Análisis Bioinformático	223
4.2.	Localización subcelular	223
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>228</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>264</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>269</b>

# I. Abstract

## I. Abstract

Leishmaniasis is a neglected disease which occurs in 98 countries across five continents with 350 million people living at risk. Visceral leishmaniasis has been estimated at 300,000 new cases each year. Current drugs used in visceral leishmaniasis present several drawbacks including high toxicity and adverse effects, increasing resistance, high cost and variability in specificity according to geographical region. Pentavalent antimonials show high toxicity and yet they have been the first-line treatment for decades, whereas pentamidine, amphotericin B and paromomycin are second-line treatment drugs. The last drug to be added to the therapeutic arsenal for leishmaniasis is miltefosine: initially intended as an anticancer drug, it became the first oral treatment against leishmaniasis, but it is not exempt from problems as well. The therapeutic requirements for visceral leishmaniasis include an oral, safe, effective and low-cost treatment. Therefore, new approaches for treating leishmaniasis and other neglected diseases are urgently needed.

Histone deacetylases (HDAC) inhibitors have proved effective in the treatment of cancer and several molecules have been approved for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and they are showing promising activity in laboratory models of malaria. Histone-modifying enzymes, such as HDAC, are essential for the modulation of chromatin structure, thus indirectly regulating of gene expression in eukaryotic species. Their relevance seems even higher in trypanosomatid parasites, organisms that lack canonical transcription regulation.

On the other hand, interest in using natural products against parasitic diseases has raised. (-)- $\alpha$ -Bisabolol is monocyclic sesquiterpene widely used in cosmetic and dermatologic preparations that is found in many essential oils of traditional medicine plants such as *Matricaria chamomilla*, where this sesquiterpene is found in up to 50% concentrations. This natural compound has shown anti-inflammatory, anti-irritant and microbicidal activities and it has been successfully evaluated against *L. infantum* promastigotes.

In this scenario, the aim of this work was to put forward new treatment perspectives for leishmaniasis. In order to accomplish it, the objectives of the study were to screen new synthetic HDAC inhibitors and the natural compound (-)- $\alpha$ -bisabolol, to characterize HDAC enzymes in *Leishmania*, to get an insight into the mechanism of action of (-)- $\alpha$ -bisabolol, to evaluate *in vivo* the most active structures; and finally, to assess the potential effectiveness and safety of these molecules in a pilot clinical trial involving dogs with canine leishmaniasis (CanL) naturally acquired.

## I. Abstract

For *in vitro* evaluation, Bone marrow derived macrophages were infected with *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* or *L. major* promastigotes, or *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and incubated with the compounds at different concentrations. Pentamidine isethionate and meglumine antimoniate were used as reference drug controls. Inhibitory Concentration 50% (IC<sub>50</sub>) and Cytotoxic Concentration 50% (CC<sub>50</sub>) were calculated and the compounds were selected upon these parameters and their selectivity indices (SI). The mitochondrial activity of *Leishmania* was evaluated during the treatment with (-)- $\alpha$ -bisabolol, as well as its ability to induce nitric oxide synthesis in macrophages *in vitro*. HDAC enzymes were identified through bioinformatics analysis, they were tagged by creating HDAC-GFP fusion protein gene constructs and transfected with them. The localization of the enzyme was assessed through fluorescence microscopy. Balb/c mice were infected intraperitoneally with stationary-phase promastigotes. They were treated with MTC-305, MDG or (-)- $\alpha$ -bisabolol at different doses, meglumine antimoniate at 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg or a combination of each compound with meglumine antimoniate. The parasite loads in spleen and liver were evaluated through quantitative PCR (qPCR). For the pilot clinical trials, 22 dogs with naturally acquired CanL were selected upon clinical and parasitological eligibility criteria. With the consent of their owners, they were treated with MTC-305 (3.75 mg/kg subcutaneously) or (-)- $\alpha$ -bisabolol (30 mg/kg through oral route) and Glucantime® was used as a control reference drug (100 mg/kg subcutaneously). A combination of MTC-305 (1.5 mg/kg) and Glucantime® was also evaluated. Their clinical state was evaluated by calculating the clinical score, their immunological profile was evaluated through the determination of total IgG, IgG1 and IgG2 titres by IFAT and the quantitation of their cytokine expression level by reverse transcriptase qPCR. Parasite loads were evaluated in bone marrow, popliteal lymph node, peripheral blood and hair through qPCR. Efficacy criteria were established based on the ability of the treatment to decrease bone marrow, popliteal lymph node and peripheral blood parasite loads.

Among other synthetic compounds, (-)- $\alpha$ -bisabolol, MTC-305 and MDG proved to be innocuous to mammal cells and very active against intracellular amastigotes of *L. infantum* (IC<sub>50</sub> = 57, 3.2 and 0.7  $\mu$ M, respectively). They also proved to be active in an *in vivo* model of visceral leishmaniasis due to *L. infantum* as they reduced parasite load in spleen and liver by more than 70% and 80% respectively without showing toxicity. They were more effective than meglumine antimoniate at reducing spleen parasite load and at least as effective as this antimonial drug in the liver. The possibility of oral administration is an advantageous feature of (-)- $\alpha$ -bisabolol as well.

In the pilot clinical trial, MTC-305 was effective in the six dogs treated, reducing bone marrow parasite loads in at least 50% whereas meglumine antimoniate was effective in two out of the six dogs. Therefore, the treatment with MTC-305 was more effective than the reference treatment without showing relevant toxicity. The combination was effective in 5 out of 6 dogs, thus not improving MTC-305 treatment, and it did not cause relevant side effects on the dogs. (-)- $\alpha$ -bisabolol was effective in 3 out of 4 dogs and improved their Th1 response by enhancing their gamma interferon expression levels throughout the treatment without showing relevant safety issues, therefore being at least as effective as the current standard.

One HDAC enzyme could be characterized in *L. mexicana*: it turned out to be associated with mitochondria, as it showed a mitochondrial distribution pattern in the promastigote stage.

For the first time, a set of HDAC inhibitors have been evaluated in a laboratory model of visceral leishmaniasis due to *L. infantum* with promising results that were confirmed in a pilot clinical trial in dogs with naturally acquired canine leishmaniasis. (-)- $\alpha$ -bisabolol showed outstanding results in the laboratory model of visceral leishmaniasis as well and they were also assessed in the pilot clinical trial, which revealed an immunostimulatory effect. Its oral bioavailability is a crucial advantage in the treatment of this disease

## I. Abstract

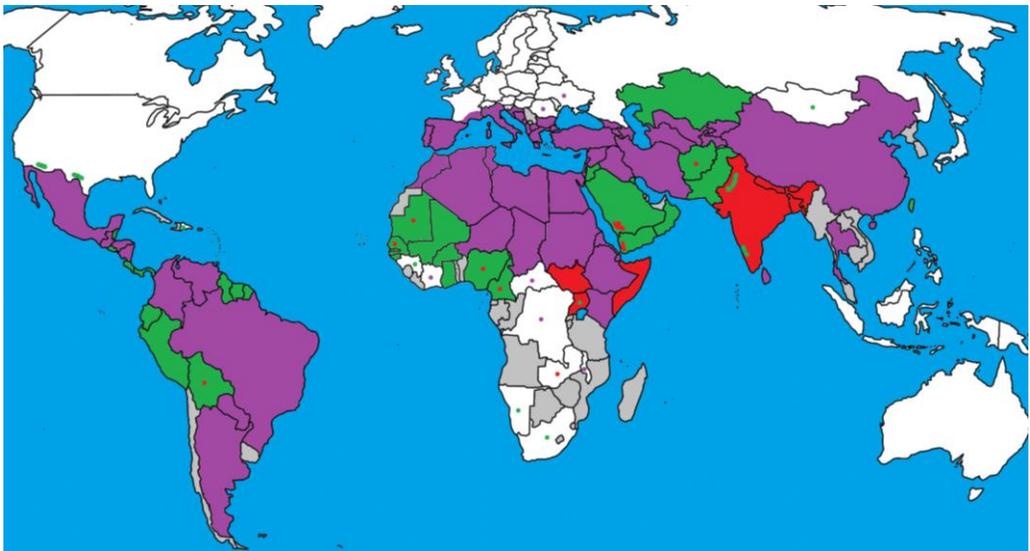
## **II. Introducción**

## II. Introducción

### 1. Leishmaniosis: Concepto y generalidades

Las leishmaniosis es una parasitosis causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*. Existen más de veinte especies conocidas capaces de infectar al ser humano a través de la picadura de su vector, el flebotomo. Hay tres formas clínicas principales: la leishmaniosis visceral (también conocida como kala-azar), la más peligrosa y mortal si no se trata; la leishmaniosis cutánea; y la leishmaniosis cutáneo-mucosa (O.M.S., 2010).

Se trata de una enfermedad ampliamente extendida en zonas de clima cálido y templado del planeta, representando un importante problema de salud pública. Aunque la infección y enfermedad se puede presentar en cualquier individuo, afecta principalmente a grupos en situación de pobreza y se asocia con la malnutrición, precariedad de la vivienda, debilidad en el sistema inmune y falta de recursos. La mayoría de los casos se presentan en países pobres de África, Asia y Latinoamérica.

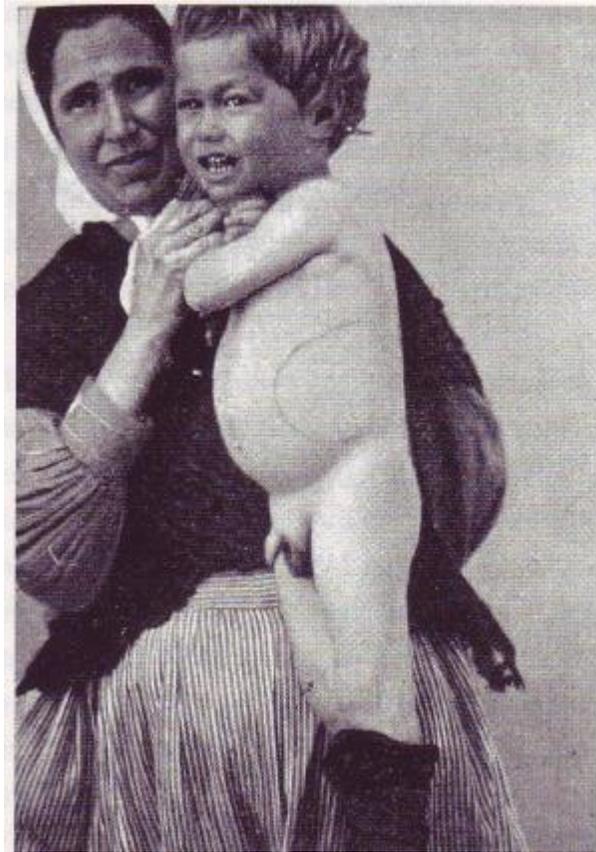


**Figura 1.** Distribución de las leishmaniosis en el mundo de acuerdo a Alvar et al., 2012. Los países coloreados de rojo denotan presencia de leishmaniosis visceral, el color verde indica presencia de leishmaniosis cutánea o mucosa y el color morado indica la presencia de ambas. Los puntos de color denotan presencia demostrada del parásito o de casos aislados de la enfermedad. El color blanco denota ausencia de enfermedad y el gris ausencia de datos.

Recientemente se estimó en más de 98 los países endémicos de leishmaniosis, con una incidencia aproximada de 0,2-0,4 millones de casos de leishmaniosis visceral y 0,7-1,2 millones de casos de leishmaniosis cutánea o cutáneo-mucosa, con una población en riesgo de 350 millones de personas. Más del 90% de los casos se

## II. Introducción

producen en sólo seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, la India, Sudán y Sudán del Sur. En el caso de la leishmaniosis visceral causada por *L. infantum*, la incidencia anual está estimada en 4500-6800 casos en la región americana, ocurriendo el 93% de ellos en Brasil. Además, es el agente causal de los 1200-2000 casos de leishmaniosis visceral en la Cuenca Mediterránea y de los 5.000-10.000 casos descritos en Oriente Medio (Alvar et al., 2012).



**Figura 2. Primer caso de leishmaniosis visceral en España. Tomado de Fidel Fernández Martínez et al. Tratado Iberoamericano de Medicina Interna. Volumen I (1922).**

La leishmaniosis es una enfermedad hipoendémica en España (0,41 casos por 100.000 habitantes) y es causada por *Leishmania infantum*, única especie presente en España y agente causal de leishmaniosis visceral, cutánea y cutáneo-mucosa (Aliaga et al., 2003; Cobo et al., 2007; Faucher et al., 2011) para la que se ha encontrado una gran variabilidad isoenzimática en nuestro país (Martin-Sanchez et al., 2004). Esta especie es además la que tiene una mayor distribución mundial y la única presente en el Viejo Mundo y el Nuevo Mundo (junto con *L. martiniquensis*, (Pothirat et al., 2014)), donde algunos autores prefieren

denominarla *L. chagasi*. Este tema es polémico pues para otros autores se trata de la misma especie (*L. infantum*) que fue introducida durante la colonización de América (Killick-Kendrick et al., 1980; Leblois et al., 2011).

En nuestro país, la leishmaniosis ha sido una enfermedad de declaración obligatoria desde 1982, pero a partir de 1996 se estableció un nuevo sistema de vigilancia que se basa en un procedimiento de notificación regional para proceder al registro total de los casos en el último mes de cada año. Gracias al análisis de estos datos se sabe que se trata de una enfermedad con tendencia creciente (Herrador et al., 2015) que afecta a casi la totalidad de las Comunidades Autónomas, pero especialmente a toda la zona mediterránea y a la Meseta Central. No obstante, es importante enfatizar el hecho de que los casos declarados anualmente se sitúan muy por debajo de los casos reales, estimándose que sólo se registran entre el 25-40% de leishmaniosis viscerales y casi la totalidad de los casos de leishmaniosis cutáneas no están registrados (Alvar et al., 2012, 1997).

La infección por *L. infantum* afecta a individuos de todas las edades y condiciones en España, aunque las manifestaciones clínicas se dan principalmente en niños y personas inmunodeprimidas. Es este segundo grupo el elemento determinante del aumento que experimentó la enfermedad en las décadas de los 80 y 90 tanto en Europa como en Sudamérica, siendo consecuencia de fenómenos de coinfección entre el parásito y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). A partir de la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad a mediados de los 90, en el ámbito nacional se ha venido observando un notorio cambio en la situación epidemiológica de la enfermedad con reducción notable de los casos de coinfección (de La Rosa et al., 2002; Pintado and López-Vélez, 2001). En concreto, en España y sur de Europa hubo un pico de incidencia de los casos de coinfección entre 1996 y 1998, mientras que entre 1998 y 2001 la incidencia de coinfecciones descendió hasta niveles que se han mantenido hasta 2006 (Alvar et al., 2008). Curiosamente la situación no mejoró en Portugal, donde en el periodo comprendido entre los años 2000 y 2009, aparecieron 107 casos de coinfección del total de 173 casos de leishmaniosis visceral diagnosticados (Campino y Maia, 2010).

## II. Introducción



**Figura 3. Primer caso de leishmaniosis cutánea (botón de Oriente) en España. Tomado de Fidel Fernández Martínez et al. Tratado Iberoamericano de Medicina Interna. Volumen I (1922).**

La leishmaniosis por *L. infantum* es una zoonosis en la que el perro (*Canis lupus familiaris*) es el principal hospedador reservorio, que sufre la enfermedad en forma de un síndrome con afectación visceral, cutánea y mucosa (Alvar et al., 2004), conocido como leishmaniosis canina.

El reservorio es el principal agente mantenedor del parásito durante aquellos periodos en los que la persistencia de dicho parásito se ha visto comprometida, ya sea por el desarrollo de programas de control mediados por los organismos pertinentes o como resultado indirecto de la actuación del hombre sobre el medio con fines sanitarios o agrícolas, como la introducción del DDT y otros insecticidas implicados en la lucha contra la malaria (Ashford, 2000).

Según los estudios realizados en nuestro país sobre sero-prevalencia de leishmaniosis canina se deducen valores medios de entre el 10 y el 20%, variando de forma notable de unas regiones a otras. Así, en la provincia de Granada, en el piso bioclimático Meso-Mediterráneo la sero-prevalencia canina es del 20,1%, del 13,3% en la zona termo-mediterránea y del 1,1% en la zona supra-mediterránea (Martín-Sánchez et al., 2009). En la Axarquía malagueña (Morillas et al. 1996) la

seroprevalencia canina es del 34,7%. En otros puntos de España sucede de forma similar (Fisa et al., 1999).

También se han descrito otros hospedadores domésticos como son los mulos, caballos y gatos (Gállego, 2004; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2003). Entre los animales salvajes citados como hospedadores secundarios de *L. infantum* podemos destacar los lobos (*Canis lupus*), zorros (*Vulpes vulpes*), ginetas (*Genetta genetta*) y chacales (*Canis aureus*) entre otros (Quinnell and Courtenay, 2009). Los roedores salvajes constituyen una enorme biomasa de posibles reservorios de *L. infantum* dado que son abundantes, ampliamente distribuidos en Europa y con una esperanza de vida suficiente para que el parásito sobreviva al periodo de baja actividad del vector. Su hábitat es perfectamente compatible con el del flebotomo, que se alimenta de ellos. Algunos roedores salvajes han sido señalados como posibles reservorios de *L. infantum* de entre los que se puede destacar la rata negra (*Rattus rattus*), el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) y el ratón doméstico (*Mus musculus*), especies en las que se detectó el parásito en un 27% de ellos en una variedad de tejidos (desde la piel hasta la médula ósea), lo que revela que su papel podría ser más relevante que el que se les atribuye (Navea-Pérez et al., 2015). El conejo salvaje (*Oryctolagus cuniculus*), una especie abundante y gregaria en nuestro país, también se ha encontrado infectado en elevadas proporciones en el sudeste de España (20,7%) (Díaz-Sáez et al., 2014). Se ha detectado el parásito en distintos órganos y tejidos, incluido piel y sangre, sin mostrar signos de enfermedad, consiguiéndose aislar *L. infantum* en su médula ósea. Tanto el conejo salvaje como la liebre cumplen todos los requisitos para ser considerados reservorios de *L. infantum* (Díaz-Sáez et al., 2014; Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012) y sus características ecológicas (hábitat, esperanza de vida y abundancia) los convierten en una pieza clave en la epidemiología de la enfermedad. Estos últimos hechos apuntan a que el clásico ciclo epidemiológico perro-flebotomo-humano es en realidad un entramado de animales que colaboran con el perro en el mantenimiento del parásito.

Entre los años 2009-2012, se produjo un brote epidémico de leishmaniosis en la Comunidad de Madrid, pasando de 12-25 casos anuales entre los años 2000-2009 a registrar 542 casos (36% de ellos de leishmaniosis visceral) entre julio de 2009 y diciembre de 2012 (Arce et al., 2013), la mayoría en una zona urbana del sur de la región. Tras realizar estudios entomológicos, se encontró una elevada densidad media de 144 flebotomos por metro cuadrado (contando en algunas estaciones más de 1000 flebotomos por metro cuadrado), mientras que en los perros se

## II. Introducción

encontró una seroprevalencia del 1,6% en perros del entorno al realizar muestreos aleatorios. La baja prevalencia de la enfermedad en el perro, llevó al estudio de otros posibles reservorios, encontrando elevados porcentajes de infección en las liebres (*Lepus granatensis*) y conejos del entorno (Carrillo et al., 2013), señalándolos como responsables del foco de leishmaniosis en la zona.

Aunque como se ha mencionado, el ciclo natural de *Leishmania infantum* es una zoonosis, se señaló la posibilidad de un ciclo antroponótico asociado a casos de coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana "VIH" (Alvar and Jiménez, 1994; Alvar et al., 1989; Molina et al., 2003). En personas drogodependientes coinfectadas por VIH, el papel vectorial del flebotomo parece haberse sustituido por las jeringuillas (Alvar and Jiménez, 1994; Pineda et al., 2002, 2001).

La leishmaniosis se considera emergente en Europa, ya que la enfermedad se ha extendido hacia el norte, encontrándose en Alemania once casos autóctonos confirmados de leishmaniosis visceral (Naucke et al., 2008) y la aparición de un brote de leishmaniosis el norte de Italia (Varani et al., 2013). En los países europeos mediterráneos se registra una incidencia de 630-850 casos de leishmaniosis visceral anuales (Alvar et al., 2012).

### **1.1. Clasificación taxonómica**

El Orden Kinetoplástida se caracteriza por ser un grupo de protozoos parásitos uninucleados que presentan una mitocondria única que ocupa gran parte de la estructura celular y en cuyo interior se observa el ADN mitocondrial enrollado, conocido como kinetoplasto. Presentan división por fisión binaria longitudinal aunque se admite la existencia en el género de reproducción sexual y la existencia de híbridos (Akopyants et al., 2009; Rogers et al., 2014; Rougeron et al., 2010).

La clasificación propuesta por Adl et al. en 2005 actualizando la clasificación de Levine et al. 1980. En esta clasificación, se divide a los organismos eucariotas (Dominio Eukarya) en 6 clados: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata. El filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1998) estaría incluido en este último y a su vez incluiría a la clase Kinetoplastea. Este clado incluiría a los clados Prokinetoplastina y Metakinetoplastina. En este último se incluyen los órdenes Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida y Trypanosomatida. El orden Trypanosomatida (donde se encontraría la familia *Trypanosomatidae*) abarca los géneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*,

*Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Sauroleishmania*, *Trypanosoma* y *Wallaceina*.

Por otro lado, Kraeva et al. en 2015 consideran una división entre géneros con especies monoxénicas, donde incluyen a *Anfomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Kerotomonas*, *Leptomonas*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas* y *Wallacemonas* (obviando *Wallaceina* y *Rhynchoidomonas*); y géneros con especies dixénicas, que incluye a *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Phytomonas* (no considerando a *Sauroleishmania*). También cabe decir que Jirků et al., en 2012 propusieron la subfamilia *Leishmaniinae* en la que incluyen los géneros *Leishmania*, *Crithidia* y *Wallaceina*, así como algunas especies de *Leptomonas*. Como ejemplo de la complejidad del tema cabe destacar que estos autores consideran *Wallaceina* mientras que Kraeva et al. en 2015 consideran el género *Wallacemonas*, firmando algunos de los autores ambos artículos. Por último Votýpka et al., en 2015, incluyen en la subfamilia *Leishmaniinae* los géneros *Leishmania*, *Leptomonas*, *Lotmaria* y *Crithidia*, basándose en análisis de secuencias de la subunidad pequeña del ARN ribosómico.

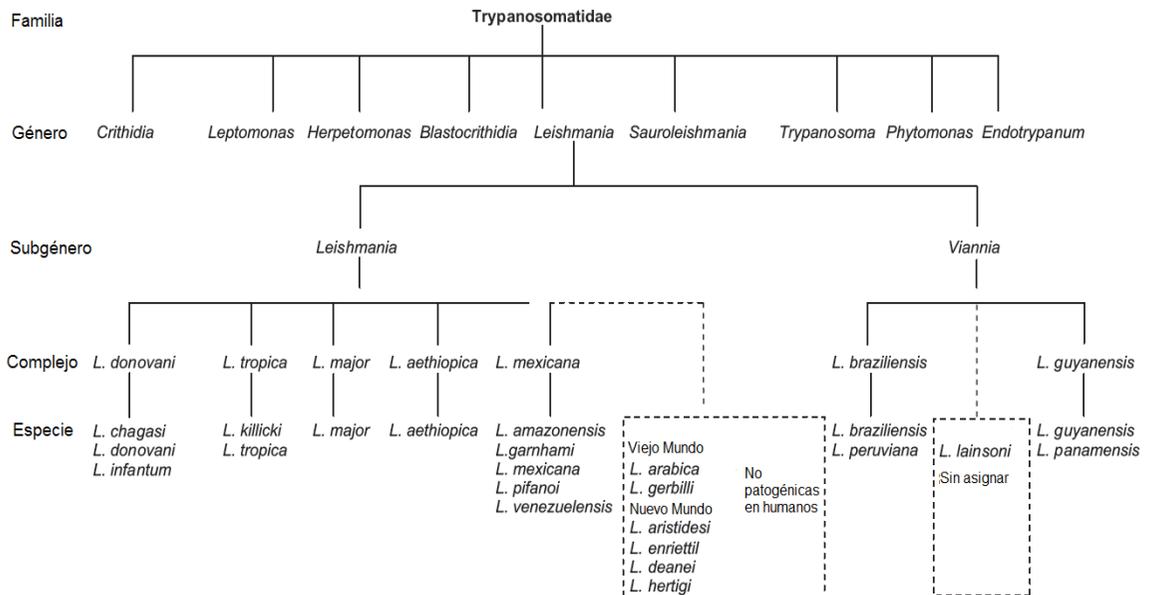
Es importante señalar que se han aislado flagelados de los géneros *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas* y *Leptomonas* en casos clínicos en humanos (Kraeva et al., 2015; Singh et al., 2013), algunos en co-infección con *L. donovani*.

Dominio Eukarya	
Excavata	
Euglenozoa	
Clase	Kinetoplastea
Metakinetoplastina	
Orden	Trypanosomatida
Género	<i>Leishmania</i>

**Figura 4.** Encuadramiento taxonómico de *Leishmania* de acuerdo con la clasificación de Adl et al (2005).

Se han descrito una veintena de especies de *Leishmania* divididas en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, como se puede observar en la figura 5 y en la tabla 1. Esta división se basa en el lugar del tracto digestivo del vector donde se multiplica, siendo éste el intestino medio en el caso de *Leishmania* y el intestino posterior en el de *Viannia*.

## II. Introducción



**Figura 5. Familia Trypanosomatidae. División de géneros de la familia y subgéneros de Leishmania con sus correspondientes especies (OMS, 2010).**

Subgénero	L. ( <i>Leishmania</i> )	L. ( <i>Leishmania</i> )	L. ( <i>Viannia</i> )	L. ( <i>Viannia</i> )
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naïffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo principal	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

**Tabla 1. Especies de Leishmania encontradas en humanos (OMS, 2010).**

Los parásitos del subgénero *Leishmania* se encuentran en el Viejo y el Nuevo Mundo mientras que los del subgénero *Viannia* se encuentran solo en el Nuevo Mundo (Tabla 1). Recientemente se han descrito las especies *L. martiniquensis*, *L. siamensis* y *L. waltoni* (Leelayoova et al., 2013; Pothirat et al., 2014; Shaw et al., 2015).

## 1.2. Morfología

Son parásitos plesiomórficos que muestran dos formas claramente definidas en su ciclo biológico conocidas como amastigotes y promastigotes.

**Formas promastigotes:** Se trata de la fase que se encuentra en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (flebotomo hembra). Presentan un cuerpo fusiforme de 15-20  $\mu\text{m}$  de longitud y 3-5  $\mu\text{m}$  de ancho del que parte un flagelo que puede alcanzar una longitud de 20  $\mu\text{m}$ . Es la forma que se encuentra en los medios habituales de cultivo. Principalmente se distinguen dos formas de promastigotes: el promastigote procíclico y el promastigote metacíclico. El promastigote procíclico tiene poca o ninguna capacidad infectiva mientras que el metacíclico es la forma infectiva por excelencia. Entre ellos existen diferencias estructurales, especialmente en la cantidad y tamaño de las glicoproteínas de superficie y otras de carácter metabólico. El promastigote procíclico se transforma en metacíclico mediante división durante aproximadamente diez días después de entrar en el vector; en esta última forma no es capaz de dividirse. En la transformación de procíclico a metacíclico algunos autores también consideran las formas haptomonadas y nectomonadas (Dostálová and Volf, 2012).

**Formas amastigotes:** Esta fase está presente en el hospedador vertebrado y es una fase intracelular obligada que parasita a las células del sistema fagocítico mononuclear, con frecuencia macrófagos. Al microscopio óptico se nos muestran como formas más o menos redondeadas con tendencia elipsoide y carentes de flagelo. Son más pequeñas que los promastigotes presentando en torno a los 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y en su interior se observa el núcleo y el kinetoplasto, tiñéndose este segundo más intensamente.

## II. Introducción

### 1.3. Ciclo biológico

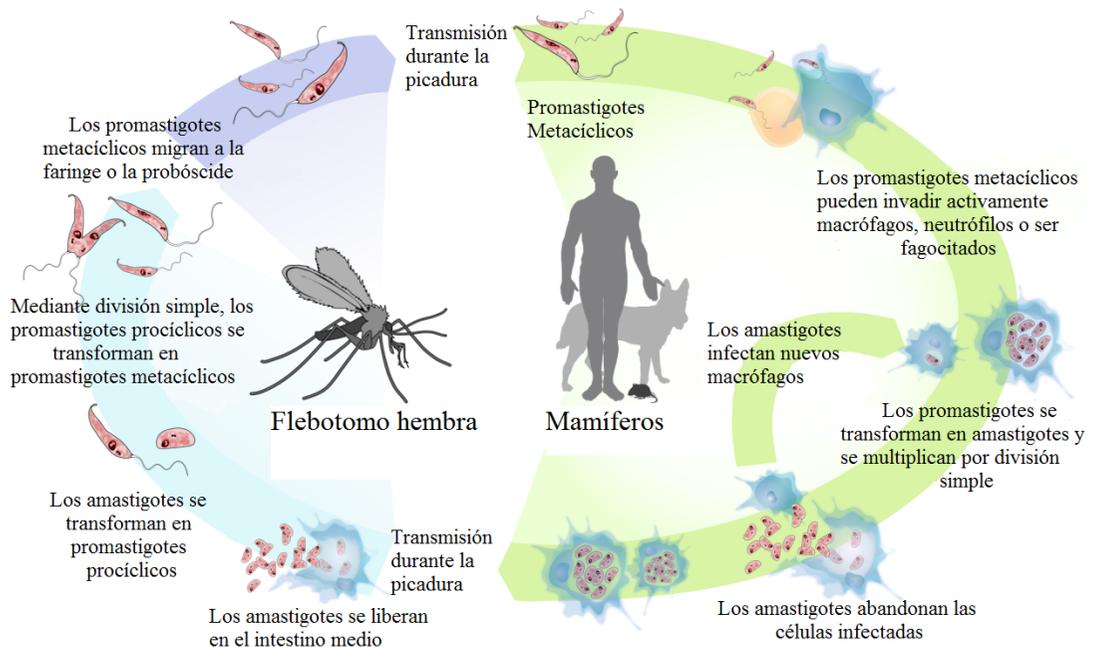


Figura 6. Ciclo biológico de *Leishmania* (imagen libre)

Presentan un ciclo de vida heteroxeno (más de un hospedador) implicando un hospedador vertebrado y otro invertebrado que cumple a su vez la función de vector.

El hospedador invertebrado es un artrópodo perteneciente a la familia Phlebotomidae (flebotomos) cuya hembra ingurgita la sangre del hospedador vertebrado conteniendo los macrófagos donde reside el parásito en su forma amastigote; una vez en el tubo digestivo del flebotomo el protozoo sale del macrófago para transformarse en promastigote, adherirse al intestino del vector y multiplicarse activamente. Posteriormente, y después de pasar por una serie de estadios intermedios dan lugar a la forma infecciosa conocida como promastigote metacíclico. Ésta se sitúa en la región anterior del intestino (valva estomodeal), faringe y probóscide del vector. El parásito pasa al hospedador vertebrado cuando le pica el flebótomo.

En el hospedador vertebrado, en función de la especie de *Leishmania* puede ser un cánido, roedor, el hombre, etc, el parásito es capturado por los macrófagos de la dermis. Una vez dentro lo engloban en una vacuola parasitófora, donde pasa a su forma amastigote y sufre una serie de divisiones hasta que el macrófago estalla

y salen al exterior para ser nuevamente fagocitados. Algunos autores hacen alusión a un proceso exocítico que implica la formación de pequeñas vacuolas que se fusionan a la superficie de dicho macrófago; estos amastigotes son liberados al torrente sanguíneo y son fagocitados por macrófagos u otras células del sistema fagocítico mononuclear abundantes en órganos como hígado, bazo o médula ósea (Rittig and Bogdan, 2000).

#### **1.4. Formas clínicas de la Leishmaniosis**

Las distintas formas de leishmaniosis se caracterizan por una elevada variabilidad clínica intraespecífica. Las diferentes especies de *Leishmania*, dentro de su tropismo y su espectro de enfermedades, producen manifestaciones clínicas diversas, con síntomas y signos en su mayoría no patognomónicos. Dicha diversidad no está completamente explicada por la diversidad genética del parásito y la patogenicidad también depende de las poblaciones humanas, cuya respuesta inmunológica, que es crucial, da lugar a las distintas formas de leishmaniosis. Un claro ejemplo de esta diversidad es la especie *L. infantum*, agente causal de leishmaniosis cutánea, cutáneo-mucosa y visceral.

A continuación se describen las principales características de las diversas formas clínicas de la leishmaniosis (OMS, 2010).

**Leishmaniosis cutánea:** Sus manifestaciones clínicas presentan una gran variabilidad entre las regiones donde es endémica y dentro de la misma región. Esta variabilidad depende de la especie del parásito y del sistema inmunológico del hospedador. La lesión típica empieza en el lugar de inoculación del parásito en forma de pápula o nódulo que aumenta hasta alcanzar un tamaño máximo. En la zona central aparece una costra que finalmente se desprende dando lugar a las lesiones ulcerosas de varios centímetros de diámetro, con un borde elevado e induración periulcerosa. Dependiendo de la especie implicada, esta lesión puede curar durante los siguientes meses dejando una cicatriz de tamaño y aspecto variables. Alrededor de la lesión principal pueden aparecer nódulos satélite. Las lesiones suelen aparecer en zonas descubiertas del cuerpo como cara, antebrazo y piernas.

En Europa, el principal agente causal es *L. infantum*, que suele producir lesiones de gran variabilidad clínica (lesiones ulcerosas, papulares, maculares o nodulares) (Giavedoni et al., 2015). En Grecia está presente *L. tropica* (agente causal de la leishmaniosis cutánea antroponótica), que cursa con lesiones ulceradas,

## II. Introducción

inflamadas y múltiples que confluyen y dejan cicatrices desfigurantes. *L. major* causa la leishmaniosis cutánea zoonótica, que provoca úlceras secas, múltiples y autocurativas. Por último, *L. aethiopica* causa la leishmaniosis cutánea difusa, que cursa con pápulas, nódulos o placas cutáneas muy diseminadas, sin ulceración (OMS, 2010).

**Leishmaniosis cutáneo-mucosa o mucosa estricta:** Principalmente causada por *L. braziliensis*, puede considerarse una extensión de la lesión cutánea inicial hacia las mucosas a través de los vasos linfáticos o sanguíneos (McGwire and Satoskar, 2014). Es muy desfigurante debido a la destrucción local del tejido en nariz, boca y nasofaringe, llegando a dificultar la respiración y hasta la alimentación. *Leishmania infantum* también ha sido identificada como agente causal de esta forma de leishmaniosis (Aliaga et al., 2003; Faucher et al., 2011).

**Leishmaniosis visceral o kala-azar:** Esta forma de leishmaniosis, causada por *L. infantum* y *L. donovani*, resulta de la infección por el parásito de las células del sistema fagocítico mononuclear del hígado, bazo y médula ósea, provocando hepatomegalia, esplenomegalia y alteración de la médula ósea que conduce a pancitopenia. Además cursa con otros síntomas como fiebre alta, irregular y persistente, oscurecimiento de la piel (de ahí su nombre, Kala-azar o muerte negra), alteración de la fracción albúmina/globulinas, anorexia, astenia, desgafez progresiva y muerte.

Esta forma de leishmaniosis se presenta en individuos de todas las edades, pero circunstancias como la malnutrición o la inmunosupresión predisponen a la enfermedad. Está causada por *L. infantum* (zoonótica) y por *L. donovani* (antroponótica).

La leishmaniosis visceral se asocia a respuestas inmunitarias mixtas con predominio Th2 y el progreso de la enfermedad viene determinado por bajos niveles de interferón- $\gamma$  y otras interleuquinas como IL-12, IL-2 o IL-17 (Kip et al., 2015). Una característica de la leishmaniosis visceral es la hiperglobulinemia debida a IgG policlonal.

**Leishmaniosis dérmica post-kala azar:** Consiste en la aparición de lesiones cutáneas entre 6 meses y un año tras la aparente curación de la leishmaniosis visceral debida a *L. donovani*. Las lesiones que aparecen son máculas que pueden volverse papulares, nodulares o infiltrativas. Hay muchas incógnitas alrededor de esta forma de leishmaniosis y se baraja la influencia del tratamiento así como de factores genéticos del parásito o el hospedador (Mukhopadhyay et al., 2014).

**Leishmaniosis asociada a inmunodepresión:** No se trata de una forma de leishmaniosis, pero es importante señalar que en las personas inmunodeprimidas, además de mostrar una mayor susceptibilidad a la enfermedad, ésta adquiere manifestaciones clínicas más variables, apareciendo lesiones en zonas atípicas como los pulmones, por ejemplo, mientras que otros síntomas como la esplenomegalia suelen ser menos frecuentes (Monge-Maillo et al., 2014). También es de destacar que la leishmaniosis visceral reduce la eficacia de la terapia antirretroviral en pacientes con VIH (López-Vélez, 2003). Aunque en a leishmaniosis asociada a inmunodepresión se suele destacar el papel de la co-infección con VIH, no hay que olvidar a personas inmunodeprimidas por otras causas como el tratamiento de enfermedades autoinmunes, trasplantes de órganos (van Griensven et al., 2014) cuya relevancia epidemiológica es elevada y a la que según algunos autores debería de prestarse más atención (Herrador et al., 2015; Ramos et al., 2015).

### **1.5. El Vector**

Las especies de *Leishmania* son transmitidas por dípteros nematóceros pertenecientes a la familia Phlebotomidae (flebotomos), al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Con respecto a la familia Phlebotomidae, la mayoría de los autores le dan un rango de subfamilia (Phlebotominae) que estaría dentro de la familia Psychodidae. Del total de las aproximadamente 700 especies conocidas, sólo en unas 60 se ha demostrado este papel vectorial (Gil Collado et al., 1989.; Ready, 2010).

Los flebotomos son dípteros pequeños (2-3 mm) de cuerpo giboso y cubierto de pelos, alas lanceoladas que forman ángulo de 45° con el cuerpo y con nerviación longitudinal característica, de constitución frágil y vuelo a saltos. En la cabeza es importante destacar una probóscide muy desarrollada como aparato picador-chupador, y que en las antenas no aparece el dimorfismo sexual referente a la longitud de los pelos que aparecen en otros nematóceros de importancia sanitaria, como Culicidae y Ceratopogonidae.

Presentan un tórax robusto y giboso en el que se insertan las alas y unos elementos a modo de pequeñas alas denominados halterios que utilizan para equilibrar el vuelo. De cada segmento del tórax salen un par de patas. En la parte posterior se observa un abdomen segmentado en diez partes, de las cuales las tres últimas se corresponden con la genitalia (estructuras genitales), muy desarrollada en los machos.

## II. Introducción

Tanto machos como hembras se alimentan de zumos vegetales y savia, pero las hembras además son obligatoriamente (y salvo excepciones) hematófagas, y responsables, por tanto, del papel vectorial de *Leishmania* y otros agentes infecciosos.

Son insectos de hábitos nocturnos y crepusculares que tienden a salir con el crepúsculo hasta pasada la media noche; suelen encontrarse en regiones donde la temperatura diurna es superior a 15,6 °C durante al menos tres meses al año y a altitudes que oscilan entre el nivel del mar y los 1.500 metros e incluso más (Lane, 1993). La ovoposición tiene lugar sobre un soporte sólido de origen vegetal o animal, en lugares oscuros, de humedad relativa elevada y temperatura constante tales como huecos de árboles, agujeros de muros o casas abandonadas, leñeras o vertederos. Esta puesta de huevos se da en torno a los 3-7 días de la ingesta de sangre y el número oscila entre 30-70 unidades, siendo la media de 50.

En España los vectores principales son las hembras de *Phlebotomus perniciosus* en zonas áridas y semiáridas mientras que *P. ariasi* lo sería principalmente en zonas más húmedas (Gil-Collado et al., 1989; Morillas-Márquez et al., 1995).

La especie *P. longicuspis* se ha citado como vector de *L. infantum* en el Norte de África, pero su presencia en España está en entredicho (Collantes y Ortega, 1997; Morillas Márquez et al., 1991).

Otras especies que tienen notable importancia en España son *P. papatasi* (subgénero *Phlebotomus*) y *P. sergenti* (subgénero *Paraphlebotomus*), que representan entre el 5-10% de las capturas en algunos lugares. Estas especies transmiten *L. major* y *L. tropica* respectivamente, especies que hasta ahora no se han descrito como autóctonas en nuestro país. Otro vector de *L. infantum*, *P. langeroni* se encuentra también en nuestro país con una distribución muy limitada (Martinez Ortega et al., 1996).

El mapa de distribución de las especies de flebotomos existentes en España se completa como sigue (Gil-Collado et al., 1989; Morales Yuste, 2012): *P. mascitti*, que sólo se ha descrito en Cataluña, pero en escaso número. Esta especie también existe en Francia, Bélgica y Alemania. En las Islas Canarias se encuentran *P. fortunatarum* (exclusivo de las islas) y en escaso número, *Sergentomya fallax* presente también en el Norte de África. Por último, *S. minuta* es la especie más ubicua y abundante en toda España cuando se hacen capturas con trampas adhesivas sin embargo es herpetófila (las hembras se alimentan de la sangre de reptiles).

## **2. Diagnóstico de la leishmaniosis**

### **2.1. Diagnóstico de la leishmaniosis visceral**

Los signos y síntomas de leishmaniosis son insuficientes para diagnosticar la enfermedad y diferenciarla de otras infecciones sistémicas. Se debe sospechar de pacientes con fiebre irregular y esplenomegalia en zonas endémicas o de retorno de éstas. Signos y síntomas como anemia, leucopenia, trombocitopenia o hipergammaglobulinemia refuerzan el diagnóstico, pero es necesario recurrir a pruebas de laboratorio específicas (OMS, 2010). Un test diagnóstico ideal debe ser sensible, específico, reproducible y capaz de diferenciar entre individuos asintomáticos y enfermos con el fin de discriminar cuándo el tratamiento es necesario (Chappuis et al., 2007).

**Diagnóstico parasitológico:** La **observación microscópica** del parásito en los aspirados esplénicos, medulares o ganglionares es la prueba clásica, de alta especificidad pero sensibilidad variable dependiendo del tejido (53-99%) y de la especialización del analista. En la leishmaniosis visceral se suele realizar punción esplénica o aspirado de médula ósea del esternón o cresta ilíaca (niños); este segundo es el método que más se usa por ser más fácil de realizar y seguro.

El **cultivo del parásito** de estas muestras aumenta la sensibilidad diagnóstica, aunque el resultado puede necesitar de un mes. Los medios bifásicos NNN (Novy, Nicolle y McNeal) y EMTM (Evans Modified Tobie Medium) son los más utilizados para el aislamiento del parásito. También se pueden utilizar medios líquidos, donde el suero bovino fetal se ha sustituido parcialmente por algunos autores por orina humana estéril al 1-2%, dando buenos resultados para *L. infantum* (Tasew et al., 2009). Finalmente se suelen suplementar con antimicrobianos y/o antifúngicos. La temperatura de cultivo suele situarse en torno a 23-26 °C. Estos cultivos no se deben rechazar hasta pasados 2-3 meses de seguimiento.

**Diagnóstico molecular:** El diagnóstico mediante PCR detecta el ADN del parásito, mejorando considerablemente la sensibilidad. En los últimos años se han desarrollado un gran número de técnicas de PCR convencional, Nested-PCR y PCR en tiempo real basadas en la detección de variabilidad de genes o regiones genómicas distintas que ofrecen distintas sensibilidades y especificidades. Todas estas técnicas se pueden aplicar en una gran variedad de muestras, no solo las clásicas (sangre, punción esplénica, aspirado medular o aspirado de ganglio) sino

## II. Introducción

también en otras como orina (Silva et al. 2014) o raspado bucal (Vaish and Mehrotra, 2011), que resultan mucho menos invasivas.

Las técnicas basadas en PCR en tiempo real son más rápidas a la hora de dar un resultado pero son más caras y requieren equipamiento complejo; sin embargo éstas aportan un valor añadido a la hora de cuantificar el ADN del parásito para el seguimiento de la enfermedad durante el tratamiento (Sudarshan et al., 2011, Sudarshan and Sundar, 2014; Sudarshan et al., 2014).

Las técnicas basadas en **LAMP** (Loop-Mediated Isothermal Amplification) se presentan como una alternativa muy prometedora a las basadas en PCR por varias razones (Mori y Notomi 2009): son adaptables al trabajo de campo ya que no necesitan ciclos de temperatura, solo una temperatura estable y los reactivos son termoestables; su detección se basa en la turbidez de la muestra, facilitando la obtención del resultado. Por tanto se presentan como pruebas fáciles, robustas, rápidas y sobretodo económicas. Se ha mostrado prometedor en este sentido, permitiendo la detección de ADN de *Plasmodium falciparum* en muestras de sangre hervidas (Poon et al., 2006) y recientemente en la leishmaniosis visceral y en PKDL (Verma et al. en 2013, Khan et al., 2012).

**Diagnóstico serológico:** La detección de anticuerpos mediante pruebas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI o IFAT), ELISA, Dot-ELISA, el test de aglutinación directa (DAT), el inmunoblotting ó Western blot (WB) muestran buenas sensibilidades y especificidades diagnósticas, siendo la IFI la técnica considerada de referencia (OMS, 2010). También está disponible la prueba FAST (Fast Agglutination Screening Test) en muestras de suero (Boelaert et al., 2014).

Los inconvenientes de estas técnicas es que pueden aparecer reacciones cruzadas con otras parasitosis (tripanosomiasis, paludismo) o enfermedades autoinmunes o linfoproliferativas. Además los anticuerpos permanecen en niveles detectables durante mucho tiempo en el organismo, dificultando el diagnóstico de las recaídas.

**Inmunocromatografía basada en el antígeno rK39:** Las pruebas basadas en el antígeno rK39 son fáciles de realizar, rápidas (15-20 minutos), baratas (1\$ por prueba) y reproducibles, pudiéndose usar en el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en etapas tempranas. Es la prueba de primera línea ante la sospecha de la enfermedad en países en desarrollo endémicos, que se debe combinar con

pruebas serológicas o parasitológicas adicionales en zonas donde su sensibilidad sea inferior al 90% (OMS, 2010).

**Pruebas de detección de antígenos:** La prueba de aglutinación de látex (Sundar et al., 2005) muestra una elevada especificidad pero una sensibilidad moderada (48-87%) en el subcontinente indio y en África Oriental. Tiene la ventaja de que su resultado se corresponde con la mejora de la enfermedad cuando se trata y la desventaja de que es difícil distinguir entre negativos y positivos débiles, afectando a la reproducibilidad de la técnica (Chappuis et al., 2007). La prueba KAtex tiene la ventaja de poder usarse en muestras de orina (Boelaert et al., 2014).

**Intrademorreacción de Montenegro:** Es el método clásico de detección de la inmunidad celular, aunque tiene más utilidad en la leishmaniosis cutánea. En zonas endémicas (Paiva-cavalcanti et al., 2015) suele obtenerse resultado positivo por la elevada tasa de infecciones subclínicas. Consiste en la inoculación de leishmanina de forma intradérmica y la aparición de una induración debida a la respuesta celular.

## **2.2. Diagnóstico de la leishmaniosis cutánea y cutáneo-mucosa**

Dada la su similitud a otras enfermedades cutáneas, es necesaria su confirmación diagnóstica y recomendable llegar hasta la especie causante.

El diagnóstico parasitológico es la norma de referencia en estas formas de la enfermedad: En la leishmaniosis cutánea las muestras se toman del exudado del borde de la lesión cutánea, pero no del centro porque puede estar infectado secundariamente y porque contiene menos parásitos. Se pueden realizar raspados o cortes para tomar la porción serosa de la lesión. Otros métodos son aspirados con jeringa de insulina (sin aguja) con solución de suero fisiológico, o mediante biopsia; en este último caso tiene la ventaja de obtener mayor cantidad de muestra, aunque la desventaja de ser un método más invasivo. En la leishmaniosis cutáneo-mucosa el examen microscópico o el cultivo son de poca utilidad debido a la poca cantidad de parásito en las lesiones por la fuerte reacción inmunitaria.

El material obtenido por estos procedimientos se puede utilizar para examen microscópico del material teñido en Giemsa, cultivo o técnicas moleculares (García et al., 2007).

El diagnóstico molecular permite no solo hacer el diagnóstico de la enfermedad sino también diferenciar la especie causante de la lesión, lo que resulta

## II. Introducción

particularmente útil en regiones donde coexisten varias especies de *Leishmania*. En el diagnóstico de la leishmaniosis cutáneo-mucosa y mucosa la PCR ha demostrado ser el método más sensible para.

El diagnóstico serológico es de uso limitado por su baja sensibilidad y especificidad variable en la leishmaniosis cutánea, obteniéndose títulos de anticuerpos nulos o bajos aunque su positividad aumenta la sospecha clínica en casos de leishmaniosis cutáneo-mucosa (OMS, 2010).

### **2.3. Leishmaniosis dérmica post kala-azar**

En estos casos el diagnóstico es clínico y puede confirmarse encontrando el parásito en muestras de las lesiones cutáneas obtenidas por raspado o biopsia. El diagnóstico molecular en estas muestras es también muy útil por su sensibilidad.

### **2.4. Diagnóstico en caso de coinfección *Leishmania* y VIH**

Dada sus características en cuanto a sus signos y síntomas (menos frecuencia de esplenomegalia), baja reacción inmunitaria y a la presencia de otras infecciones, los diagnósticos parasitológico y molecular son los más adecuados, hecho reforzado por la mayor cantidad de parásito en sangre que los facilitan. Es de destacar el test de aglutinación de látex aplicado a orina de estos pacientes, que tiene una alta sensibilidad. Esta sensibilidad se puede aumentar utilizando una combinación de prueba rápida rK39 y aglutinación directa.

### **3. Tratamiento de la leishmaniosis**

La leishmaniosis es tratada fundamentalmente con fármacos inicialmente desarrollados para otras enfermedades y de hecho, sus mecanismos de acción en la mayoría de los casos no están claros (Singh et al., 2012a). Sin embargo, el refinamiento en las dosis y las pautas en el tratamiento de la leishmaniosis junto con la combinación de fármacos ha llevado a que actualmente, el tratamiento de la leishmaniosis tenga un porcentaje de cura del 95% (Matlashewski et al., 2011).

El tratamiento de la leishmaniosis se debe administrar tras la confirmación de la enfermedad, de ahí la importancia de un diagnóstico precoz y eficaz de la misma. Es recomendable que el diagnóstico llegue a la especie en algunas regiones del mundo debido a la variabilidad en la respuesta y en las formas clínicas de la enfermedad, lo cual es especialmente importante en el caso de la leishmaniosis cutánea en el Nuevo Mundo.

Los principales problemas a resolver en la terapéutica de la leishmaniosis son: el elevado coste del tratamiento, los efectos adversos del arsenal terapéutico, la aparición de resistencias y la vía de administración y duración del tratamiento (Freitas-Junior et al., 2012).

#### **3.1. Arsenal terapéutico**

**Antimoniales pentavalentes:** Dos son los fármacos de este grupo, el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato sódico (Pentostam®). Tanto su eficacia como su toxicidad se basan en su contenido en antimonio ( $Sb^V$ ). Se llevan usando en el tratamiento de la leishmaniosis desde hace más de 50 años y aun así se consideran la primera línea de tratamiento en las regiones donde no existe resistencia. A pesar de su elevado porcentaje de éxito (90%), estos medicamentos han encontrado problemas de resistencias en Bihar (India) y Nepal, con fracaso terapéutico de hasta un 60% (OMS, 2010).

El antimonio pentavalente se considera un profármaco que es reducido en el macrófago o en el propio parásito a antimonito trivalente, la forma activa del fármaco. El mecanismo de acción exacto es desconocido, aunque ambas formas de antimonio provocan la fragmentación del ADN (con posible implicación en la apoptosis), beta oxidación de ácidos grasos y fosforilación del ADP. El antimonio entra en el parásito principalmente a través de acuoporinas aunque su mecanismo de entrada no es conocido completamente. La pérdida de la capacidad reductora en *Leishmania* se ha señalado como mecanismo de resistencia a antimoniales a

## II. Introducción

través de enzimas reductasas tiol dependientes, poco expresadas en cepas resistentes (Ashutosh et al., 2007). Una interesante observación, realizada recientemente es que la exposición crónica a arsénico en el agua de bebida podría ser la causa de la aparición de resistencia a los antimoniales (Perry et al., 2013).

El tratamiento con antimonio se debe administrar por vía intramuscular o intravenosa en perfusión, o inyección lenta con aguja fina con el fin de evitar trombosis. En el caso de la leishmaniosis cutánea, se administra intralesionalmente.

Además de las resistencias, el principal problema de los antimoniales lo constituyen sus efectos adversos, entre los cuales se incluyen: anorexia, náuseas y vómitos, dolor abdominal, malestar, mialgia, altralgia, cefaleas y letargia. También provocan alteraciones electrocardiográficas como la inversión de la onda T, prolongación del intervalo QT y arritmias. Causa la elevación de enzimas pancreáticas, hepáticas, leucopenia, anemia y trombopenia. Sus efectos cardiotóxicos y hepatotóxicos pueden llevar a la retirada del tratamiento (OMS, 2010).

**Anfotericina B:** Este fármaco es un macrólido poliénico ampliamente utilizado en infecciones fúngicas sistémicas. Muestra una gran afinidad por el ergosterol, el esteroide predominante en las membranas celulares de *Leishmania* y de hongos, formando complejos con éstos y abriendo poros que desequilibran el equilibrio iónico, llevando a la muerte celular (Roberts et al., 2003). Poseen una gran eficacia frente al por lo que prácticamente han sustituido a los antimoniales en algunas regiones como España o donde existen resistencias a los antimoniales. La formulación de deoxicolato de anfotericina B (Fungizone®), aunque muy eficaz, no está exenta de reacciones adversas: son frecuentes la fiebre, los escalofríos y la tromboflebitis, siendo la nefrotoxicidad también común. Por estas razones el tratamiento debe ser en régimen de hospitalización, lo que dificulta su administración y cumplimiento.

Las formulaciones lipídicas de anfotericina B se desarrollaron con el fin de mejorar su biodisponibilidad, propiedades farmacocinéticas y reducir sus efectos adversos sin perder su eficacia: son la anfotericina B liposómica (Ambisome®), el complejo lipídico de anfotericina B (Abelcet®) y la dispersión coloidal (Amphocil®). Presentan una toxicidad significativamente menor y su administración se realiza en infusión durante 2h. Tienen una eficacia del 95%.

El principal inconveniente de estas formulaciones lipídicas es el precio. También se han detectado resistencias asociadas al tratamiento, donde las cepas resistentes

de *L. donovani* presentan ergosterol no alquilado, aunque no es el único mecanismo citado (Freitas-Junior et al., 2012).

**Aminosidina (Paromomicina o Humatin®):** Se trata de un antibiótico aminoglucosídico con actividad antibacteriana y frente a *Leishmania*. Su mecanismo de acción es poco claro, aunque se sugiere que penetra en *Leishmania* por endocitosis, siendo la mitocondria su principal diana. En otros estudios, Hirokawa et al. en 2007 demostraron que la paromomicina interactúa con las subunidades ribosómicas 30S y 50S, inhibiendo la síntesis proteica.

Es muy útil en el tratamiento de la leishmaniosis, tanto cutánea como visceral, con una elevada eficacia y tolerabilidad. En ensayos clínicos en la India y África Oriental se demostró la eficacia de su tratamiento, poniéndose de manifiesto su utilidad en casos de resistencia a antimoniales (Jha et al., 1998; Sundar and Chakravarty, 2015) y en la leishmaniosis cutánea se presenta como una alternativa de fácil aplicación tópica (Monge-Maillo and Lopez-Velez, 2014).

Su principal limitación es su poca disponibilidad en zonas endémicas. Aún no se han mostrado resistencias en uso clínico debido a su poco uso, pero se conocen *in vitro*.

**Miltefosina (Impavido®):** Es un alquilfosfolípido (hexadecilfosfocolina) desarrollado inicialmente como antineoplásico; se convirtió en el primer fármaco utilizado frente a la leishmaniosis por vía oral, suponiendo un enorme avance. De hecho se ha recomendado para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en niños (Bhattacharya et al., 2007; Dorlo et al., 2012a).

Su actividad se basa en su acumulación intracelular, regulada por transportadores ATPasa de tipo P. Causa procesos similares a apoptosis en amastigotes de *L. donovani*. Otro efecto es la estimulación de la óxido nítrico sintasa 2, que cataliza la generación de NO y la eliminación del parásito (Wadhone et al., 2009).

Provoca efectos adversos gastrointestinales, mayoritariamente leves como anorexia, náuseas, vómitos y diarrea. Es potencialmente teratogénico y abortivo, por lo que está contraindicado en mujeres en edad fértil. Tiene una elevada semivida de eliminación (152 horas) y su posible mal uso (dada su administración oral), se previó la aparición de resistencias, cuyo mecanismo ya ha sido descrito (Pérez-Victoria et al., 2003); en la práctica clínica ya se han descrito los primeros casos de fallo terapéutico (Dorlo et al., 2014; Rijal et al., 2013) en los que se discute la aparición de resistencias (Cojean et al., 2012; Hendrickx et al., 2014). Otro problema

## II. Introducción

asociado al desarrollo de la miltefosina ha sido, además de las resistencias, su adulteración o baja calidad (Dorlo et al., 2012b).

**Pentamidina:** El isetionato de pentamindina es una diamidina aromática utilizada como tratamiento de segunda línea en casos de resistencia a antimonio, particularmente en India, aunque su utilización está en decadencia debido a su eficacia cada vez más reducida y a las resistencias (Sundar, 2001) aunque aún posee valor para la terapia combinatoria (Croft and Coombs, 2003). Como otros fármacos, su mecanismo de acción es confuso, aunque podría estar implicada alguna función de la mitocondria (Sun and Zhang, 2008).

Este fármaco es bastante tóxico, provocando hipoglucemia grave, nefrotoxicidad, baja tensión arterial, miocarditis y diabetes mellitus.

**Derivados azólicos:** Ketoconazol, fluconazol e itraconazol son antifúngicos orales con eficacia variable en el tratamiento de la leishmaniosis.

**Sitamaquina:** Esta 8-aminoquinolina ha supuesto el primer compuesto desarrollado para la leishmaniosis visceral y el segundo disponible para administración oral. Evaluado en un ensayo clínico en la India, mostró una elevada eficacia frente a la leishmaniosis y al parecer una buena tolerabilidad (Jha et al., 2005), aunque mostró efectos adversos como glomerulonefritis o vómitos. Posteriormente se realizaron ensayos clínicos satisfactorios en Kenia y Brasil (Freitas-Junior et al., 2012) aunque estos sacaron a la luz nuevos efectos indeseables como dolor abdominal (Singh et al., 2012b).

Su mecanismo de acción se basa en la interacción con las cadenas de acilfosfolípidos de la membrana y su acumulación en los acidocalcisomas del parásito, aunque también se ha descrito la enzima succinato deshidrogenasa como diana en el parásito, induciendo estrés celular (Carvalho et al., 2011).

**Imiquimod:** Se trata de un inmunofármaco pues estimula la producción de citoquinas como el interferón- $\gamma$ , induciendo la síntesis de óxido nítrico y la eliminación del parásito. Utilizado recientemente frente a la leishmaniosis cutánea en forma de pomada (Croft and Coombs, 2003; Hervás et al., 2012) y en combinación con antimoniales (Miranda-Verástegui et al., 2005).

## 3.2. Opciones terapéuticas en las leishmaniosis

### 3.2.1. Leishmaniosis visceral

La leishmaniosis visceral puede tratarse en regiones sin resistencias con **antimoniales pentavalentes** a una dosis de 20 mg/kg de Sb<sup>V</sup> durante 28-30 días, siendo un buen indicador de cura la ausencia de recidivas pasados 6 meses; estos compuestos siguen siendo tratamiento de primera línea en países mediterráneos y en la región americana (Monge-Maillo and López-Vélez, 2013). En regiones como Bihar (India) y Nepal, este tratamiento puede tener hasta un 60% de fallo. En Etiopía sin embargo el tratamiento con antimonio de meglumina lleva al 92,9% de cura al final del tratamiento y del 100% seis meses después del fin del tratamiento en pacientes inmunocompetentes, aunque estas cifras se reducen considerablemente en pacientes coinfectados con VIH (Hailu et al., 2010). En un estudio en 2010, se demostró la gran eficacia del tratamiento con estibogluconato sódico en África oriental, del 92,2% con variabilidad entre las distintas regiones donde se evaluó (del 82% en una región de Sudán al 100% en Kenia) (Hailu et al., 2010).

En India se ha utilizado con éxito el **deoxicolato de anfotericina B**, administrado en días alternos en una infusión de 4h, con una dosis de 0,75-1 mg/kg durante 15-20 días. Tiene una eficacia de cura del 99%. La organización panamericana de la salud recomienda este fármaco a una dosis de 1 mg/kg/día hasta una dosis total de 800 mg (OPS, 2013).

La **anfotericina B liposómica** es el tratamiento más utilizado en la India y Europa, utilizándose en la región Mediterránea tanto como tratamiento de primera línea como en recidivas debidas al tratamiento antimonial (Monge-Maillo y López-Vélez, 2013). En la región americana también se recomienda su uso a una dosis de 3-5 mg/kg/día durante 3-5 días (OPS, 2013). En la India se utiliza a una dosis >10 mg/kg de dosis total en casos de leishmaniosis visceral debida a *L. donovani* (>95% de cura) mientras que en Europa en los casos de leishmaniosis visceral debida a *L. infantum* se administra a una dosis de 3-4 mg/kg/día hasta llegar a 15-24 mg/kg (90-98% de eficacia). En África oriental sin embargo la eficacia es inferior, curando en menos de un 90% de los casos con una dosis de hasta 20 mg/kg. También se ha llevado a cabo el tratamiento con una dosis única de 10 mg/kg en la India (con una curación del 90%) (Sundar et al., 2015b, 2010) y de 20 mg/kg en Europa (con un éxito del 96%), mientras que en África el tratamiento con dosis única mostró una inferior eficacia que en la India (Khalil et al., 2014).

## II. Introducción

La **miltefosina** está recomendada para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en la India en un régimen de 28 días de tratamiento oral con dosis de 100 mg al día o de 2,5 mg/kg/día en menores de 12 años. Aunque inicialmente mostró un gran éxito, paulatinamente han aparecido recaídas (Sundar and Chakravarty, 2015) en pacientes inmunocompetentes tanto en la India (Burza et al., 2013) como en Nepal (Rijal et al., 2013) tras 6 meses de observación. La razón del fracaso terapéutico pareció deberse a la baja exposición al fármaco, entre otras razones, sumado a que en niños menores de 12 años probabilidad de fracaso terapéutico fue significativamente superior (Dorlo et al., 2014; Ostry et al., 2014).

En África oriental también se ha utilizado a una dosis de 100 mg/día durante 28 días con una tasa de cura a los 6 meses de acabar el tratamiento del 75,6% en pacientes no-VIH (60% incluyéndolos), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con el grupo tratado con estibogluconato sódico a 20 mg/kg/día durante 30 días (Ritmeijer et al., 2006).

En Brasil o la región Mediterránea no se tienen datos de eficacia de la miltefosina.

En el caso de la **paromomicina** se demostró su eficacia en la India, de un 93-95% con un tratamiento de 15 mg/kg durante 21 días mientras que a una dosis de 20 mg/kg su eficacia en África oriental es del 85% (Hailu et al., 2010; Musa et al., 2010). Como en el anterior, no hay datos de su eficacia en focos de *L. infantum* en el Mediterráneo y Sudamérica.

El isetionato de **pentamidina** consiguió solventar el problema del fracaso terapéutico de los antimoniales en la India en los años 80, con un 93% de curación con una dosis de 4 mg/kg, 3 veces por semana durante 12-21 días. Posteriormente el porcentaje de curación disminuyó progresivamente a niveles del 70-80% y finalmente fue desplazado. También se ha utilizado en combinación con antimoniales o alopurinol para mejorar su eficacia (Das et al., 2001). También se utilizó en África en casos de resistencia a antimoniales. Su uso en los últimos 6-7 años se ha abandonado (Monge-Maillo y López-Vélez, 2013).

La OMS en su informe del Comité de Expertos de 2010 recomendó, con el fin de evitar resistencias tanto en los fármacos establecidos como en los nuevos, el uso de **combinaciones** de fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis visceral, limitando el uso de tratamientos en monoterapia en focos antroponóticos y en el caso de la anfotericina B liposómica. Las combinaciones terapéuticas tienen la ventaja de que es posible utilizar dosis más bajas y periodos de tratamiento

reducidos (con la consecuente mejora en la observación de los pacientes), lo que facilita la adhesión al tratamiento, reduce los efectos adversos y reduce los costes.

**Estibogluconato sódico/Paromomicina:** Se han realizado varios ensayos utilizando esta combinación en Sudán, Kenia, Etiopía (Hailu et al., 2010; Musa et al., 2012) y la India con dosis de 20 mg/kg para el primero y de 12-18 mg/kg en el segundo, con una duración de 20-21 días y eficacias muy elevadas entre el 81,8 al 93,8% de curación a los 6 meses de seguimiento (Monge-Maillo y López-Vélez, 2013).

**Anfotericina B liposomal/Paromomicina:** Sundar et al. en 2011 realizaron varios ensayos clínicos con combinaciones de fármacos. En este caso, una dosis única de 5 mg/kg del primero junto con un tratamiento de 10 días con 11 mg/kg de paromomicina llevó a la curación del 98,7% seis meses después del tratamiento.

**Anfotericina B liposomal/Miltefosina:** En este caso la dosis única de anfotericina B se combinó con miltefosina durante 7 días a una dosis de 50 mg/día. La tasa de curación también fue del 98,7% (Sundar et al., 2011). Esta combinación se había ajustado en otros ensayos clínicos con distintas dosis del primero (5 ó 3,75 mg/kg), del segundo (50, 100 mg/kg o 2,5 mg/kg/día) y duración (10 ó 14 días) con eficacias similares, entre el 96-98% tras 9 meses de observación (Sundar et al., 2008).

**Miltefosina/Paromomicina:** Esta combinación tuvo una duración de 10 días, con una dosis de 50 mg/día en el primero y 11 mg/kg en el segundo. El porcentaje de curación fue del 98,7%, al igual que en los anteriores (Sundar et al., 2011). Ninguno de estos tres protocolos mostró problemas de seguridad.

### **3.2.2. Leishmaniosis cutánea y cutáneo-mucosa**

En el tratamiento de estas enfermedades la identificación de la especie es muy importante dado que hay especies cuya infección cesa espontáneamente mientras que otras son recidivantes o evolucionan hacia formas muy desfigurantes. En todas ellas el factor común es el cuidado y limpieza de las heridas para evitar infecciones secundarias.

En el caso de la **leishmaniosis cutánea del Viejo Mundo**, se recomiendan curas de la lesión, seguimiento y tratamiento local (OMS, 2010).

Las opciones del **tratamiento local** son las siguientes:

## II. Introducción

Pomada de paromomicina (15%) y cloruro de metilbencetonio (12%), dos veces al día durante 20 días.

Antimoniales intralesionales (1-5 mL por lesión) combinada con crioterapia (nitrógeno líquido) cada 3-7 días (1-5 sesiones).

Termoterapia: 1-2 sesiones con calor localizado (50 °C 30s).

En el caso de *L. tropica*, *L. infantum* y *L. aethiopica*, también se puede administrar crioterapia y antimoniales intralesionales por separado.

El **tratamiento sistémico** está desaconsejado en la leishmaniosis cutánea debido a su elevada toxicidad, aunque en casos de lesiones graves puede ser necesario (lesiones mayores de 5 cm, más de 4 lesiones, inmunosupresión o potencial desfigurante/incapacitante de la lesión), siendo éste de 20 mg/kg de Sb<sup>V</sup>/kg/día durante 20 días, combinado con alopurinol (20 mg/kg) durante 30 días en casos recidivantes (*L. tropica*) o paromomicina (15 mg/kg) durante 60 días en caso de leishmaniosis cutáneo-difusa (*L. aethiopica*) (OMS, 2010). Dorlo et al. en 2011 demostraron la utilidad de la miltefosina frente a la LC debida a *L. major*. También se ha visto su eficacia similar a la del tratamiento antimonial intralesional frente a *L. major* y frente a *L. tropica* y *L. infantum* (Monge-Maillo and López-Vélez, 2015).

En el caso de la **leishmaniosis cutánea del Nuevo Mundo**, las lesiones suelen ser más graves y persistentes y no suelen cesar espontáneamente. Como en el anterior, la intervención debe basarse observando sus riesgos y beneficios. Los tratamientos locales en estos tipos de leishmaniosis son similares, aunque su eficacia es inferior en el caso de la termoterapia (70%) y de la pomada de paromomicina (70-90%) por lo que se recomienda **tratamiento sistémico**:

Antimoniales, de forma similar al caso del Viejo Mundo. Especialmente eficaz en *L. braziliensis* y *L. panamensis*, menor en *L. mexicana*.

Pentamidina 3-4 mg/kg, 3 o 4 dosis en días alternos. Menos eficaz que los antimoniales en caso de *L. braziliensis*.

La paromomicina muestra una baja eficacia en Belice y Colombia (< 60%).

La miltefosina a una dosis de 2 mg/kg/día es eficaz en caso de *L. panamensis* (eficacia del 70-90%, Soto et al., 2004) pero inferior en caso de *L. braziliensis* o *L. mexicana* (curación del 33-88% dependiendo de la especie y región).

El tratamiento con Ketoconazol, 600 mg/día durante 28 días es eficaz (76-90%) frente a *L. panamensis* y *L. mexicana*.

La combinación con el inmunomodulador imiquimod vía tópica mejoró la curación con tratamiento antimonial en Perú (Arevalo et al., 2007; Miranda-Verástegui et al., 2005).

En la **leishmaniosis cutáneo-mucosa** el tratamiento debe ser sistémico: los antimoniales pentavalentes son útiles aunque su eficacia (30-100%) depende de la localización de las lesiones (muy baja en caso de tráquea o laringe) y de la zona geográfica por la especie o cepa responsable. Se utiliza el deoxicolato de anfotericina B (1 mg/kg con una eficacia del 80-90%) y su formulación liposómica, que muestra resultados similares a una dosis de 2-3 mg/kg. Por último, la miltefosina mostró una curación del 83% en Bolivia frente a *L. braziliensis* en casos leves y del 58% en casos graves con un tratamiento de 2,5-3,3 mg/kg/día durante 4 semanas (Soto and Toledo, 2007), aumentando su eficacia con 6 semanas de tratamiento (Soto et al., 2009).

### **3.2.3. Leishmaniosis dérmica post kala azar (PKDL)**

En la India, el tratamiento de esta forma de la enfermedad se hace con deoxicolato de anfotericina B durante 4 meses (20 días de tratamiento y 20 de descanso) o con miltefosina de forma continua durante 3 meses (Sundar et al., 2015a). En África Oriental la PKDL cura espontáneamente en un 85% de los casos y no suele tratarse, excepto casos graves y desfigurantes en los que se trata con estibogluconato sódico a dosis habituales hasta 2 meses o con 2,5 mg/kg/día de anfotericina B liposómica durante 20 días (Sundar et al., 2015a).

### **3.2.4. Co-infección con VIH**

Las infecciones por VIH y *Leishmania* se refuerzan mutuamente, dificultando el tratamiento antirretroviral en los casos de leishmaniosis visceral y a su vez, dificultando la eliminación del parásito y aumentando la aparición de recaídas en casos de co-infección. En los ensayos clínicos revisados anteriormente se puede observar que la curación en pacientes con VIH es significativamente inferior.

Se recomienda el tratamiento con formulación lipídica de anfotericina B a dosis de 3-5 mg/kg/día durante 10 días. En Etiopía la miltefosina fue menos eficaz que los antimoniales, pero más segura, debido a que los pacientes con VIH son más sensibles a éstos (Ritmeijer et al., 2006).

## II. Introducción

En casos de países endémicos de *L. infantum* se recomienda una terapia de mantenimiento con anfotericina B lipídica, con dosis de 3-5 mg/kg una vez cada 3 semanas durante 12 meses, reduciendo la aparición de recaídas. Dependiendo del nivel de células CD4+ del paciente, la profilaxis se puede suprimir. También se puede utilizar anfotericina B liposomal, antimoniales o incluso miltefosina, dada su ventajosa elevada semivida y su administración oral (Monge-Maillo y López-Velez, 2015). No hay que olvidar la contribución de la terapia antiretroviral de gran actividad frente al VIH, ya que la reducción de la carga viral muestra una gran mejora en el tratamiento de la leishmaniosis y viceversa, produciendo ambas terapias una gran sinergia (Monge-Maillo et al., 2014).

### **3.3. Seguimiento y monitorización de la leishmaniosis visceral**

El seguimiento de la eficacia del tratamiento es esencial a la hora de evitar recaídas de la enfermedad. Dado que los anticuerpos IgG frente al parásito permanecen elevados durante un largo periodo tras la cura clínica, es necesario establecer una serie de marcadores que indiquen la eficacia del tratamiento y la cura de la enfermedad.

**Detección y cuantificación del parásito:** La detección del parásito por distintos métodos directos, parasitológicos o moleculares, es el método más eficaz para determinar la eficacia de un tratamiento y la cura de la enfermedad. Como se comentó anteriormente, la qPCR se ha mostrado muy eficaz en este sentido (Sudarshan et al., 2011). También se ha utilizado una qPCR para correlacionar el estado clínico de pacientes con leishmaniosis visceral y PKDL en la India con la carga parasitaria en sangre, médula ósea y lesiones cutáneas, además de para monitorizar la carga parasitaria en los pacientes después del tratamiento con antimoniales o anfotericina B (Verma et al., 2010). En ese estudio se obtuvieron buenos resultados de correlación entre el estado clínico del paciente, el análisis directo por microscopía y la carga parasitaria evaluada por qPCR.

La qPCR se ha utilizado para el seguimiento del tratamiento en un ensayo clínico con 46 pacientes con leishmaniosis visceral en la India, tratados con anfotericina B liposómica y monitorizados mediante qPCR en sangre periférica. La reducción de la carga parasitaria en sangre mostró correlación con la desaparición de los signos clínicos y el valor de la carga parasitaria se utilizó para comprobar la cura de los pacientes o posibles recaídas (Sudarshan et al., 2011).

Otros ensayos clínicos que se han realizado (revisados por, Kip et al. 2015) evalúan la utilidad de la qPCR en el seguimiento de la enfermedad y la correlación de las cargas parasitaria en sangre con el estado clínico del paciente.

**Detección de antígenos:** La detección de antígenos en orina mediante el método KAtex, se ha mostrado útil como test de cura en estudios en la India y África oriental (Kip et al., 2015).

**Citoquinas:** Las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se muestran elevadas en casos activos de leishmaniosis visceral, disminuyendo en pacientes que responden al tratamiento. Sin embargo, también se ha encontrado que bajos niveles de IFN- $\gamma$  muestran correlación con la severidad de la enfermedad (Kip et al., 2015). Por otro lado, la interleuquina 10 parece elevada también en pacientes con la enfermedad activa disminuyendo con el tratamiento y parece mostrar correlación con la carga parasitaria en sangre (Verma et al., 2010) y con la posibilidad de recaídas (Kip et al., 2015).

**Anticuerpos:** Aunque la detección de IgG en suero de paciente es un método de diagnóstico de la leishmaniosis, su utilidad para el seguimiento y monitorización de la misma está limitada por el lento descenso de los títulos de anticuerpos. Pruebas como la detección de anticuerpos frente a la amastina sí se han mostrado eficaces discriminando el estado del paciente antes y después del tratamiento (Srividya et al., 2012).

### **3.4. Nuevas perspectivas en el tratamiento de la leishmaniosis**

Los nuevos avances en genómica y proteómica son útiles para el desarrollo de nuevos métodos basados en cribado de alto rendimiento (High Throughput Screening, HTS) que llevan al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

El replanteamiento de fármacos utilizados frente a otras enfermedades para tratar enfermedades tropicales olvidadas sigue siendo una de las, la estrategias más exitosas a la hora de encontrar nuevos fármacos frente a la leishmaniosis visceral ya que además, los ensayos preclínicos ya han sido realizados con anterioridad, reduciendo el coste, tiempo y riesgo asociado.

En el campo de los nuevos fármacos frente a la leishmaniosis, es importante destacar la Iniciativa de Fármacos frente a Enfermedades Olvidadas (Drugs for Neglected Diseases Initiative, DNDi). Se trata de un organismo que tiene como objetivo el establecimiento de distintos consorcios entre empresas farmacéuticas,

## II. Introducción

gobiernos, organizaciones no gubernamentales y fundaciones sin ánimo de lucro con el fin de llevar a cabo el descubrimiento, desarrollo, evaluación clínica e implementación de nuevos medicamentos o nuevas terapias en el tratamiento de las enfermedades desatendidas.

**Fexinidazol:** Se trata de un nitroimidazol que actúa como profármaco al ser metabolizado por las enzimas nitrorreductasas del parásito. Desarrollado para el tratamiento de la tripanosomiasis africana, ha demostrado eficacia en un modelo murino de leishmaniosis visceral (Patterson and Wyllie, 2014). Su perfil farmacocinético permite administrarlo por vía oral y tiene las condiciones suficientes para ser utilizado frente a la leishmaniosis visceral y frente a la leishmaniosis canina. Actualmente hay un ensayo clínico en fase II en marcha para determinar su eficacia y toxicidad en pacientes con leishmaniosis visceral en Sudán (clinicaltrials.gov, 2015). También se está investigando su potencial uso con miltefosina, en una combinación que supondría un tratamiento oral (DNDi).

**Inhibidores de la enzima tripanotión reductasa:** Esta enzima está presente en los tripanosomátidos causantes de la enfermedad de Chagas, enfermedad del sueño, y leishmaniosis. Es parte del complejo defensivo del parásito frente a especies reactivas de oxígeno, entre otras funciones (Augustyns et al., 2001). La diferencia estructural entre este sistema con el del hospedador (basado en el glutatión) lo convierte en una diana terapéutica atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos. Los inhibidores de esta enzima pertenecen a diversos grupos químicos, entre ellos compuestos tricíclicos (Kumar et al., 2014).

**Inmunoterapia:** Durante las últimas dos décadas se han utilizado agentes inmunoterápicos cuyo fin es el de estimular el sistema inmune del hospedador, en lugar de bloquear funciones vitales del parásito, fin de la terapia clásica. Los agentes utilizados en inmunoterapia son los siguientes: interferón- $\gamma$ , GM-CSF (factor de estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) e imiquimod, utilizados en distintas formas de la leishmaniosis con buena eficacia en combinación con antimoniales (Singh and Sundar, 2014).

**Oleifosfocolina (OIPC):** Se trata de un compuesto de la familia de las alquilfosfocolinas (al igual que la miltefosina) que ha sido utilizado exitosamente en modelos experimentales de leishmaniosis visceral, así como frente a la leishmaniosis canina en un reciente ensayo clínico (Hernández et al., 2014).

**Ensayos clínicos recientes o en desarrollo:** A continuación se describen algunos de los ensayos clínicos en el tratamiento de la leishmaniosis, recientemente finalizados o en desarrollo, obtenidos de la página web de DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) y de la página web [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), perteneciente al NIH (National Institutes of Health) de los Estados Unidos de América (consultado en agosto de 2015).

**Anfoleish:** Es un proyecto encaminado al desarrollo y evaluación de una crema de anfotericina B para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en Colombia. Se trata de un ensayo en fase Ib/II.

**Nitroimidazoles:** Durante 2010 se realizó un cribado de unos 70 compuestos de esta familia química, resultando muy eficaz y seguro uno de ellos (VL-2098, DNDi) en modelos animales de leishmaniosis visceral. En el momento se investiga un régimen completamente seguro para descartar sus problemas de toxicidad testicular que ha presentado en las especies animales utilizadas.

**CpG D35:** Se trata de un modulador de la respuesta inmune innata que se pretende utilizar en la leishmaniosis cutánea. Se han realizado estudios previos por la FDA (Food and Drugs Administration) y ahora se intenta caracterizar mas profundamente y en combinación con antimoniales frente a la leishmaniosis cutánea y la PKDL.

**Paromomicina/Gentamicina para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en Francia:** Se lleva a cabo un ensayo clínico en Francia para determinar la eficacia de una crema de paromomicina y gentamicina para el tratamiento de esta enfermedad.

### **3.5. Productos naturales en el tratamiento de la leishmaniosis**

Las plantas son una fuente de nuevos fármacos frente a enfermedades causadas por parásitos. La actividad de los extractos de plantas frente a estos es debida a la presencia de compuestos de una gran diversidad química como son los alcaloides, flavonoides, esteroides o terpenos. La obtención de extractos de plantas para obtener su composición cualitativa y realizar un cribado de los compuestos presentes en éste es una estrategia que se ha utilizado con éxito, así como la determinación de la composición de las plantas utilizadas en medicina tradicional (Tiuman et al., 2011). Podemos destacar en este campo el uso de la quinina a lo largo de la historia, alcaloide obtenido de la corteza de quina (*Cinchona spp*) que fue de uso generalizado en el tratamiento del paludismo. Además este producto sentó las bases para la obtención de numerosas quinoleinas sintéticas, destacando la cloroquina. Tampoco debemos olvidar el potencial antipalúdico de la artemisinina, sesquiterpeno obtenido de la *Artemisia annua*, cuyo efecto es casi inmediato, resultando efectivo incluso en casos de multirresistencia (Sen and Chatterjee, 2011).

Existen numerosos estudios en los que se pone de manifiesto la actividad biocida de compuestos de origen vegetal; entre ellos destacan los componentes de los aceites esenciales elaborados por distintas plantas aromáticas. Los aceites esenciales son sustancias volátiles de naturaleza compleja obtenidas mediante procesos físicos a partir de especies vegetales. En su composición química predominan los derivados monoterpénicos y sesquiterpénicos que se encuentran en mayor proporción, ya sean acíclicos, monocíclicos o bicíclicos.

Los aceites esenciales poseen una gran cantidad de actividades farmacológicas, entre ellas la actividad antiparasitaria: Gracias a su rápida difusión a través de la membrana plasmática (debido a su liposolubilidad), los aceites esenciales pueden mejorar la llegada de sus componentes hasta parásitos intracelulares (Boyom et al., 2003).

Algunos aceites esenciales son capaces de afectar la estructura de la membrana plasmática del parásito, provocando daños irreversibles al mismo. Estas alteraciones estructurales pueden estar mediadas por la inhibición de la biosíntesis de ciertos ácidos grasos de la membrana. También puede afectar a la estabilidad de la membrana inhibiendo la glucosilación de proteínas de ésta (Anthony et al., 2005).

Algunos aceites esenciales son capaces de actuar incrementando la producción de óxido nítrico del macrófago, como es el caso del aceite esencial de sacaca (cuyo principal componente es el linalool), lo cual acelera la destrucción de los parásitos intracelulares (Rosa et al., 2003).

Los derivados terpénicos son compuestos formados por unidades de isopreno, por tanto lipofílicos. Muchos derivados terpénicos de aceites esenciales tienen actividad microbida y antiparasitaria. Gracias a su lipofilia son capaces de penetrar en las membranas celulares y mitocondriales alterando su estructura y consecuentemente su permeabilidad e integridad (Burt, 2004; Sikkema et al., 1995). Esta interacción puede llevar a la muerte celular de los patógenos incluso en el caso de *Leishmania*.

### **3.5.1. (-)- $\alpha$ -bisabolol**

El (-)- $\alpha$ -bisabolol es un alcohol sesquiterpénico monocíclico usado ampliamente en fragancias y cosméticos. Se encuentra en el aceite esencial de camomila (*Matricaria chamomilla*) en concentraciones entre el 50-70% además de en otras plantas usadas en medicina tradicional. Ha sido usado durante mucho tiempo de forma tópica por sus propiedades curativas en la piel y su actividad antiirritante y antiinflamatoria, además se usa actualmente en preparados cosméticos y dermatológicos.

Además, el  $\alpha$ -bisabolol ha demostrado capacidad para bloquear los nervios periféricos, pudiendo atenuar la nocicepción (percepción del dolor) de forma similar a la lidocaína (Alves et al., 2010; Rocha et al., 2011). También se ha investigado su efecto gastroprotector en lesiones agudas inducidas en ratones (Moura Rocha et al., 2010). Relacionado con su actividad antiinflamatoria, recientemente se ha demostrado la actividad inhibitoria del  $\alpha$ -bisabolol sobre la producción de óxido nítrico y prostagandina E-2 en macrófagos previamente estimulados con LPS (Kim et al., 2011).

## II. Introducción

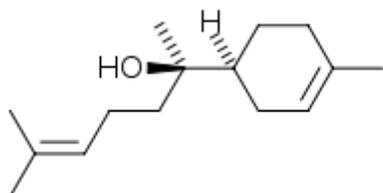


Figura 7. Estructura del (-)-α-bisabolol



Figura 8. *Matricaria chamomilla*

El (-)-α-bisabolol ha sido también evaluado como agente anticanceroso y ha demostrado ser eficaz induciendo la apoptosis en células de glioma humano y de rata (Cavalieri et al., 2009, 2004), así como de células de carcinoma pancreático humano (Darra et al., 2008) y células de carcinoma hepático (Chen et al., 2010) mediante la inducción de la vía apoptótica en células transformadas.

Además se ha demostrado su actividad insecticida frente a la mosca blanca de la fruta tanto puro como componente de aceite esencial de *Vanillosmopsis pohlii* (de Andrade et al., 2004).

Entre otras actividades antiparasitarias se encuentra la actividad nematocida, siendo eficaz frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex s.l.* tanto *in vitro* como *in vivo* (Romero et al., 2012).

Se ha demostrado la actividad de este sesquiterpeno frente a promastigotes de *L. infantum in vitro*, siendo su IC<sub>50</sub>=49μM (Morales-Yuste et al., 2010) y frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (Colares et al., 2013; Rottini et al., 2015); en este último estudio se implicó la reducción del potencial de membrana mitocondrial en su mecanismo de acción frente a *Leishmania*.

El α-bisabolol no presenta toxicidad en animales tras su administración oral (LD<sub>50</sub>=14 g/kg en ratas) ni tampoco presenta actividad mutagénica (Bhatia et al., 2008). Su citotoxicidad, probada en fibroblastos humanos de la piel es muy baja, siendo CC<sub>50</sub> >150 μM (Piochon et al., 2009), lo cual lo convierte en un producto muy seguro.

#### **4. La leishmaniosis canina**

El perro doméstico, además de ser el reservorio de la leishmaniosis debida a *L. infantum* (Morales-Yuste et al., 2012), sufre una compleja enfermedad denominada leishmaniosis canina. Se trata de una enfermedad multisistémica en la que el parásito infecta virtualmente todos los órganos y tejidos del animal llevándolo a la muerte (Baneth and Aroch, 2008).

##### **4.1. Epidemiología de la leishmaniosis canina**

Aunque otras especies de *Leishmania* pueden infectar al perro, el principal responsable de esta enfermedad es *L. infantum*, la especie de *Leishmania* con la más amplia distribución geográfica.

Es endémica en los países de la Cuenca Mediterránea, Oriente Medio y Sudamérica (Baneth, 2013). También se han detectado casos de leishmaniosis canina importados en perros de regiones no endémicas de Europa, como el Reino Unido, que habían viajado a zonas endémicas (Shaw et al., 2009) y Alemania (Mencke, 2011), así como en el Sur de Estados Unidos (Petersen and Barr, 2009).

En España se han realizado distintos muestreos aleatorios para determinar la prevalencia de la leishmaniosis canina (Martín-Sánchez et al., 2009), encontrando valores de entre el 0 y el 100% dependiendo de la región y de la técnica diagnóstica empleada, lo que destaca la naturaleza endémica y la distribución parcheada de la enfermedad (Morales-Yuste et al., 2012).

En las regiones endémicas, aunque la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, no todos los perros están infectados y entre los infectados, no todos los animales muestran signos clínicos de la enfermedad. Estos últimos pueden permanecer asintomáticos a largo plazo o evolucionar a estados más severos de la enfermedad con el tiempo, seguramente debido a cambios en el estado inmunológico del animal (Baneth et al., 2008). Podría considerarse entonces que los perros con enfermedad aparente suponen solamente la punta de un "iceberg", en la que en la base estarían los perros sanos no infectados y entre esos se encontraría un segmento de perros infectados clínicamente sanos (Baneth et al., 2008).

Los perros infectados pero aparentemente sanos o asintomáticos anteriormente mencionados tienen una gran importancia en la epidemiología de la enfermedad, y es que éstos son tan competentes para transmitir el parásito al flebotomo como

## II. Introducción

lo son los perros clínicamente enfermos (Alvar et al. 1994; Molina et al. 1994; Laurenti y Marcondes 2014). Tanto los perros asintomáticos como los enfermos, son capaces de transmitir el parásito al vector incluso después del tratamiento (Alvar et al., 1994; Miró et al., 2011).

### **4.2. Mecanismos de la enfermedad**

En los perros enfermos, el parásito es capaz de evadir la respuesta inmune innata celular del hospedador mediante el remodelamiento de la vacuola parasitófora e interfiriendo en las cascadas de señales del macrófago en su favor (Koutinas and Koutinas, 2014).

Existe una clara dicotomía en la respuesta inmune, con una respuesta inmune celular o Th1 y una respuesta humoral o Th2. Tanto en el hombre como en el reservorio canino se produce una respuesta inmunitaria poco clara, con una mezcla de citoquinas Th1 y Th2 en equilibrio, cuyo desequilibrio hacia uno u otro lado inclinará la balanza hacia la eliminación de la enfermedad (Th1) o su progresión (Th2) (Carrillo and Moreno, 2009).

La respuesta Th1, con la participación de las citoquinas interferón- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina 2 lleva a la activación del macrófago y a la subsecuente eliminación del parásito a través de la síntesis de óxido nítrico y otros efectores mientras que la respuesta Th2, mediada por interleuquina 4, interleuquina 10 y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ ), lleva a una respuesta humoral con síntesis exacerbada de inmunoglobulinas, inactivación del macrófago y diseminación del parásito (Baneth et al., 2008).

Según algunos autores (Deplazes et al., 1995; Iniesta et al., 2005), la dicotomía Th1/Th2 puede verse reflejada en los títulos de las dos principales subclases de inmunoglobulinas, IgG1 e IgG2, relacionadas con la respuesta Th2 y Th1 respectivamente. Estos autores describieron que en los perros sintomáticos podían observarse mayores títulos de anticuerpos IgG1 y/o una prevalencia de IgG1 sobre IgG2. Esta hipótesis también tiene detractores (Day, 2007) que en sus estudios no encontró esta dicotomía.

### **4.3. Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis canina**

La mayoría de los perros presentan una condición corporal baja, con delgadez (que tiende a anorexia), linfadenomegalia y descamación de la piel exagerada. En los tejidos se pueden encontrar amastigotes dentro de los macrófagos causando reacciones inflamatorias granulomatosas.

Los signos cutáneos principales incluyen lesiones cutáneas nodulares, ulcerativas y pustulosas, además de dermatitis exfoliativa. También alopecia, palidez de las mucosas y reacciones eritematosas. Así mismo, se pueden encontrar signos oculares como blefaritis, uveítis y conjuntivitis. La onicogriposis es consecuencia de la gran cantidad de inmunoglobulinas circulantes. La adenopatía en los perros sintomáticos está caracterizada por un agrandamiento de los nódulos linfáticos debido a la hipertrofia de sus estructuras. Se puede encontrar el parásito en estos tejidos aunque la carga parasitaria no se correlaciona perfectamente con su tamaño o el estado clínico del animal (Koutinas and Koutinas, 2014).

Los riñones están afectados en la mayoría de los perros infectados, detectándose glomerulonefritis asociada a la deposición de inmunocomplejos, que puede evolucionar hacia un fallo renal. La afectación del riñón, aunque puede estar presente desde el comienzo de la enfermedad, se manifiesta en estadios avanzados con proteinuria y elevación de creatinina en sangre. El fallo renal es la principal causa de muerte en los perros con leishmaniosis canina (Solano-Gallego et al., 2009).

Debido a desórdenes de coagulación en el perro enfermo asociados a alteraciones en la hemostasia, pueden presentarse epistaxis, hematuria y diarrea hemorrágica (Koutinas and Koutinas, 2014).

En el bazo, la presencia de amastigotes da lugar a un agrandamiento o esplenomegalia a causa de la infiltración de macrófagos y a cambios en la microestructura del órgano. Una situación similar se puede observar en el hígado, llevando a hepatitis debida a leishmaniosis canina, aunque estos casos son muy pocos (Rallis et al. 2005).

El parásito invade gran parte del organismo del animal llegando hasta la médula ósea, considerado el órgano más profundo y responsable de la persistencia de la enfermedad y de sus recidivas. La parasitación de este tejido provoca a cambios en la producción de células, dando lugar a pancitopenia en general y anemia arregenerativa en particular.

## II. Introducción

### **4.3.1. Clasificación de la severidad de la enfermedad**

Los termino clásicos para clasificar a los perros infectados por *L. infantum* (asintomático, oligosintomático y polisintomático) son términos anticuados que caen en desuso (Dantas-Torres and Otranto, 2014; Dantas-Torres et al., 2014) pues no consideran anormalidades clínico-patológicas. Han surgido así varias alternativas a la hora de valorar el grado de severidad en la enfermedad, como es el establecimiento de una puntuación clínica (clinical score) basada en la asignación de una puntuación a cada signo clínico o alteración patológica relevante y compatible, puntuación que refleja el grado de severidad de cada parámetro (entre 0 y 3); esta opción fue la elegida por autores como Manna et al. en 2009 y Proverbio et al. en 2014. Por otro lado, Solano-Gallego et al. en 2009 propusieron un sistema de estadíos clínicos de la enfermedad (clinical staging), clasificando el estatus del animal en 4 etapas de la enfermedad atendiendo a las anormalidades clínico-patológicas, signos clínicos, estado serológico del perro y sobretudo su estado renal de acuerdo con la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS). Para cada una de las etapas, los autores sugieren una serie de características que lo definen, así como un tratamiento y un pronóstico.

### **4.4. Diagnóstico de la leishmaniosis canina**

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la observación de signos clínicos compatibles y anormalidades analíticas, la detección del parásito por técnicas parasitológicas o moleculares directas y la detección de anticuerpos IgG frente al parásito mediante IFI (Noli and Saridomichelakis, 2014). Las mismas técnicas utilizadas en la leishmaniosis visceral se pueden aplicar al diagnóstico de la leishmaniosis canina.

Un perro con signos clínicos compatibles y título elevado de anticuerpos frente al parásito puede ser diagnosticado como enfermo, dado que los perros enfermos suelen mostrar elevados títulos de anticuerpos (Miró et al., 2008).

En caso de títulos más bajos en ausencia de signos clínicos, se puede confirmar la infección asintomática mediante la detección del parásito por técnicas moleculares sensibles. Para descartar la enfermedad sería necesario repetir las pruebas pasados 3 meses (Miró et al., 2008).

#### **4.5. Tratamiento de la leishmaniosis canina**

El tratamiento del perro con leishmaniosis tiene como objetivos controlar los signos clínicos y las alteraciones clínico-patológicas, mejorar la inmunidad celular del animal, reducir la carga parasitaria, evitar recaídas y disminuir la capacidad de transmitir el parásito al vector (Noli and Saridomichelakis, 2014). La curación del perro es extremadamente difícil, aunque es posible disminuir la carga parasitaria (Baneth and Shaw, 2002).

El arsenal terapéutico en la leishmaniosis canina es el mismo que en la leishmaniosis visceral en humanos con algunas diferencias: el uso de alopurinol está muy extendido dado su potencial leishmaniostático y su baja toxicidad (muy importante en perros con afectación renal); es frecuente su uso en combinación con otros fármacos (antimoniato de meglumina en particular), o como tratamiento de mantenimiento o preventivo, aunque no se recomienda en monoterapia (Noli and Auxilia, 2005). El alopurinol es un análogo de la hipoxantina que bloquea la xantina oxidasa, interfiriendo en el metabolismo de las purinas. Es un fármaco muy bien tolerado y su único efecto adverso es la urolitiasis (Torres et al., 2011).

La elección de la terapia se basa en la etapa en la que se encuentra el perro (Solano-Gallego et al., 2011). Por ejemplo, en perros asintomáticos se recomienda no tratar o tratar solamente con alopurinol (Solano-Gallego et al., 2009) mientras que en perros con afectación renal solo se recomienda el uso de alopurinol y se descarta el antimoniato de meglumina por su nefrotoxicidad. En el resto de perros, el Glucantime® asociado a alopurinol es el tratamiento de elección

Las principales opciones terapéuticas en el tratamiento de la leishmaniosis canina son las siguientes:

Antimoniato de meglumina (Glucantime®) 75-100 mg/kg/día o 40-75 mg/kg dos veces al día por vía subcutánea durante 4-6 semanas.

Miltefosina (Milteforan®) 2 mg/kg/día vía oral durante 28 días. Es capaz de reducir la carga parasitaria en monoterapia pero no cura la enfermedad (Andrade et al., 2011; Manna et al., 2009b).

Alopurinol 10 mg/kg dos veces al día durante 6-12 meses.

Tanto el tratamiento con el antimoniato de meglumina como con la miltefosina se recomiendan combinados con alopurinol, siendo la combinación Glucantime® y Alopurinol el tratamiento de primera línea y la más utilizada en los países

## II. Introducción

mediterráneos (Bourdeau et al. 2014). También la combinación de miltefosina y alopurinol se ha mostrado prometedora y tan eficaz como la anterior combinación en varios ensayos clínicos (Manna et al., 2009, Miró et al., 2009).

Otros tratamientos de segunda línea son la aminosidina (5 mg/kg dos veces al día durante 4 semanas) y el isetionato de pentamidina (4 mg/kg durante 4 semanas vía intramuscular) que han sido eficaces en varios ensayos clínicos en perros, con el problema de su mayor toxicidad (Noli y Saridomichelakis, 2014). La marbofloxacin también ha sido utilizada en varios ensayos clínicos y parece de utilidad en el tratamiento de esta enfermedad (Rougier et al., 2012, 2008).

Los tratamientos con ketoconazol, y combinaciones de metronidazol con espiramicina o enrofloxacin no se han mostrado eficaces en el tratamiento de la leishmaniosis canina (Noli y Auxilia, 2005).

Por otro lado, recientemente se ha descrito el posible uso de la domperidona tanto en el tratamiento (Gómez-Ochoa et al., 2009) como en la prevención de la leishmaniosis canina (Sabaté et al., 2014; Wylie et al., 2014). La domperidona es un agonista dopaminérgico D2 capaz de estimular la respuesta inmune celular de los animales a través del incremento de la secreción de prolactina que estimula la respuesta Th1, fundamental en los perros enfermos de leishmaniosis canina (Sabaté et al., 2014).

### **4.5.1. Seguimiento y monitorización de la enfermedad**

Tras el primer mes de tratamiento es importante controlar con un análisis completo hematológico y bioquímico (prestando especial atención a los marcadores de daño renal) y así cada 3 ó 4 meses hasta la recuperación del animal. Tras esta recuperación se debe controlar el estado del perro cada 6-12 meses para anticipar posibles recaídas (Solano-Gallego et al., 2011; Oliva et al. 2010). El título de anticuerpos debe ser evaluado cada 6-12 meses, un incremento de más del doble del título puede ser indicativo de recaída. La cuantificación de la carga parasitaria se ha mostrado útil a la hora de seguir la evolución del tratamiento (Martínez et al., 2011; Roura et al., 2013).

## 5. Las enzimas histona desacetilasa

El ADN cromosómico se empaqueta alrededor de las histonas, formando un complejo denominado cromatina. Las histonas son proteínas cargadas positivamente, altamente conservadas, denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4 que forman dobletes entre ellas para conformar un octámero. El ADN que envuelve el núcleo de las histonas (unos 140 pb) da menos de dos vueltas alrededor del octámero de histonas, conformando el denominado nucleosoma, también existente en tripanosomátidos (Martínez-Calvillo et al., 2010). Las regiones N-terminales de las histonas interactúan con el ADN y la H1, que interactúa con el sitio de entrada y salida del ADN en el nucleosoma a través de su dominio globular. Este conjunto nucleosoma-H1 es denominado cromatosoma. Las histonas en tripanosomátidos divergen bastante de las del resto de eucariotas, careciendo H1 de dominio globular, causando que la cromatina no se condense durante la división celular. La cromatina en tripanosomátidos está menos condensada, formando filamentos de 10 nm (Alonso and Serra, 2012).

El equilibrio entre los estados condensados y no condensados de la cromatina es de vital importancia para la progresión del ciclo celular. La modificación de la cromatina da lugar a cambios en la accesibilidad a ésta de los complejos transcripcionales o de las polimerasas. Así, tanto el ADN como las histonas pueden ser modificados de forma post-traducciona para formar la eucromatina (menos compacta y accesible) o heterocromatina (compacta e inaccesible). De este equilibrio son responsables dos enzimas: las histona desacetilasas (HDAC's) y las histona acetiltransferasas (HAT), que eliminan o adicionan grupos acetilo, respectivamente. A través de la adición de grupos acetilo en el grupo  $\epsilon$ -amino del residuo de lisina en el extremo N-terminal de las colas de las histonas, se neutraliza la carga positiva de éstas, disminuyendo su interacción con los grupos fosfato del ADN (negativamente cargados) y por tanto reduciendo el nivel de empaquetamiento y condensación del ADN. Esto da lugar a elevados niveles de transcripción del ADN. La condensación del ADN puede llevarse a cabo a través de la desacetilación e indirectamente mediante la metilación. En general, varios procesos intervienen en la condensación del ADN: Acetilación, Metilación y Fosforilación (Horn, 2008; Alonso y Serra 2012).

La desacetilación de histonas es un proceso necesario para la expresión de genes y la progresión normal del ciclo celular, aunque otras proteínas también pueden ser acetiladas, como la  $\alpha$ -tubulina, la unidad básica del citoesqueleto (Horn, 2008). La estabilidad de esta proteína depende, entre otros, de su nivel de acetilación, lo

## II. Introducción

que podría tener relación con los cambios estructurales en la diferenciación de los tripanosomátidos (Asthana et al., 2012; Quinones et al., 2011). Se ha encontrado en su forma acetilada en el huso mitótico, señalando una posible relación con el ciclo celular (Sasse and Gull, 1988).

Por otro lado, los tripanosomátidos carecen de promotores para la regulación de la transcripción como en otros eucariotas (Clayton and Shapira, 2007; Kramer, 2012; Respuela et al., 2008), por tanto el proceso de formación de eucromatina y heterocromatina podría tener una especial relevancia a la hora de regular la expresión genética (Thomas et al., 2009).

En mamíferos, existen hasta la fecha 18 HDAC repartidas en 4 clases de HDAC, clasificadas por su homología con las HDAC de levaduras y separadas en zinc dependientes (clases I, II y IV) y NAD<sup>+</sup> dependientes (clase III) (Horn, 2008):

Clase I: Son HDAC zinc dependientes, en concreto HDAC 1-3 y HDAC 8.

Clase II: HDAC 4-5 y HDAC 7-9 (Clase IIa) y HDAC6 (clase IIb).

Clase III: La constituyen las sirtuinas (SIR, Silent Information Regulator) que son NAD<sup>+</sup> dependientes. En levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), donde se descubrió, es conocida como Sir2 y en mamíferos hay 7 enzimas SIRT 1-7.

Clase IV: HDAC 11.

### **5.1. Las enzimas histona desacetilasa en *Leishmania* y otros protozoos parásitos**

En *P. falciparum* se han descrito 5 enzimas HDAC de las cuales dos son homólogos de Sir2 mientras que las otras son HDAC Zn-dependientes. Las primeras se han implicado en la regulación de genes relacionados con la virulencia del parásito sin resultar vitales para la supervivencia del mismo. Los inhibidores de HDAC (iHDAC) apicidin y trichostatin A han sido evaluados frente a *P.falciparum* (Andrews et al., 2000) resultando potentes tanto frente a trofozoitos del parásito como frente a gametocitos (Trenholme et al., 2014) pero resultando poco selectivos. Estos compuestos y el SAHA (ácido suberoil anilida hidroxámico, un pan inhibidor de HDAC en humanos) causan hiperacetilación de las histonas del parásito (Andrews et al., 2012, 2008; Darkin-Rattray et al., 1996) y como consecuencia de ello la sobreexpresión de ciertos genes, como el de la  $\alpha$ -tubulina. Los inhibidores apicidin, trichostatin A y SAHA afectan a la regulación de hasta el 21% de los genes del parásito, ya sea sobreexpresándolos o reduciendo su expresión.

En *Trypanosoma brucei* también se han caracterizado ampliamente las enzimas HDAC, encontrándose 4 HDAC Zn-dependientes (DAC 1-4) y 3 HDAC relacionadas con Sir2, llamadas Sir2 RP (Related Protein). Ingram y Horn en 2002 describieron las enzimas DAC 1-4, encontrando que dos de ellas (DAC1 y DAC3), cuya localización es nuclear, eran esenciales para la viabilidad del parásito mientras que las otras dos (DAC2 y DAC4), que se encuentran en el citoplasma, eran prescindibles y su bloqueo o knockout no daba lugar a la muerte del parásito como en el caso de las anteriores. Las dos primeras proteínas, DAC1 y DAC3, muestran relación con el silenciamiento de los sitios de expresión telomérica de las glicoproteínas de variación de superficie (Wang et al., 2010). Por otro lado, las Sir 2 RPs fueron descritas por Alford et al. en 2007. Sir2 RP1 se encuentra en el núcleo mientras que las otras dos (Sir2 RP2 y Sir2 RP3) asociadas a la mitocondria. La función de la primera está relacionada al silenciamiento telomérico y la reparación del ADN, aunque no es necesaria para la variabilidad antigénica y su sobreexpresión lleva a la muerte del parásito.

En *T. cruzi* también se intuyen las mismas enzimas que en *T. brucei* y a excepción de Sir2 RP2 (Alonso y Serra, 2012). Las enzimas Sir2 RPs han sido exploradas en este parásito recientemente: ambas proteínas se expresan menos o no se expresan en tripomastigotes, siendo la Sir2RP3 más expresada en amastigotes; Sir2 RP1 se encuentra en el citoplasma mientras que Sir2 RP3 está presente en la mitocondria. La sobreexpresión de la enzima Sir2 RP1 estimula la metaciclologénesis mientras que la sobreexpresión de Sir2 RP3 altera el crecimiento de los epimastigotes y la infectividad del parásito. La sobreexpresión de las Sir2 RP's protege al parásito frente al efecto de inhibidores de sirtuinas (Ritagliati et al., 2015).

*Leishmania* parece contener también genes ortólogos a aquéllos presentes en *T. brucei* (Alonso y Serra, 2012). Las proteínas DAC no han sido estudiadas en *Leishmania*, sin embargo la proteína Sir2 RP1 sí ha sido estudiada: se trata de una proteína citoplasmática (expresada tanto en promastigotes como en amastigotes), asociada con la red de microtúbulos del citoesqueleto, con capacidad de acetilar la  $\alpha$ -tubulina (Fessel et al., 2011; Tavares et al., 2008; Yahiaoui et al., 1996) y tiene un papel fundamental en la supervivencia del parásito al silenciar los genes implicados en la muerte celular programada (Vergnes et al., 2005). Recientemente se ha estudiado la asociación de Sir2 RP1 en la resistencia a anfotericina B en aislados susceptibles o resistentes de *L. donovani*, implicando varios mecanismos como la regulación del gen de resistencia a fármacos MDR1 (Multi Drug Resistance

## II. Introducción

1), la resistencia a especies reactivas de oxígeno y el silenciamiento de la apoptosis (Purkait et al., 2015).

Aunque las enzimas HDAC han sido poco estudiadas, algunos trabajos intuyen su función o las han mencionado: Saxena et al. en 2007 analizaron el transcriptoma de promastigotes de *L. donovani* durante su diferenciación a amastigotes axénicos, encontrando una enzima HDAC sobrerregulada (identificada como LmjF21.0680, enzima ortóloga de DAC1 en *T. brucei*) a las 10h de ser incubados a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y pH 5,5. Este cambio puede ser sugerente de cambios en la estructura de la cromatina, afectando a la expresión de genes.

### 5.2. Inhibidores de histona desacetilasa

Los inhibidores de histona desacetilasa (iHDAC) son un grupo químicamente diverso de compuestos naturales o sintéticos que pueden detener el crecimiento o causar apoptosis en células cancerosas.

El primer iHDAC fue el trichostatin A, compuesto natural aislado de *Streptomyces*. Pertenece al grupo de los ácidos hidroxámicos, cuyo mecanismo de acción se basa en su actividad quelante de zinc (presente en el centro activo de las HDAC de clase I, II y IV).

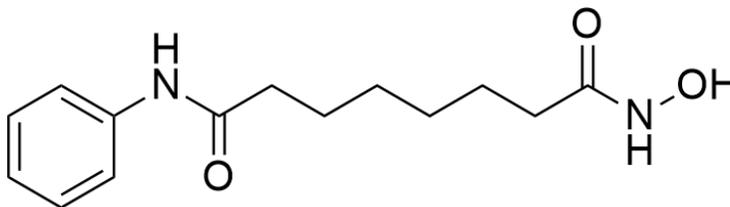


Figura 9. Estructura del compuesto SAHA o Vorinostat (Zolinza®)

El SAHA o vorinostat (figura 9) fue el primer iHDAC comercializado para el tratamiento del linfoma cutáneo de las células T bajo el nombre de Zolinza® (Grant et al., 2007). Tiene actividad frente a HDAC de clase I y II. El compuesto Belinostat (Beleodaq®), relacionado estructuralmente con el anterior, también ha sido aprobado para el tratamiento de linfomas raros (Thompson, 2014). Por último, el Panobinostat (Farydak®) es un derivado hidroxámico con actividad frente a HDAC de clase I, II y IV y ha sido recientemente aprobado para el tratamiento combinado del mieloma múltiple en algunos pacientes (Garnock-Jones, 2015).

La romidepsina (Istodax®) es un profármaco tetrapeptídico cíclico con cierta actividad frente a las HDAC humanas de clase I que también ha sido aprobado por

la FDA para el tratamiento del linfoma cutáneo de las células T (Prince and Dickinson, 2012).

La apicidina es un producto natural aislado de *Fusarium* spp. con actividad inhibidora de HDAC que ha ido evaluado por su actividad antiparasitaria frente a *P. berghei* y *Toxoplasma gondii* (Darkin-Rattay et al., 1996)

Frente a *Plasmodium* spp. se han evaluado una variedad y cantidad de compuestos, alcanzando elevadas actividades en el rango nanomolar y elevada selectividad frente al parásito (Andrews et al., 2012) llegando algunos a ser eficaces en modelos murinos (Agbor-Enoh et al., 2009; Sumanadasa et al., 2012). Los clásicos iHDAC (Vorinostat, Belinostat, Panobinostat y Romidepsin) con actividad anticancerosa han sido evaluados recientemente frente a *P. falciparum* mostrando baja selectividad frente al parásito (Hansen et al., 2014).

Frente a *T. brucei* también se han realizado algunos estudios: En 2012 Kelly et al. evaluaron una serie de iHDAC de naturaleza hidroxámica con actividad frente a HDAC humanas, obteniendo una elevada eficacia frente formas sanguíneas del parásito *T. brucei*. Posteriormente se evaluaron compuestos con actividad inhibidora de HDAC y de sirtuinas en humanos que están actualmente en fase de evaluación clínica, obteniendo buenos resultados con el Quisinostat, Belinostat y Panobinostat, con actividades en el rango micromolar (Carrillo et al., 2015).

Frente a *T. cruzi* solo se ha evaluado el santacruzamato A, un compuesto hidroxámico natural aislado de una cianobacteria, que no mostró actividad frente a éste ni frente a *L. donovani* (Pavlik et al., 2013).

Frente a *Leishmania* se han probado distintos compuestos con supuesta actividad inhibitoria de las proteínas histona desacetilasas Zn-dependientes. Los clásicos derivados hidroxámicos, SAHA y TSA, han sido evaluados repetidas veces con resultados contradictorios: frente a promastigotes de *L. donovani* muestran una baja actividad y nula selectividad (Mai et al., 2004) aunque posteriormente el TSA, pero no el SAHA, mostró una elevada actividad y selectividad frente a promastigotes de *L. donovani* (Patil et al., 2010) y para otros autores el SAHA es activo frente a amastigotes intracelulares de *L. donovani* (Sodji et al., 2014). Se han evaluado derivados de aroil-pirroil hidoxiamidas (Mai et al., 2004) con actividades de hasta 1,6 µg/mL y buena selectividad.

En 2010, Guerrant et al. evaluaron una serie de inhibidores de HDAC macrocíclicos no peptídicos obteniendo valores de IC<sub>50</sub> de hasta 5 µg/mL. Estos autores

## II. Introducción

evidenciaron diferencias en la actividad de los iHDAC entre *P. falciparum* y *L. donovani*, así como la falta de correlación entre la actividad de éstos frente a promastigotes o amastigotes axénicos. Posteriormente, también evaluaron iHDAC macrocíclicos con un esqueleto tricíclico y distintos a los anteriores, consiguiendo compuestos con actividad de hasta 4,8 µg/mL frente a promastigotes de *L. donovani* (Mwakwari et al., 2010). Nuevamente, los compuestos evaluados fueron más activos frente a *P. falciparum*. Este mismo grupo de investigación identificó posteriormente otros compuestos con actividad frente a *L. donovani* obteniendo similares resultados (Patil et al., 2010).

Otra serie de compuestos no hidroxámicos con actividad selectiva frente a HDAC6 y HDAC8 humanas se evaluaron frente a amastigotes intracelulares de *L. donovani* con resultados prometedores, obteniendo actividades inferiores a 1 µg/mL (Sodji et al., 2014) y pusieron de manifiesto que la selectividad frente a HDAC6 humana mejora la actividad frente al parásito.

También se han evaluado frente a *Leishmania* spp compuestos inhibidores de Sir2 RP1 como son el sirtinol y la nicotinamida, compuestos selectivos de las sirtuinas NAD<sup>+</sup> dependientes. En distintos trabajos (Serenio et al., 2005; Vergnes et al., 2005) se evidenció la actividad de estos compuestos frente a amastigotes de *L. infantum* pero no frente a promastigotes.

### **III. Aim and Objectives**

### III. Aim and Objectives

Leishmaniasis treatment remains challenging due to the toxicity of current therapies, the difficulty of their administration and resistance appearance. Furthermore, different *Leishmania* species might vary in their response to drugs.

The dog is the main reservoir of *L. infantum* and it suffers canine leishmaniasis, a multisystemic syndrome which lacks a completely effective treatment.

The aim of this PhD Thesis is to assess the usefulness of a new therapeutic target, histone deacetylases enzymes, and a promising natural compound, (-)- $\alpha$ -bisabolol in leishmaniasis treatment through the development and screening of a series of compounds, from *in vitro* models to a pilot clinical trial involving naturally infected dogs. In order to accomplish this aim, the following objectives have been established:

1. To develop and evaluate the activity of new SAHA (vorinostat) analogues and the sesquiterpenoid (-)- $\alpha$ -bisabolol against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* using *in vitro* laboratory models
  - a. *In vitro* screening and evaluation of the compounds against different *Leishmania* species and *T. cruzi*
  - b. *In vitro* cytotoxicity evaluation on mammal cell lines
  - c. Mechanisms of action investigations
2. To evaluate the most promising compounds in a murine visceral leishmaniasis model due to *L. infantum*
  - a. To adjust the infection model
  - b. To evaluate the toxicity on healthy animals
  - c. To evaluate the activity of these compounds (free or encapsulated) and their toxicity in experimentally infected mice
3. To evaluate the most promising compounds from the *in vivo* phase in a pilot clinical trial involving dogs with naturally acquired canine leishmaniasis due to *L. infantum*
  - a. To perform a clinical, parasitological, molecular and immunological study of the dogs to get an insight into the infection biomarkers of the disease, in order to facilitate the interpretation of the results
  - b. To evaluate the activity of the compounds against the parasite through the establishment of efficacy criteria
  - c. To assess the safety of the compounds in these naturally infected dogs

### III. Aim and Objectives

4. To investigate histone deacetylases enzymes of *Leishmania*
  - a. To find out the presence of genes coding for these proteins in *Leishmania* through bioinformatics analysis
  - b. To investigate their subcellular localisation using *L. mexicana* as a model

## **IV. Material y Métodos**

## IV. Material y Métodos

## 1. Productos

### 1.1. Fármacos de referencia para el tratamiento de la leishmaniosis

**Isetionato de pentamidina:** Se adquirió de Sanofi, con el nombre registrado de Pentacarinat<sup>®</sup>; disponible en viales estériles de 300mg en polvo. Se diluye con agua para inyectables hasta una concentración de 300 mg/mL. Se alicuota y almacena a -20 °C. En ensayos *in vitro* se diluye en medio RPMI completo y se añade directamente al medio de cultivo hasta la concentración deseada.

**Antimoniato de meglumina:** Se adquirió de Sanofi, con el nombre registrado de Glucantime<sup>®</sup>; disponible en viales estériles de 5 mL en una concentración de 300 mg/mL. Se almacena a 4 °C. En ensayos *in vitro* se diluye previamente en medio RPMI completo y se añade al medio de cultivo hasta la concentración deseada. En ensayos en ratones se diluye en solución de suero fisiológico (SSF: NaCl 0,9%) y se administra la dosis deseada por vía intraperitoneal. En ensayos clínicos con perros se administra por vía subcutánea sin diluir.

### 1.2. Nuevos compuestos para el tratamiento de la leishmaniosis

#### 1.2.1. Derivados hidroxámicos de síntesis

**Ácido suberoil anilida hidroxámico (SAHA) y nuevos derivados hidroxámicos de síntesis:** Se reciben en envase estéril en polvo procedentes del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada y con una pureza mayor o igual al 95% determinada por HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento). Se disuelven en dimetilsulfóxido puro (DMSO) hasta obtener una concentración madre de la que parten las demás concentraciones seriadas. Se conservan a 4 °C. Al tratarse de compuestos poco hidrosolubles, se utilizan de forma que, al añadirlos al medio de cultivo, se obtiene en éste la concentración deseada de compuesto y 0,5% de DMSO con el objetivo de que no precipite.

#### 1.2.2. Nuevos derivados hidroxámicos de síntesis vehiculizados en nanopartículas

Los dos tipos de nanopartículas utilizados son nanopartículas de oro y nanopartículas de ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA). Se reciben en forma de suspensión en envase estéril conteniendo 0,1 % Tritón X-100 y 0,1% DMSO. Se almacenan a 4 °C. Durante su almacenamiento tienden a precipitar por lo que previo a su utilización es necesario redispersarlos mediante agitación.

## IV. Material y Métodos

### 1.2.3. Productos naturales

**(-)- $\alpha$ -bisabolol:** Se adquirió de Sigma-Aldrich (Referencia 14462) en forma líquida y pureza superior o igual al 95% (cromatografía de gases). Se almacena a 4 °C. Para su utilización se disuelve en DMSO puro hasta obtener la concentración deseada. Al tratarse de un compuesto poco hidrosoluble, se utiliza de forma que, al añadirlo al medio de cultivo, se obtiene en éste la concentración deseada y 0,5% de DMSO con el objetivo de que no precipite. En ensayos *in vivo* con ratones y con perros, se mezcla la dosis deseada en aceite de oliva y se administra por vía oral, utilizando una sonda en el caso de los ratones.

### 2. Medios de cultivo

**RPMI-1640** (Roswell Park Memorial Institute): Se adquiere de Sigma-Aldrich (España). Se trata de un medio de cultivo estándar líquido monofásico. Puede contener rojo fenol como indicador de pH. Utilizado para el cultivo de *Leishmania* spp. y de las líneas celulares de mamífero. Se suplementa con bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) 2 g/L, HEPES (ácido [N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano-sulfónico]) 10mM, suero bovino fetal inactivado (SBF) al 10% y bencilpenicilina sódica (200 U/mL).

Elaboración:

<b>Medio RPMI</b>	
<b>Polvo RPMI</b>	10,4 g
<b><math>\text{NaHCO}_3</math></b>	2 g
<b>SBF</b>	100 mL
<b>Penicilina</b>	200000 U
<b>HEPES 1 M pH 7.2</b>	10 mL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	csp 1 L

Se mezclan los componentes y se esteriliza por filtración. Se alicuota en volúmenes de 25 mL y se conserva a -20 °C o 4 °C. Se etiqueta como "RPMI completo".

**Evans Modified Toby Medium (EMTM):** Se trata de un medio de cultivo bifásico para el aislamiento y cultivo de *Leishmania* spp. Su fase sólida contiene agar y sangre de conejo (10%) con anticoagulante. Como fase líquida se utilizaron SSF y RPMI completo en sustitución de la fase líquida original de este medio.

Elaboración de la fase sólida:

<b>EMTM sólido</b>	
<b>Agar</b>	4,20 g
<b>Extracto de carne</b>	0,63 g
<b>Peptona</b>	1,05 g
<b>NaCl</b>	1,68 g
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	csp 210 mL

Se hierve hasta disolver los componentes. Se esteriliza en autoclave, se deja enfriar hasta una temperatura de 57 °C y se añade la sangre de conejo (mezclada con citrato trisódico, Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O (COO)<sub>3</sub>, al 10% en SSF como anticoagulante) y bencilpenicilina sódica (4000 U/mL). Se llenan en condiciones de esterilidad tubos de 5 mL con 1 mL de EMTM (dejando que el medio cubra tres cuartas partes del tubo) y frascos falcon de 25cm<sup>2</sup> añadiendo 4 mL de EMTM, dejando los tubos reposar inclinados a temperatura ambiente hasta su solidificación en forma de pico de flauta. A continuación se almacenan a 4 °C.

**LCCM** (L929 Cell Conditioned Medium): Se trata del medio condicionado de los fibroblastos L929. Se obtiene tras el cultivo durante 7 días de éstos en medio RPMI completo. El medio se recoge, se filtra para eliminar restos celulares y se almacena en el congelador a -20 °C. Este medio contiene GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor) que los fibroblastos excretan al medio y cuya presencia es necesaria para la diferenciación de los macrófagos.

**Medios condicionados para la diferenciación de macrófagos:** Se utilizan dos medios condicionados, denominados R2030 y R105, elaborados con distintas proporciones de RPMI, SBF y LCCM.

Composición:

<b>Medio</b>	<b>R2030 (%)</b>	<b>R105 (%)</b>
<b>RPMI</b>	50	85
<b>LCCM</b>	30	5
<b>SBF</b>	20	10

### **3. Parásitos, líneas celulares de mamífero y su cultivo**

#### **3.1. Especies y cepas de parásito utilizadas**

***Leishmania infantum* MHOM/ES/2007/DP532JFJ:** Cepa de *L. infantum* aislada de un paciente local con leishmaniosis visceral por el Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves en colaboración con el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia (Granada). Esta cepa ha sido caracterizada mediante electroforesis de isoenzimas e identificada como *L. infantum* zimodemo MON-1.

***L. infantum* MCAN/ES/2007/DP534:** Cepa de *L. infantum* aislada de un caso local de leishmaniosis canina por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia (Granada). Esta cepa ha sido caracterizada mediante electroforesis de isoenzimas e identificada como *L. infantum* zimodemo MON-1.

***L. donovani* MHOM/IN/00/LEM138:** Esta cepa fue cedida por la Dra. Montserrat Gállego (Banco de cepas de *Leishmania*, Universidad de Barcelona). Se trata de una cepa de *L. donovani* aislada en la India de un paciente de leishmaniosis visceral. Está identificada mediante electroforesis de isoenzimas como *L. donovani* zimodemo MON-2.

***L. major* MRHO/SU/1959/P-STRAIN (BCN-526):** Esta cepa fue cedida por la Dra. Montserrat Gállego (Banco de cepas de *Leishmania*, Universidad de Barcelona). Se trata de una cepa de *L. major* aislada en gran jerbo (*Rhombomys opimus*) en Uzbekistán. Está identificada mediante electroforesis de isoenzimas como *L. major* zimodemo MON-4.

***L. tropica* MHOM/MA/1988/LEM1314:** Esta cepa fue cedida por la Dra. Francine Pratlong (Universidad de Montpellier). Se trata de una cepa de *L. tropica* aislada de un caso de leishmaniosis cutánea en el área de Marrakech (Marruecos) en el año 1988. Está identificada mediante electroforesis de isoenzimas como *L. tropica* zimodemo MON-102.

***Trypanosoma cruzi* MHOM/ES/2003/BCN-590:** Esta cepa fue cedida por la Dra. Montserrat Gállego (Universidad de Barcelona), aislada de un caso de tripanosomiasis congénita en España e identificada como TC1 mediante análisis molecular del espaciador no transcrito del miniexón.

### **3.2. Cultivo de parásitos**

#### **3.2.1. Cultivo de promastigotes de *Leishmania* spp.**

El cultivo se realiza en frascos tipo falcon de 25 cm<sup>2</sup> con volúmenes de 4-10mL de medio RPMI completo y concentraciones de 0-5% de orina humana estéril. Se incuba en una estufa a 24 °C. Cada siete días se debe realizar una resiembra: este subcultivo se prepara diluyendo aproximadamente diez veces el cultivo original en medio RPMI completo fresco a temperatura ambiente en un nuevo frasco tipo falcon.

#### **3.2.2. Obtención de amastigotes de *Leishmania* spp.**

*Véase apartado 4.2*

#### **3.2.3. Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi***

Se realiza en tubos o frascos tipo falcon de 25 cm<sup>2</sup> con medio EMTM sólido y hasta 5 mL de RPMI completo como fase líquida. Se incuba en una estufa a 28 °C. Semanalmente se realiza una resiembra, diluyendo aproximadamente diez veces una alícuota del cultivo original con medio RPMI completo fresco y precalentado a 28 °C en un nuevo frasco tipo falcon de 25 cm<sup>2</sup> con medio EMTM sólido.

#### **3.2.4. Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi***

Para su obtención, se realiza la infección de un cultivo de fibroblastos L929 con epimastigotes de *T. cruzi* en una proporción 5:1. Se incuba a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3h, tras las que se cambia el medio de cultivo, eliminando los epimastigotes no interiorizados. Se continúa su incubación durante 72h a partir de las cuales se pueden obtener formas tripomastigote del medio de cultivo que pueden ser utilizadas para la infección de macrófagos o fibroblastos con el objetivo de evaluar productos frente a amastigotes intracelulares (*véase apartado 4.2*).

### **3.3. Líneas celulares de mamífero**

#### **3.3.1. Fibroblastos L929**

Se obtienen del banco de células del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la UGR. Línea de fibroblastos proveniente de tejido conectivo de ratón c34/An, subclon de una línea parental cepa L (Earle et al., 1951). Se cultivan en frascos tipo falcon de 25cm<sup>2</sup> con tapón ventilado, con medio RPMI completo. Las células crecen adheridas al fondo del frasco y para despegarlas es necesario incubarlas con tripsina 0,25% durante 5 min a 37 °C. Se añade RPMI-1640 para inactivar la tripsina, se centrifuga a 800 rpm durante 5', se comprueba su viabilidad y se resiembran en una concentración de 1×10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Es necesario cambiar el medio semanalmente y se resiembran en semanas alternas.

#### **3.3.2. Macrófagos J774.2**

Se obtienen del banco de células del CIC de la UGR. Línea celular monocítica obtenida de un tumor de ratón Balb/c (Ralph and Nakoinz, 1977). Se cultivan en frascos tipo falcon ventilados con medio RPMI completo a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Esta línea celular crece parcialmente adherida al fondo de frasco. Para su resiembra, se despegan del fondo del frasco utilizando un raspador de células. Se centrifugan a 800 rpm durante 5 min., se comprueba su viabilidad y se resiembran a una concentración de 2×10<sup>5</sup> células/mL. Es necesaria su resiembra cada 72h.

### **3.4. Extracción y cultivo de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón**

Para la evaluación *in vitro* de la actividad antiparasitaria de los compuestos, se utilizan macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM $\phi$ , Bone Marrow Derived Macrophages). Se utilizan ratones Swiss ICR (CD-1). Para la obtención y cultivo de los macrófagos derivados de la médula ósea de estos ratones se utiliza el protocolo seguido por Zamboni y Rabinovitch en 2003.

1. Se sacrifica el animal por dislocación cervical. Se esteriliza la zona de corte, se corta la piel y se retira de las patas. Se corta por debajo de la rodilla y por encima de la cabeza del fémur (cadera) sin cortar las epífisis. Se realiza el mismo procedimiento con la tibia, separándola con cuidado por la articulación del tobillo. Se limpia el hueso y se lava en alcohol 70%. Se introduce en PBS y se termina de limpiar con una gasa eliminando los restos de tejido muscular.
2. En condiciones de esterilidad, se corta las epífisis y se lava el interior del hueso con 5mL de medio R2030 sobre una placa de cultivo celular, utilizando una aguja de 21G o de menor diámetro. Se lava hasta extraer la médula. Se disgrega la médula ósea con la propia aguja o utilizando el émbolo de una jeringa como pistilo.
3. Se mantienen a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.
4. Se cultivan 7 días, el cuarto se añaden 10 mL de medio R2030 a cada placa de cultivo. Los macrófagos estarán adheridos.
5. Pasados 7 días, se retira el medio de cultivo (eliminando células no diferenciadas que no están adheridas) y se añaden a cada placa de cultivo celular PBS frío estéril dejando reposar en hielo durante 10-15 min.
6. Se hace pasar un raspador de células lentamente hasta despegar los macrófagos. Una vez despegados, se recogen lentamente, se centrifugan a 1500rpm 10' y se resuspenden en medio R105.
7. Se cuentan los BMDM $\phi$  en cámara de Neubauer y se reparten 4 $\times$ 10<sup>5</sup> BMDM $\phi$  /mL en los pocillos de una placa de 24 pocillos con cubreobjetos de cristal en el fondo. Se completa con medio R105 hasta 400  $\mu$ L/pocillo y se deja 24h para su completa adhesión.

### **3.5. Criopreservación de células**

Para la criogenización celular de parásitos o de líneas celulares, se selecciona un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Se recogen las células por centrifugación y se resuspende en medio RPMI completo con 5% de DMSO. Se reparte la suspensión en criotubos de 2 mL para congelación que se introducen en el congelador de -85°C para su congelación gradual envolviendo los criotubos en capas de papel para amortiguar el descenso térmico. En 48h se pueden traspasar estos viales a un contenedor con N<sub>2</sub> líquido manteniéndose congelados a -196°C.

#### **3.5.1. Descongelación de células**

Al contrario que la congelación que debe ser gradual, la descongelación de cepas criogenizadas se ha de hacer rápidamente. Se introduce un vial de cultivo recién sacado del contenedor de N<sub>2</sub> líquido en un baño ajustado a 37 °C hasta su total descongelación. Se comprueba la viabilidad de las células y se reparten en frascos o tubos de cultivo celular dependiendo del tipo de células.

#### 4. Ensayos *in vitro*

##### 4.1. Evaluación de la actividad de los compuestos sobre promastigotes de *Leishmania* spp.

Para evaluar el efecto antiparasitario frente a promastigotes, se utiliza un ensayo colorimétrico basado en el uso del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). En este ensayo, las células viables, reducen este producto mediante las enzimas oxidoreductasas NADPH dependientes hasta formazán, un producto púrpura insoluble detectable a una longitud de onda entre 500-600 nm.

##### **Procedimiento:**

1. Se incuban  $5 \times 10^5$  promastigotes de *Leishmania* spp. en presencia de concentraciones crecientes del compuesto a evaluar (al menos 5 en el rango 0,5-100  $\mu\text{M}$ ). Se incluyen controles, uno con el diluyente del compuesto y el otro con un producto de referencia (isetionato de pentamidina 5  $\mu\text{M}$ ). El experimento se realiza en triplicado. Se incuban a 24 °C durante 48h.
2. Se centrifuga el cultivo a 2000 rpm durante 10' y se lava con PBS. Se resuspende en 100  $\mu\text{L}$  de PBS añadiendo MTT hasta una concentración de 5 mg/mL. Se incuba en oscuridad durante 3h.
3. Tras el tiempo de incubación se añaden 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol ácido (0,04 N HCl) para disolver el formazán.
4. Se coloca esta suspensión en una placa de microtitulación y se lee la absorbancia a 570 nm, usando de referencia una longitud de onda de 690 nm para eliminar el ruido de fondo. La absorbancia de cada pocillo se calcula sustrayendo la absorbancia a 690 nm a la absorbancia a 570 nm, del siguiente modo:  $\text{Abs}_{\text{Pocillo}} = \text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{690}$
5. El resultado se interpreta como % de viabilidad del parásito. Este porcentaje se calcula utilizando la absorbancia del control con diluyente, de este modo:  $(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Test}}) / \text{Abs}_{\text{Control}} \times 100$ .
6. Se realiza un análisis de regresión lineal para calcular la  $\text{IC}_{50}$  del producto evaluado.

**4.2. Evaluación de la actividad de los compuestos frente a amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp. o *T. cruzi***

Se realizó el procedimiento descrito por Zauli-Nascimento et al. en 2010:

- 1- Infección: Se preparan placas de 24 pocillos (Greiner, Alemania) con cubreobjetos redondos en el fondo de estos. Se añaden a cada pocillo  $4 \times 10^5$  BMDM $\phi$  y se incuban a 37 °C 5% CO<sub>2</sub> hasta que se adhieran. Para la infección se usan promastigotes en fase estacionaria de *Leishmania* spp., que se obtienen entre el quinto y el sexto día de cultivo o tripomastigotes de *T. cruzi* (ver su obtención en apartado **3.2.4**). Se cuentan en un hemocitómetro o cámara de Neubauer, se retira el medio de los macrófagos y se añaden a cada pocillo  $4 \times 10^6$  parásitos (proporción 10 parásitos por BMDM $\phi$ ) en un volumen de medio R105 no superior a los 200  $\mu$ L para facilitar el contacto con los macrófagos. Se dejan 2h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras ese tiempo se lava con medio RPMI-1640 varias veces para eliminar los parásitos no fagocitados.
- 2- Incubación con productos: Tras la infección se añade a cada pocillo medio R105. Se añade el compuesto disuelto en DMSO a distintas concentraciones. Para el ensayo usamos también pocillos con medio R105 sólo como control de infección; pocillos con medio R105 y 0,5% de DMSO como control de diluyente; y pocillos con isetionato de pentamidina 1  $\mu$ M como control de referencia. Se incuban durante 48h. Cada concentración de compuesto o control se realiza en triplicado
- 3- Preparación de los cubres: Pasadas las 48h se lavan los pocillos varias veces con PBS y se dejan secar los cubres. Se fijan con metanol durante 3 minutos, se retira y se deja secar. Luego se tiñen los cubres con tinción Giemsa al 20% en agua durante 30 minutos. Una vez teñidos se lava con agua varias veces para eliminar los restos y se deja secar. Finalmente se adhieren los cubres sobre un porta utilizando el medio de montaje DPX.
- 4- Evaluación de los resultados: Para cuantificar el efecto de los productos sobre los amastigotes intracelulares, se cuentan al menos 200 macrófagos cuantificando los infectados y los no infectados; además se cuenta el número de amastigotes intracelulares. Con ello se obtiene para cada cubre el porcentaje de infección. Posteriormente se calcula la reducción de infección comparando el dato anterior con el porcentaje de infección de

los controles. Además, en cada cubre se observa el número de macrófagos, su morfología y las anomalías que puedan tener con el fin de estimar si existe citotoxicidad sobre éstos.

- 5- Análisis estadístico: Una vez obtenidos los resultados, realizamos un análisis de regresión lineal usando como variable dependiente la reducción de la infección y como variable explicativa la concentración del producto con el fin de estimar la  $IC_{50}$ . Analizamos también la posible asociación del porcentaje de infección inicial de los macrófagos con la reducción de la infección construyendo un modelo de regresión múltiple. Los datos se analizaron usando el paquete estadístico STATGRAPHICS 5.0.

### **4.3. Ensayos de citotoxicidad celular y determinación de índice de selectividad**

#### **4.3.1. Citotoxicidad celular**

Para la evaluación de la concentración citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) de los compuestos sobre células de mamífero, se utilizó el ensayo de azul de Trypan. Este ensayo consiste en la adición de este reactivo al medio de cultivo donde se encuentran las células. Al ser un colorante vital, solo penetra en las células cuya membrana plasmática se encuentra dañada (y por tanto muertas) y que se muestran con una coloración azul al microscopio óptico.

El reactivo Trypan Blue<sup>®</sup> se adquirió de Sigma en forma de polvo sólido. Para su utilización se disuelve en PBS pH 7.2 al 0,4%.

El ensayo se realiza en una placa de 24 pocillos, utilizando  $1 \times 10^4$  macrófagos J774.2 o fibroblastos L929 por pocillo en 400  $\mu$ L de RPMI completo. Se evalúan al menos cinco concentraciones del compuesto a analizar, en triplicado, añadiendo un control sin tratamiento y un control de diluyente (DMSO 0,5%). Se incuban las células con los productos durante 72h. Tras la incubación, se despegan las células mediante tripsinización (L929) o raspado (J774.2), se centrifugan y resuspenden en 400  $\mu$ L de RPMI-1640 sin rojo fenol. A continuación se mezclan 10  $\mu$ L de esa suspensión con 40  $\mu$ L de solución madre de azul de Trypan y 50  $\mu$ L de PBS pH 7.2 y se colocan en un hemocitómetro o cámara de Neubauer por duplicado. Se cuenta el número total de células y el número de células muertas (color azul) y se calcula la viabilidad de cada pocillo y el número total de células por pocillo.

#### IV. Material y Métodos

A continuación se compara el número de células vivas de los pocillos tratados con compuestos con el de los pocillos control y se calcula la viabilidad relativa con respecto al control. Realizando un análisis de regresión, se calcula la concentración a la que la viabilidad es del 50%, denominada CC<sub>50</sub>.

##### **4.3.2. Determinación del índice de selectividad**

El índice de selectividad (SI) es un parámetro que relaciona la actividad de un compuesto (IC<sub>50</sub>) con su citotoxicidad celular (CC<sub>50</sub>) mediante la siguiente fórmula:

$$SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

Este índice refleja el nivel de selectividad del compuesto frente al parásito, descartando la actividad de tipo inespecífico y la citotoxicidad.

##### **4.4. Estrategia de cribado o “screening” de compuestos**

Para el cribado de los compuestos derivados del SAHA se utilizó una estrategia basada en dos criterios:

Criterio de actividad: Para considerar prometedor un compuesto se estableció un límite de IC<sub>50</sub> frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*. Los compuestos con una IC<sub>50</sub> ≤ 10 μM fueron considerados para la evaluación de su toxicidad y de su actividad frente a amastigotes intracelulares de otras especies de *Leishmania* y *T. cruzi*.

Criterio de citotoxicidad: Para considerar su uso sobre modelos in vivo, se estableció también un límite de citotoxicidad. El compuesto debe tener una CC<sub>50</sub> ≥ 100 μM o un SI ≥ 20.

#### **4.5. Ensayos in vitro para la evaluación del mecanismo de acción**

##### **4.5.1. Determinación de óxido nítrico en los macrófagos**

Para la determinación de la producción de óxido nítrico (NO\*) se utilizó la reacción de Griess. Esta prueba detecta la presencia y concentración de nitritos orgánicos en la muestra. En los sistema biológicos, el NO\* se oxida rápidamente a nitrito o nitrato. Se realiza en dos pasos: adición a la muestra de un agente diazotador, ácido sulfanílico, formando con los aniones NO<sub>2</sub><sup>-</sup> una sal de diazonio, compuesto intermedio al que se añade N-naftil-etilendiamina (NED) para formar un compuesto estable y detectable a 540nm. La concentración se interpola en una recta elaborada con concentraciones crecientes de NaNO<sub>2</sub>.

Para la cuantificación de la producción de NO\* en cultivo, se utilizan BMMΦ o J774.2 infectados con amastigotes de *Leishmania* spp. y tratados con el compuesto del que se quiere evaluar su capacidad estimuladora de la síntesis de NO\*.

De este modo, se puede evaluar la influencia de la infección por el parásito, del tratamiento con compuestos o de ambos sobre la producción de óxido nítrico.

Procedimiento:

1. Incubación de  $4 \times 10^5$  macrófagos con promastigotes en fase estacionaria de *Leishmania* spp. en una proporción promastigote:macrófago de 1:1, 5:1 o 10:1.
2. Tras 2h de infección, se cambia el medio de cultivo por RPMI completo sin rojo fenol, se adiciona el compuesto a concentraciones crecientes y se incuban durante 48h. Cada concentración se evalúa por triplicado.
3. Tras la incubación se recoge el sobrenadante de los pocillos y se almacena a -20 °C.
4. Se añaden 100 µL de sobrenadante a 100 µL de reactivo de Griess. Se incuba 10 min. a temperatura ambiente en oscuridad. Como control blanco se realiza la misma reacción con medio de cultivo fresco.
5. Se leen las absorbancias a 570 nm y 650 nm y se restan, restando también el resultado de la anterior sustracción en el blanco.
6. Se interpolan en la recta de calibrado realizada con NaNO<sub>2</sub> con concentraciones entre 0-100 µM.

#### IV. Material y Métodos

Composición del reactivo de Griess: El reactivo de Griess está compuesto por dos soluciones, A y B, que se almacenan a 4 °C y se mezclan a partes iguales antes de iniciar el ensayo.

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
<b>A</b>	Sulfanilamida 1%
<b>B</b>	N-naftiletilendiamina 0,1% en 5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .

Todos los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich.

##### **4.5.2. Ensayo de influencia sobre la actividad enzimática en promastigotes**

Una forma de estudiar la influencia de un compuesto sobre la actividad enzimática del parásito, consiste en utilizar un versión modificada del ensayo MTT, dado que éste mide la actividad de enzimas deshidrogenasas, principalmente de la mitocondrial, y por tanto dar una idea de daño a nivel mitocondrial (Berridge et al., 2005).

El ensayo se realiza de igual manera al indicado en el *apartado 4.1*, con la diferencia de que la incubación con el compuesto se realiza en un tiempo menor o igual a 4h, de forma que las células son aún viables y las diferencias en las medidas espectrofotométricas se deben a diferencias en la actividad enzimática y no a la viabilidad de las células.

##### **4.5.3. Ensayo de influencia sobre la sensibilidad óxido nítrico**

La resistencia a óxido nítrico en *Leishmania* está determinada por enzimas antioxidantes presentes principalmente en la mitocondria. Con este ensayo se pretende determinar la influencia de ciertos compuestos sobre la resistencia a NO, posiblemente a través del daño sobre la mitocondrial de estos compuestos.

Se utilizó el protocolo seguido por Giudice et al. en 2007.

1. Se recogen por centrifugación promastigotes de *Leishmania* spp. de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento.
2. Se incuban  $5 \times 10^6$  promastigotes/pozo (en tantos pozos necesarios para evaluar la sensibilidad a NO\* en el siguiente paso) en medio RPMI completo sin rojo fenol durante 2h en presencia de compuesto o su diluyente (DMSO 0,5%).

3. Se centrifugan para eliminar el medio, se lava con HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) y se incuban  $5 \times 10^6$  promastigotes/pozo en HBSS pH 5,0 con concentraciones crecientes de  $\text{NaNO}_2$  (0-20 mM) durante la noche.
4. Nuevamente se centrifugan y se resuspenden en 100  $\mu\text{L}$  HBSS pH 7,4 y MTT 0,5 mg/mL. Se incuban 3h en oscuridad a 24 °C.
5. Se miden las absorbancias y se calcula la viabilidad como en el apartado 4.1.

#### 4.5.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se utiliza la microscopía electrónica de transmisión para encontrar alteraciones ultraestructurales en los amastigotes intracelulares tratados con los distintos compuestos.

Para ello se realiza un experimento similar a los de la evaluación sobre amastigotes intracelulares utilizando BMDM $\phi$ , con la diferencia de que no se utilizan cubreobjetos y las células quedan adheridas a la placa de 24 pozillos. El ensayo se realizó con el parásito *L. tropica*. Los compuestos utilizados y sus concentraciones fueron los siguientes:

- Control: Sin tratamiento
- Compuestos a evaluar a las concentraciones  $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$

Tras la incubación, se retira el medio de cultivo, se lavan los pocillos dos veces con PBS y se añade a cada uno 1 mL de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato pH 7,4 durante media hora.

Las placas de 24 pocillos con fijador (Glutaraldehído 2%) fueron entregadas al servicio de preparación de muestras biológicas del CIC de la UGR, que prepararon las muestras para microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Libra 120 Plus de Carl Zeiss y se obtuvieron fotografías para ser analizadas.

## **5. Ensayos *in vivo* en animales de laboratorio**

### **5.1. Animales de experimentación: Ratones**

La manipulación, alojamiento y sacrificio de los animales de experimentación se realizó acorde a la normativa vigente y siguiendo las recomendaciones éticas de FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations).

**Ratones Swiss albino ICR (CD-1):** Se adquirieron de Harlan Ibérica S.A ratones hembra de 30g de peso. Se trata de un tipo de ratón no consanguíneo ampliamente utilizado en estudios de toxicidad.

**Ratones Balb/c Ola Hsd:** Se adquirieron de Harlan Iberica S.A ratones hembra de 3 semanas de edad. Es un tipo de ratón consanguíneo ampliamente utilizado como modelo experimental en todo tipo de enfermedades.

**Alojamiento:** Los ratones se alojaron en las instalaciones pertinentes, en jaulas de 1000 y 500 cm<sup>2</sup> de forma que no excedieran el número aconsejado por superficie. Dispusieron de agua y comida estándar (Harlan Ibérica S.A) *ad libitum* así como climatización (22 °C 50% humedad) y ciclos día/noche de 12h.

**Sacrificio:** Se optó por el procedimiento de dislocación cervical al ser el más rápido e indoloro, además de no necesitar anestesia.

**Autorización:** Los experimentos realizados en roedores fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Granada con el código de registro de entrada de documentos 455-2013-CEEA.

### **5.2. Ensayos en ratones experimentalmente infectados**

#### **5.2.1. Modelo experimental**

**Animales:** Para las infecciones experimentales se utilizaron ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad

**Infección experimental:** La infección experimental de los ratones se realizó con  $1 \times 10^7$  promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* (cepa MCAN/ES/2007/DP534) por vía intraperitoneal.

Tras un cultivo de 4-6 días, los promastigotes en fase estacionaria son recogidos y centrifugados a 2200rpm durante 10' a 4 °C. Se lava el botón dos veces con SSF y se calcula la concentración de parásito en un hemocitómetro. Se ajusta la dosis infectiva en 500 µL de SSF y se mantiene en frío hasta la inoculación en el ratón.

Se desinfecta la piel del animal con alcohol 70%, se retrae la zona abdominal del animal con un movimiento seco y se inocula el parásito utilizando una aguja de 21G en la zona derecha del abdomen a la altura de la rodilla del ratón, insertando la aguja no más de 1 cm.

**Diseño Experimental:** Tras la infección, los animales se dividen en grupos de 7 ratones cada uno. El tamaño muestral se calculó utilizando las medias y desviaciones estándar de las cargas parasitarias en hígado y bazo de los ratones infectados en los primeros experimentos de tratamiento, para un nivel de confianza del 95%. En todos los experimentos realizados, se sigue el siguiente esquema de grupos:

- Grupo Control negativo: Ratones tratados con una dosis diaria de diluyente y por la misma vía de inoculación que el producto a evaluar, durante el mismo tiempo que el tratamiento con ese producto. En caso de haber más de un grupo de ratones tratados con el mismo producto a evaluar, se utiliza la dosis de diluyente equivalente a la máxima dosis de compuesto.
- Grupo Control de referencia: Ratones tratados con 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día de antimonio de meglumina por vía intraperitoneal, durante el mismo tiempo que el producto a evaluar.
- Grupo Combinación: Ratones tratados por vía intraperitoneal con una combinación de 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día de antimonio de meglumina y con una dosis del producto a evaluar.
- Grupo Producto a evaluar: Tratado con una dosis de producto a evaluar.

Las características del modelo experimental definitivo utilizado se ensayaron experimentalmente y su elección se explica detalladamente en la sección "Resultados".

### 5.2.2. Toma de muestras de órganos y tejidos de ratón y su procesamiento

Los ratones fueron sometidos al siguiente proceso de toma de muestras:

- **Sangre periférica:** Para la obtención de suero, con el animal aún vivo, se introduce el ratón en un tubo de contención y se corta aproximadamente 1mm de la punta de la cola, se masajea la cola suavemente obteniendo sangre periférica en un tubo eppendorf. La sangre se almacena a 4 °C y se separa posteriormente el suero centrifugando a 1500rpm 15' a 4 °C.
- Tras el **sacrificio**, se lava la piel del animal con alcohol 70% y se introduce en la cabina de flujo laminar, se coloca en una mesa de operaciones estéril con sujeciones adecuadas. Se corta un pellizco de piel sobre la zona del esternón y se retira toda la piel de la zona abdominal. Una vez limpia de pelo la zona del peritoneo, se abre éste y se retiran el intestino grueso y el delgado, facilitando el acceso al bazo y al hígado.
- **Bazo e hígado:** Se introducen en sendos tubos eppendorf estériles previamente pesados y se pesan nuevamente. Se dividen estos órganos en distintas fracciones: (1) una parte se reserva para estudios histológicos; (2) un trozo de aproximadamente 20 mg se introduce en un tubo eppendorf estéril pesado para extracción de ADN, que se almacena a -20 °C hasta su procesamiento; (3) un trozo de aproximadamente 20 mg se procesa inmediatamente para cultivo del parásito: el trozo se homogeneiza en 1 mL de SSF estéril con 200 U/mL de bencilpenicilina sódica con un pistilo estéril y se reparte en tubos de 5 mL con EMTM sólido; (4) con el último trozo se realizan improntas.
- **Médula ósea:** La médula ósea se extrae como previamente se explicó (*apartado 3.4*) para la obtención de macrófagos, con la diferencia de que se lava con SSF sobre un tubo eppendorf estéril. Esta suspensión se inocula en medio de cultivo de parásitos.
- **Riñón:** Se extrae el riñón y se pesa utilizando un tubo eppendorf previamente pesado. El órgano se reserva para realización de cortes histológicos.

### **5.2.3. Evaluación de la eficacia frente a *L. infantum* de los compuestos**

Para evaluar la eficacia del tratamiento se llevó a cabo:

1. El aislamiento de *L. infantum* de tejidos de ratón.
2. El análisis microscópico de las improntas de los tejidos.
3. La determinación de la carga parasitaria en los dos órganos diana principales (bazo e hígado) mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).

#### **5.2.3.1. Aislamiento de *L. infantum* de tejidos de ratón infectado.**

Se incuban los tubos de cultivo que contienen el homogeneizado de hígado o bazo a 24 °C y tras una semana se realiza un subcultivo en tubos de EMTM sólido nuevos con RPMI completo. Los cultivos se observan durante al menos un mes antes de descartarlos. La presencia de promastigotes en los cultivos indica la presencia de amastigotes en el tejido.

#### **5.2.3.2. Improntas de tejido.**

El trozo de órgano destinado a este fin se corta de forma transversal y se realizan improntas o huellas con la zona de corte tocando suavemente la superficie de un portaobjetos limpio, desengrasado y seco. Se hacen varias improntas para luego cortar una segunda vez y repetir el procedimiento. Se realizan tantas improntas como quepan en el portaobjetos. Las preparaciones se dejan secar, se fijan con metanol puro durante 1' y se tiñen tinción Giemsa al 10% durante 30 min. Se observan al microscopio óptico.

#### **5.2.3.3. Extracción de ADN de órganos de ratón**

Este procedimiento se lleva a cabo en una habitación independiente a la de los cultivos para evitar contaminación cruzada. Dado que se utilizaron tejidos caracterizados por la presencia de sangre, se utilizaron kits de ADN comerciales que incluyeran una fase de lisis de glóbulos rojos, seguida de las etapas de lisis celular, precipitación proteica, aislamiento de ADN y lavado. Paralelamente a cada lote de muestras, se extrae el ADN a un control de extracción sin muestra, que incluye los mismos tubos eppendorf y reactivos que la muestra con el objetivo de descartar contaminación cruzada en la zona de extracción.

#### IV. Material y Métodos

Se utilizó el kit comercial Real SSS DNA Extraction Kit (Real, España). Como paso previo se pesa el fragmento de órgano y se homogeneiza en SSF con un pistilo estéril nuevo, empezando entonces la extracción de ADN. Primero se incuba el homogeneizado con solución de lisis de glóbulos rojos durante 10 min. Se centrifuga y elimina el sobrenadante, añadiendo la solución de lisis celular, se homogeneiza y se incuba a 37 °C durante 10 min. A este homogeneizado se le añade la solución de precipitación proteica y se agita por vortex durante 30s, se centrifuga y el sobrenadante se añade a un nuevo tubo con isopropanol. Se agita por inversión 50 veces y se centrifuga para obtener el botón de ADN, que se lava con etanol 70%, se deja secar para evaporar el etanol restante y se rehidrata en 20 µL de agua bidestilada estéril a 65 °C durante 1h en agitación. La solución de ADN resultante se conserva a -20 °C hasta su uso.

##### **5.2.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

Esta técnica (Morales-Yuste, Tesis Doctoral, 2012) es una modificación de la PCR-ELISA descrita por Martín-Sánchez et al. (2001). Se basa en la amplificación de un fragmento de 75pb del minicírculo del ADN del kinetoplasto utilizando sus mismos cebadores. Incluye una sonda marcada con el fluoróforo FAM en 5' y el "apantallador" (quencher) TAMRA en 3', complementaria de una región de ese fragmento.

#### **Cebadores y sonda**

Se utilizaron los siguientes cebadores y sonda:

	<b>Secuencia</b>
<b>Forward</b>	5'-CAAAAGTCCCCACCAATCCC-3'
<b>Reverse</b>	5'-AAACCCTGGTCTGGAGGCTTAG-3'
<b>Sonda</b>	FAM-CCAAACAGGGCAAAAACCCCAAAATGAAGA-TAMRA

### Condiciones

La composición de la reacción de qPCR, utilizando el kit comercial Brilliant II QPCR MasterMix® (Agilent, Estados Unidos) que incluye la polimerasa, el tampón, los nucleótidos trifosfato y cloruro de magnesio optimizados para la reacción, fue la siguiente:

Componente	Concentración	Volumen (µL)	Concentración
<b>MasterMix</b>	2x	12,5	1x
<b>Forward</b>	9,868 µM	0,38	150 nM
<b>Reverse</b>	9,943 µM	0,88	350 nM
<b>Sonda</b>	10 µM	0,25	100 nM
<b>ADN</b>	-	1-5	-
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	csp 25 µL	-

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Segmento	Ciclos	Lectura
<b>Desnaturalización</b>	1	95° C 10 min
<b>Amplificación</b>	40	95 °C 30s
		60 °C 1 min
		Punto final

### Curva de calibrado

Con el fin de utilizar esta técnica con fines cuantitativos, se utiliza una curva de calibrado (Morales-Yuste, Tesis Doctoral, 2012) en la que se interpolan los valores de Ct (Cycle threshold o ciclo umbral) de cada muestra. Esta curva se elaboró utilizando diluciones seriadas de ADN equivalente de 1000, 500, 250, 62,5, 15,6, 3,9, 0,9 y 0,09 promastigotes de *L. infantum*, utilizando una media de 4 réplicas por punto. Esta curva ofrece un coeficiente de determinación de 0,975 y una eficiencia del 99,5%. La sensibilidad de esta qPCR es elevada, siendo capaz de detectar hasta 0,09 parásitos/µL de sangre y es específica de *L. infantum*.

## IV. Material y Métodos

### 5.2.3.4.1. Determinación de la carga parasitaria en órganos de ratón

Cada muestra de ADN de órgano se analiza por qPCR por triplicado, utilizando 1, 1 y 2  $\mu\text{L}$ . Para cada réplica se obtiene un resultado de Ct que se interpola en la recta de calibrado, obteniendo el número de parásitos presente en cada tubo. Si el tubo contiene 1  $\mu\text{L}$  de los 20  $\mu\text{L}$  en los que se resuspendió el ADN correspondientes a los miligramos de órgano previamente pesado, se puede obtener el número de parásitos por miligramo de órgano. Se calcula para cada una de las réplicas y se utiliza la media de éstas como valor definitivo.

### 5.2.3.4.2. Análisis de los resultados

La eficacia del tratamiento con los distintos compuestos se evaluó determinando los valores de reducción de carga parasitaria.

Para cada ratón tratado se calcula el porcentaje de reducción de la carga parasitaria según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción de Carga parasitaria} = \frac{(CpC - CpT)}{CpC} \times 100$$

Donde CpC es la carga parasitaria media de los ratones control y CpT es la carga parasitaria de cada ratón tratado.

Este parámetro permite la comparación entre resultados de experimentos con cargas parasitarias generales muy distintas.

## 5.3. Evaluación de la toxicidad

### 5.3.1. Ensayos de toxicidad aguda y subaguda en ratones sanos

Como paso previo al tratamiento de los animales infectados con los productos, se realizó un ensayo de toxicidad en animales sanos.

**Dosis:** Se utilizó el método Fixed Dose Procedure (FDP) que clasifica el compuesto en categorías dependiendo del resultado de la administración de dosis elevadas del compuesto. Para los compuestos derivados hidroxalámicos se utilizó una dosis máxima de 500 mg/kg o inferiores por vía intraperitoneal mientras que para (-)- $\alpha$ -bisabolol se utilizó una dosis de 1000 mg/kg por vía oral.

**Animales:** Se utilizaron ratones sanos albinos Swiss ICR (CD-1) de 25-30g de peso.

**Diseño experimental:** Los ratones se dividieron en grupos de 5 animales cada uno. Cada grupo fue tratado con una dosis del producto y se incluyó un grupo control, tratado únicamente con el diluyente o vehículo del compuesto a evaluar.

-Para los ensayos de toxicidad aguda, se administró una dosis de 500 mg/kg de compuesto derivado hidroxámico o de 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol.

-Para los ensayos de toxicidad subaguda, los animales recibieron una dosis diaria del compuesto derivado hidroxámico (50, 100 o 200 mg/kg) o de (-)- $\alpha$ -bisabolol (50, 200 o 1000 mg/kg) durante 14 días.

Tras la última dosis los animales fueron observados durante dos semanas más antes de ser sacrificados. Tras el sacrificio, se les sometió a las mismas pruebas de toxicidad que a los animales del modelo experimental de infección indicadas en el apartado 5.3.2

**Criterio de toxicidad:** La ausencia de mortalidad y de toxicidad en los animales, objeto de estos ensayos, categoriza al compuesto como inocuo y permite la evaluación in vivo de su eficacia frente a *L. infantum*.

### **5.3.2. Toxicidad en animales infectados experimentalmente y tratados con los compuestos**

Los animales se pesaron periódicamente desde el inicio del tratamiento hasta su sacrificio.

Se observó su comportamiento, buscando signos que pudieran delatar dolor o sufrimiento, como falta de actividad o de respuesta a estímulos, de acicalamiento, piloerección, temblores o espasmos, cambios posturales (arqueamiento dorsal) y agresividad. También se observó la presencia de diarrea.

Tras su sacrificio se pesaron sus órganos (bazo, hígado y riñones) buscando organomegalia.

**Pruebas bioquímicas y enzimáticas:** Se realizaron utilizando kits comerciales (BioSystems, España). Como muestra se utilizó suero. Para las determinaciones se utilizó un espectrofotómetro estándar con un amplio rango de longitudes de onda, baño termostataado y cubetas de plástico de 1 cm de paso de luz.

**Urea:** Se utilizó el método de la ureasa/glutamato deshidrogenada, con medidas en el rango ultravioleta. Se utiliza en la evaluación de la función renal.

#### IV. Material y Métodos

**Creatinina:** Se utilizó el método del picrato alcalino, a 37 °C y lecturas a 500 nm. Sirve para la evaluación de la función renal.

**Transaminasas: Alanina Aminotransferasa (ALT/GPT) y Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT):** Se utiliza un método enzimático acoplado a malato deshidrogenasa (AST) o lactato deshidrogenasa (ALT) con medidas a 340nm. Se utilizan como prueba de funcionalidad hepática, pues sus valores aumentan en caso de enfermedad o de administración de algunos medicamentos.

**Fosfatasa alcalina:** Se utiliza un método colorimétrico con medidas a 405nm. Se utiliza como prueba de alteraciones hepatobiliares y hepatotoxicidad tras la administración de fármacos.

Se realizó el **análisis histológico** de los trozos de bazo, hígado y riñón reservados para este propósito. Para ello se cortan de forma longitudinal, dejando una lámina fina que se lava con SSF estéril y se introducen en un tubo estéril con 5 mL de solución de formalina tamponada (Formol 10% en PBS pH 7,2) que se almacenan a 4 °C. Posteriormente estas muestras se remiten al Servicio de Microscopía del CIC de la UGR donde se fijan e incluyen en bloques de parafina y se realizan cortes histológicos con micrótopo, que se tiñen con hematoxilina-eosina.

Posteriormente se observaron al microscopio óptico los cortes histológicos prestando atención a características histopatológicas como necrosis, infiltración leucocitaria, fibrosis, glóbulos rojos, número y morfología de los hepatocitos y células tubulares.

#### **5.4. Análisis estadístico**

Se analizó la normalidad de los resultados utilizando el test de Saphiro-Wilk. Se eliminaron valores atípicos utilizando criterios restrictivos con el fin de eliminar solo los atípicos más evidentes.

Para los valores con distribución normal se utilizó el test t de Student para comparar dos muestras o la prueba ANOVA en caso de más de dos muestras, complementándolo con el test de los rangos múltiples.

Para los valores que no se ajustasen a una distribución normal, se utilizaron tests no paramétricos como el test de Mann-Whitney (dos muestras) o el test de Kruskal-Wallis (más de dos muestras).

## **6. Ensayo clínico piloto en perros infectados por *L. infantum* de forma natural**

### **6.1. Condiciones del Ensayo**

#### **6.1.1. Alojamiento**

Los perros se alojaron en las instalaciones de la Sociedad Protectora de Animales y Plantas de Granada (Carretera de las Islas s/n, Fuentevaqueros, Granada), inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número ES180790000096, donde dispusieron de un habitáculo adecuado a sus necesidades, con limpieza diaria, acceso al exterior y la luz solar, agua y pienso estándar.

#### **6.1.2. Medidas de bioseguridad**

Se dedicó una nave específica para el alojamiento de los perros del estudio clínico, donde no se alojaron otros animales. Se restringió el acceso a estas instalaciones a los trabajadores e investigadores autorizados. Los trabajadores del centro se acogieron a las medidas de bioseguridad al trabajar en las instalaciones donde se alojaban los perros del ensayo clínico, según las recomendaciones de la Consejería de Agricultura de la Junta de Andalucía.

Durante los ensayos los perros dispusieron de las siguientes medidas destinadas a impedir la picadura del vector:

- Previo al inicio del ensayo, se colocaron mallas de tamaño de poro adecuado alrededor de las instalaciones en accesos y ventanas
- Previo al inicio del ensayo y después mensualmente se fumigaron las instalaciones con fenitritión al 0,1% (Sumal®)
- Uso de Collar Scalibor®, de actividad repelente e insecticida, que contiene Deltametrina al 4%.
- Aplicación de Pipeta Advantix® (Bayer, España), repelente e insecticida, contiene imidacloprid al 10% y permetrina al 40%, aplicado mensualmente durante el periodo de máxima actividad de los flebotomos.

## IV. Material y Métodos

### 6.1.3. Autorización

Los ensayos clínicos en perros fueron autorizados por el CEEA de la Universidad de Granada y por el Comité Andaluz de Experimentación Animal y la Consejería de Agricultura de la Junta de Andalucía con el código de registro de entrada 450-26113.

### 6.2. Muestreo y selección de los perros

Se contactó con dueños de perros que permitieron la realización a sus animales de las pruebas de diagnóstico de la leishmaniosis pertinentes. Tras la selección de los perros, los dueños cedieron voluntariamente a los animales durante un periodo de 7 meses firmando un documento de consentimiento informado.

**Criterios de inclusión:** Los perros se seleccionaron para el ensayo en base a criterios diagnósticos. Para su inclusión en el mismo los animales debían cumplir simultáneamente los siguientes 3 criterios

- Al menos dos signos clínicos compatibles con leishmaniosis canina
- Título de anticuerpos IgG anti-*Leishmania* mayor o igual a 40
- Presencia de parásito en sangre por qPCR

**Criterios de exclusión:** Los perros con alguna de las siguientes características no pudieron ser incluidos en el estudio.

- Tratamiento previo con otro compuesto frente a la leishmaniosis en los últimos dos años
- Perras gestantes o en periodo de lactancia
- Signos renales, hepáticos o cardíacos graves
- Concomitancia de otras enfermedades o infecciones

### 6.3. Procedimiento de toma de muestras

Los animales se pesaron periódicamente y se observó su estado clínico, anotando los distintos aspectos de la sintomatología de cada animal y tomando fotos generales de los perros y en particular de sus signos clínicos (lesiones cutáneas, onicogripos etc). Se tomaron las siguientes muestras:

**Sangre periférica:** La obtención de sangre se realiza por punción en la vena cefálica. Previamente se desinfecta con alcohol la zona de punción y se coloca un compresor elástico en el codo. Se utiliza una aguja de 0,8 mm (21G) y se extraen 5 mL de sangre. Esta sangre se reparte en cuatro tubos:

- Tubo con anticoagulante EDTA para extracción de ADN y análisis molecular.
- Tubo con anticoagulante EDTA para extracción de ARN y análisis molecular.
- Tubo con anticoagulante heparina de litio para análisis bioquímico y enzimático.
- Tubo eppendorf sin anticoagulante para obtención de suero, destinado a detección de anticuerpos.

**Ganglio poplíteo:** Con el animal anestesiado, sobre una mesa desinfectada y en posición decúbito lateral, se depila la zona de las costillas y del hueso poplíteo y se lava con una solución de lejía al 10%. Se palpa y sujeta el ganglio poplíteo y se realiza un aspirado con una aguja de 1,2 mm (18G) y jeringa de 5 mL conteniendo 2 mL de SSF moviendo la aguja en distintas direcciones y tirando del émbolo hasta que se observe enturbiamiento. Parte de este aspirado se deposita en dos tubos con medio EMTM sólido y el resto se deposita en un tubo eppendorf estéril.

**Médula ósea:** En el caso del aspirado de médula ósea, con el animal en la misma posición anterior se realiza la punción con una aguja de 0,9 mm (20G) en la articulación oseteo-condral, tirando del émbolo para ejercer presión y provocar que salga el fluido (1 mL aproximadamente) de la médula ósea. La médula ósea obtenida se deposita en un tubo con anticoagulante EDTA y se mezcla con suavidad; a continuación una alícuota se inocula inmediatamente en medio de cultivo para el aislamiento del parásito y otra se reserva para análisis molecular.

**Pelo:** Con el animal anestesiado, se extraen pelos de la zona interna de las orejas y se colocan en un tubo eppendorf estéril.

Todos los tubos se etiquetan adecuadamente indicando el código del animal y tipo de muestra.

## IV. Material y Métodos

### 6.3.1. Procesamiento de las muestras

#### **Cultivo del parásito a partir de aspirado de ganglio poplíteo o de médula ósea:**

Este procedimiento se realiza inmediatamente a la obtención de aspirado de ganglio o de médula, en un entorno desinfectado con lejía 10% y alcohol 70% y con el uso de un mechero bunsen. Se inoculan dos tubos de cultivo con medio EMTM por muestra. Ya en el laboratorio se añade SSF suplementado con penicilina a los tubos, trabajando en la cámara de flujo.

Se incuban a 24°C y tras una semana se realiza un subcultivo en nuevos tubos de EMTM sólido con RPMI completo. Se observan semanalmente durante al menos un mes. La presencia de promastigotes en los cultivos indica la positividad del tejido.

**Muestras para extracción de ADN:** Se realizan alícuotas de 200 µL de las muestras de sangre y médula ósea en tubos eppendorf estériles y se almacenan a -20 °C. La muestra de aspirado de ganglio se almacena a esas mismas condiciones sin alicuotar. Las muestras de pelo previamente introducidas en tubos eppendorf se almacenan a -20 °C.

**Muestras para extracción de ARN:** Inmediatamente tras su obtención, se coloca una alícuota de 300 µL de sangre en un tubo eppendorf estéril con 500 µL de solución de lisis estabilizadora y se mezcla por inversión. El procedimiento se realiza en un entorno desinfectado y junto al mechero bunsen. Esta muestra se almacena a -85 °C hasta su procesamiento para extracción de ARN.

#### 6.4. Modelo experimental

**Elección de la dosis de compuesto:** Se seleccionó la dosis de compuesto que resultó más eficaz en los ensayos en animales de laboratorio infectados experimentalmente. Esta dosis se adaptó para su administración a perros. Uno de los principales métodos para la extrapolación de dosis entre distintas especies animales es el uso de la superficie corporal como reflejo del metabolismo del animal (Sharma and McNeill, 2009).

**Diseño experimental:** El ensayo clínico constó de 22 perros divididos en 3 grupos de 6 animales cada uno más un cuarto grupo de 4 perros, que son:

- Grupo G: 6 perros tratados con antimonio de meglumina (Glucantime®) a una dosis de 100 mg/kg/día durante dos series de 28 días de duración cada una, separadas entre sí por un mes de descanso, por vía subcutánea.
- Grupo MTC-305: 6 perros tratados con 3,75 mg/kg/día de MTC-305 encapsulado en nanopartículas de oro durante el mismo tiempo por vía subcutánea, con el siguiente esquema para cada serie: 10 días de tratamiento, 8 días de descanso y 10 días de tratamiento.
- Grupo GM (combinación): 6 perros tratados con antimonio de meglumina (Glucantime®) a una dosis de 100 mg/kg/día y 1,5 mg/kg/día de MTC-305 encapsulado en nanopartículas de oro por vía subcutánea siguiendo el anterior esquema.
- Grupo B: 4 perros tratados con 3,33 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva por vía oral durante dos series de 28 días.

**Estructura del seguimiento:** Se realizaron tomas de muestras con vistas al análisis de la eficacia y toxicidad del tratamiento antes de empezar el ensayo y un mes después de terminar cada serie de tratamiento. Además, se incluyó una toma de muestras final pasados 4 meses del último día de la segunda serie de tratamiento con el fin de realizar una evaluación de los animales en ausencia de la presión del compuesto.

El siguiente esquema y el esquema 1 resumen la estructura del ensayo:

Análisis Pre-tratamiento: Un día antes del inicio de la primera serie de tratamiento.  
[Día 0]

Inicio de la primera serie de tratamiento, [Día 1- Día 28].

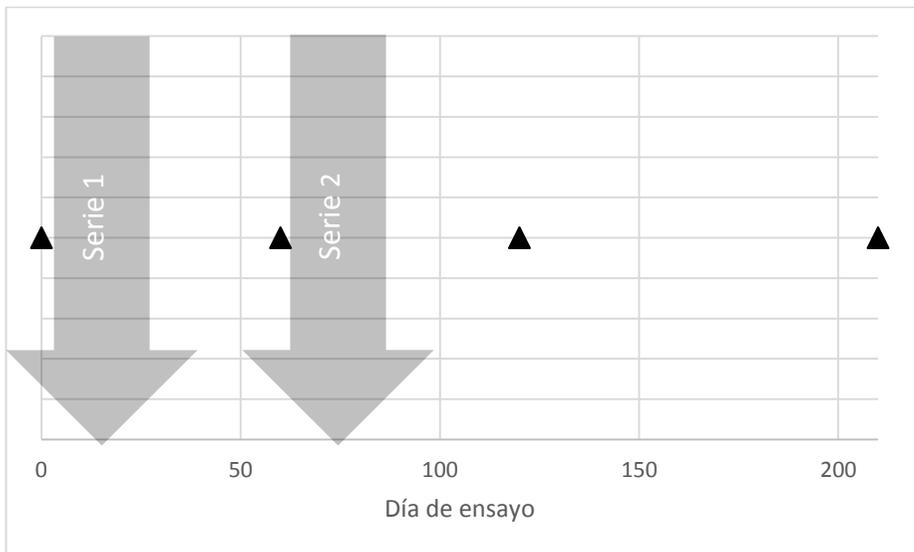
#### IV. Material y Métodos

Análisis Intermedio: Un mes tras el fin de la primera serie de tratamiento y un día antes del inicio de la segunda serie [Día 60].

Inicio de la segunda serie de tratamiento, [Día 61-Día 88].

Análisis Post-tratamiento: Un mes después de finalizar la segunda serie de tratamiento [Día 120].

Análisis Final o de seguimiento: Tres meses después del análisis post-tratamiento [210].



**Esquema 1. Estructura del tratamiento. El diagrama indica los días de análisis realizados (▲) y de las series de tratamiento (flechas)**

## **6.5. Evaluación de la eficacia de los compuestos en el tratamiento de la leishmaniosis canina**

### **6.5.1. Determinación de la carga parasitaria en tejidos**

La determinación de la carga parasitaria en los diferentes tejidos de perro se llevó a cabo utilizando la técnica molecular qPCR indicada en el *apartado 5.2.3.4* para la cuantificación de parásito en los órganos de ratón.

#### **Extracción de ADN de tejidos de perro**

Se utilizó el kit comercial MasterPure (Epicentre, Estados Unidos) con alícuotas previamente medidas de sangre (200  $\mu$ L), médula ósea (200  $\mu$ L) y aspirado de ganglio poplíteo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se añade solución de lisis de glóbulos rojos a las alícuotas de sangre y médula ósea. En el caso de ganglio poplíteo, se centrifuga primero la muestra y solo se añade esta solución si se observan restos de sangre. Se incuba durante 10 min. Tras centrifugar las muestras y eliminar el sobrenadante, se resuspende el sedimento en solución de lisis celular y se mantiene en hielo 5 min. A continuación, se añade la solución de precipitación proteica, se agita en vortex durante 30s y se centrifuga. El sobrenadante se añade a un nuevo tubo con isopropanol. Se agita por inversión 50 veces y se centrifuga para obtener el botón de ADN, que se lava con etanol 70%, se deja secar para evaporar el etanol restante y se rehidrata en 20  $\mu$ L de agua bidestilada estéril a 65 °C durante 1h en agitación. La solución de ADN resultante se conserva a -20 °C hasta su uso. En el caso de la extracción de ADN de pelo, se colocan 10 pelos cortados con bisturí estéril en pequeños trozos en un tubo estéril y se homogeneizan con un pistilo utilizando nitrógeno líquido varias veces hasta observar el material pulverizado. Entonces se añade la solución de lisis celular y 1  $\mu$ L de solución de proteinasa K y se incuba a 56 °C durante 4h. La extracción se continúa con la fase de precipitación proteica como en las demás muestras.

Se realiza una cuantificación de la concentración de ADN utilizando el dispositivo NanoDrop<sup>®</sup> 2000C (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se coloca una gota (1  $\mu$ L) de ADN rehidratado. El dispositivo ofrece la cantidad de ácidos nucleicos en ng/ $\mu$ L y el índice 260/280 y 260/230 que indican la calidad de la muestra. El índice 260/280 tiene un valor ideal de 1,8 para el ADN; un valor inferior indica la presencia de proteínas. El índice 260/230 que también indica la calidad de la muestra, tiene una calidad óptima de ADN cuando toma valores entre 2,0 y 2,2; valores inferiores indican la presencia de contaminantes. La cantidad de ADN

#### IV. Material y Métodos

obtenida se utiliza para poder referenciar la carga parasitaria en las muestras de aspirado de ganglio.

Las condiciones de la reacción de qPCR son las mismas que para la determinación de la carga parasitaria en órganos de ratón, *apartado 5.2.3.4.1*. Cada muestra de ADN de tejido se analiza con qPCR por triplicado, utilizando 1, 1 y 2  $\mu\text{L}$ . Para cada réplica se obtiene un resultado de Ct ("Cycle threshold" o ciclo umbral) que se interpola en la recta de calibrado, obteniendo el número de parásitos presente en cada tubo. Si el tubo contiene 1  $\mu\text{L}$  de los 20  $\mu\text{L}$  con los que se resuspendió el ADN al final de la extracción, correspondientes a un volumen de tejido utilizado en la extracción (200  $\mu\text{L}$  para sangre y médula ósea), se obtiene pues el número de parásitos por microlitro de tejido. Se calcula para cada una de las réplicas y se utiliza la media de éstas como valor definitivo para el análisis. En el caso del ganglio poplíteo, al ser más variable la cantidad de tejido obtenida en cada aspirado, se cuantifica la cantidad de ADN en cada extracción y se ajusta el número de parásitos por cada 1  $\mu\text{g}$  ADN de la muestra. En el caso del pelo, la carga parasitaria extrapolada se divide entre el número de pelos para expresarla en parásitos por pelo.

##### **6.5.2. Determinación de la puntuación clínica (clinical score)**

Con el objetivo de cuantificar el nivel de gravedad clínica en los perros naturalmente infectados, se realizó el cálculo del Clinical Score (Manna et al., 2009, Miró et al., 2009) o puntuación clínica, cuyo valor se obtiene de la suma de las puntuaciones asignadas a cada signo o parámetro bioquímico alterado.

Los signos o hallazgos bioquímicos utilizados en este estudio se han elegido teniendo en cuenta al grado de acuerdo entre diversos autores y a las posibilidades propias de evaluar dicho parámetro. La siguiente tabla los describe y explica la asignación de valores a cada uno:

<b>Signo clínico</b>	<b>Valor de las categorías</b>
<b>Delgadez</b>	Leve=1; Moderada=2; Anorexia=3
<b>Ánimo</b>	Leve=1; Moderada=2; Postración=3
<b>Pérdida de peso (con respecto al último peso)</b>	Leve=1; Moderada=2; Severa=3
<b>Linfadenomegalia</b>	Palpable=1; Moderada=2; Evidente=3
<b>Esplenomegalia</b>	Sí=2
<b>Conjuntivitis/ Blefaritis</b>	Unilateral=1; Bilateral o Unilateral severa=2; Bilateral severa=3
<b>Uveítis/ Queratitis</b>	Unilateral=1; Bilateral o Unilateral severa=2;
<b>Palidez de las membranas mucosas</b>	Leve=1; Moderada=2; Severa=3
<b>Epistaxis</b>	Esporádica=1; Frecuente=2; Persistente=3
<b>Úlceras o nódulos</b>	Uno a dos=1; Más de dos=2; Generalizada=3
<b>Vómito</b>	Esporádica=1; Frecuente=2; Sangriento=3
<b>Diarrea</b>	Esporádica=1; Frecuente=2; Persistente=3
<b>Cojera</b>	Esporádica=1; Frecuente=2; Persistente=3
<b>Onicogriposis</b>	Leve=1; Moderada=2; Severa=3
<b>Hiperqueratosis en trufa y plantillas</b>	Trufa o plantillas=1; Ambas=2
<b>Hiperqueratosis general</b>	Leve=1; Moderada=2; Severa=3
<b>Alopecia</b>	<10% Superficie corporal=1; 10-25%=2;
<b>Dermatitis exfoliativa</b>	<10% Superficie corporal=1; 10-25%=2;
<b>Caspa</b>	Leve=1; Moderada=2; Intensa=3
<b>Úlceras</b>	Una a dos=1; 3-5=2; >5=3
<b>Nódulos</b>	Una a dos=1; 3-5=2; >5=3
<b>Creatinina</b>	1,4-2mg/dL=1; 2-5mg/dL=2; >5mg/dL=3
<b>Anemia no regenerativa</b>	Sí=2
<b>Bajo cociente Albúmina/Globulinas</b>	Sí=1

Tabla 2. Signos clínicos evaluados para el cálculo de la puntuación clínica en los perros. Se indican los valores asignados dependiendo de la gravedad del signo.

La puntuación máxima alcanzable de acuerdo con estos criterios sería de 67.

## IV. Material y Métodos

### **6.5.3. Pruebas Inmunológicas**

#### **6.5.3.1. Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Los sueros a titular se diluyen en PBS en placas de microtitulación mediante diluciones dobles seriadas: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 y 1/2560. Como antígeno se utilizan promastigotes de la cepa de *L. infantum* MHOM/ES/2007DP532 (una gota de una suspensión a la concentración  $1,5 \times 10^6$  promastigotes/mL) fijados con acetona pura en pocillos de portaobjetos excavados. Se incluye un control negativo (suero negativo) y un control positivo (suero positivo a título 5120). Los resultados se expresan como el recíproco de la dilución seriada resultante.

Para la determinación de IgG<sub>total</sub> se utilizan anticuerpos anti-IgG de perro obtenidos en conejo marcados con isotiocianato de fluoresceína (Cultek S.L.U., España).

Se observa al microscopio de fluorescencia y se da resultado positivo cuando los promastigotes muestran fluorescencia color verde en toda su superficie. El título de anticuerpos del suero será la mayor dilución que mantiene la fluorescencia. Se consideraron positivos los perros con títulos de anticuerpos de la clase IgG igual o superior a 80, dudosos con título igual a 40 y negativo con título inferior a 40.

La técnica IFI se realizó siguiendo el protocolo descrito por Acedo Sánchez et al., (1996).

#### **6.5.3.2. Detección de los isotipos IgG1 e IgG2 mediante IFI**

Se utilizaron anticuerpos anti-IgG1 de perro obtenidos en cabra y anticuerpos anti-IgG2 de perro obtenidos en oveja (ambos de Bethyl Laboratories, Estados Unidos) siguiendo el mismo procedimiento que para la determinación del título de IgG<sub>total</sub>.

#### **6.5.3.3. Intradermorreacción de Montenegro**

Esta prueba consiste en la inoculación intradérmica de leishmanina para determinar la existencia de una respuesta inmune celular frente al parásito.

**Preparación de leishmanina:** La leishmanina es una suspensión estéril de promastigotes de *L. infantum*, completos o lisados, tratados con fenol. El procedimiento para su obtención (Acedo Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996) es el siguiente:

1. Cultivo de *L. infantum* en medio NNN en tubos con medio EMTM durante 7 días. Se recoge el medio de cultivo y se determina en un hemocitómetro la concentración de parásito.
2. Centrifugación a 500 rpm para eliminar los restos de agar.
3. Centrifugación del sobrenadante a 4000 rpm 5 min
4. Resuspensión del botón en SSF, centrifugado de nuevo a 4000 rpm 5 min
5. Se resuspende el botón en NaCl 0,3% y se vuelve a centrifugar
6. Se resuspende el botón en SSF y se centrifuga de nuevo. Se repite este paso de nuevo.
7. Se prepara una solución de fenol al 0,5% en SSF previamente esterilizado en autoclave en la que se resuspende el botón hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  promastigotes por mililitro, que recibe el nombre genérico de **leishmanina**.
8. Se realizan controles de esterilidad y de viabilidad del parásito inoculando la leishmanina en medio EMTM y en medio tripticososa soja agar. Si se confirma su esterilidad y la no viabilidad del parásito, se almacena a 4 °C en viales estériles.

**Realización de la prueba:** Se utiliza una jeringa automática a presión (Dermojet) que inocular en la dermis 0,1 mL de leishmanina. La aplicación se realiza en una zona depilada de la zona exterior del muslo de la pata posterior del animal.

**Lectura de la prueba:** Se lleva a cabo a las 48 horas de su aplicación, comprobando la presencia de una induración utilizando la técnica del bolígrafo: se coloca la punta del bolígrafo a varios centímetros del lugar de inoculación y se desplaza por la piel hacia el punto de inoculación hasta encontrar mayor resistencia (borde de la induración); se repite el procedimiento en el lado opuesto. La presencia de una induración igual o mayor a 5 mm de diámetro se considera como positiva indicando contacto con *Leishmania*.

## IV. Material y Métodos

### **6.5.3.4. Determinación de los niveles de expresión de citoquinas en sangre periférica**

Para complementar las pruebas inmunológicas, se seleccionaron dos citoquinas representativas de los dos tipos de respuesta inmune principales Th1 y Th2: Interferón gamma (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) respectivamente. Se determinó el nivel de expresión relativo de estas citoquinas en sangre mediante la cuantificación de su ARN mensajero (previa transformación a ADN copia). Para ello se realizó una qPCR utilizando sondas TaqMan. La cuantificación relativa se realiza comparando el Ct de cada una de ellas con el Ct de un gen de referencia o normalizador, en este caso la beta actina (ACTB).

#### **Extracción de ARN**

Se utilizó el kit comercial Total RNA Spin Blood RBMER12 (REAL, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se utilizan 300  $\mu$ L de sangre completa con anticoagulante (EDTA), mezclada previamente el día de la toma de muestras con Solución de Lisis Estabilizadora y almacenada a  $-85$  °C hasta su procesamiento. Este lisado se hace pasar por una columna de filtración, se recoge el filtrado del tubo de recolección, se mezcla con etanol 70% y se hace pasar por una columna de unión de ARN. La columna se somete a un proceso de desalado previo a la incubación con DNasa I durante 15min a temperatura ambiente. Se añade una solución para detener la reacción, se centrifuga, se elimina el filtrado y se lava la columna con solución de lavado dos veces. El ARN retenido en la membrana se eluye con 60  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se almacena a  $-85$  °C hasta su utilización. La extracción se realiza utilizando material autoclavado y puntas con filtro. Se realiza la cuantificación de ARN utilizando el dispositivo NanoDrop<sup>®</sup> 2000C (Thermo Scientific, Estados Unidos). El dispositivo ofrece la cantidad de ácidos nucleicos en ng/ $\mu$ L y los índices de calidad de la muestra 260/280 (2,0 valor ideal para ARN) y 260/230 (valores entre 2,0-2,2). La cantidad de ARN extraído se utiliza para ajustar la reacción de síntesis de ADN complementario (ADNc).

#### **Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

Se utiliza el kit comercial iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, España). Este kit contiene la enzima necesaria para la retrotranscripción e incluye cebadores aleatorios con una cola de poli-timinas para la síntesis del ADNc de todos los ARNm.

Se prepara la mezcla de reacción con la siguiente composición:

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
<b>5x iScript Reaction Mix</b>	4 $\mu$ L
<b>iScript transcriptasa inversa</b>	1 $\mu$ L
<b>Muestra de ARN</b>	100 fg – 1 $\mu$ g
<b>ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas</b>	csp 20 $\mu$ L

La reacción se incuba en un termociclador Flex Cycler Analytic Jena en las siguientes condiciones:

<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>5 min</b>	25 °C
<b>30 min</b>	42 °C
<b>5 min</b>	85 °C
-	4 °C

El producto de síntesis se almacena a -20 °C hasta su uso.

### **PCR en tiempo real para la determinación de la expresión de citoquinas**

Para la determinación de la expresión de las citoquinas Interferón-Gamma (IFN) e interleuquina 4 (IL4) en sangre se diseñaron cebadores y sondas para la amplificación de ADNc y su detección con sondas TaqMan. Como gen *housekeeping* o normalizador se eligió el gen de la beta-actina (ACTB). En la siguiente tabla se muestran los cebadores sentido (F ó S) y antisentido (A ó R) diseñados y posteriormente ensayados, así como su sonda marcada (TM). También se indica el número de la secuencia del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con la que se diseñaron.

#### IV. Material y Métodos

<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición (Secuencia NCBI)</b>
<b>(NM_001003174)</b>		
<b>IFNG</b>	F GAGTGACAAAACAATCATTGAGAGCC	291-316
	S gCTgATTCAAATTCCTgTgAACgA	456-479
	A CTCCTTAggTTggATCTTggTg	558-536
	R gAAACAgATTCTgACTCCTTTCCg	583-559
	TM FAM-AggTCCAgCgCAAggCgATAAA-BBQ	485-506
<b>(NM_001003159)</b>		
<b>IL4</b>	F CgTgCATggAgCTgACTgTC	203-222
	S gTgCATggAgCTgACTgTCAA	204-224
	A gTATAgATCTgCCgCgTACAgTAgC	305-280
	R CTgAggTTCCTgTAgAgTCCTCTgAg	353-328
	TM FAM-	274-245
<b>(NM_001195845)</b>		
<b>ACTB</b>	F CCTgCggCATCCATgAAA	958-975
	R ggggTgCgATgATCTTgATCTT	1143-1122
	TM FAM-AggACCTCTATgCCAACACAgTgCTgT-	1018-1044

**Tabla 3. Cebadores evaluados para la amplificación por qPCR de los genes de interferón- $\gamma$  (IFNG), interleuquina 4 (IL4) y beta actina (ACTB). Se indica el número e de secuencia de la base de datos del NCBI y la posición correspondiente a cada cebador.**

Los cebadores pertenecientes al gen IFNG amplifican un fragmento situado entre los exones 3 y 4 del ARN mensajero (ARNm), los cebadores de IL4 amplifican un fragmento entre los exones 2 y 3 del ARNm y los cebadores de ACTB amplifican un fragmento entre los exones 4 y 5 del ARNm. Los tamaños de los fragmentos teóricos amplificados por cada pareja de cebadores fueron los siguientes:

<b>Cebadores</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<b>IFNG F-A</b>	267
<b>IFNG F-R</b>	292
<b>IFNG S-A</b>	102
<b>IFNG S-R</b>	127
<b>IL4 F-A</b>	102
<b>IL4 F-R</b>	150
<b>IL4 S-A</b>	101
<b>IL4 S-R</b>	149
<b>ACTB F-R</b>	187

**Selección de las parejas de cebadores más adecuadas:** Para la selección de los cebadores idóneos se realizó una prueba combinando los distintos cebadores sentido y antisentido. Se realizó una PCR convencional en un termociclador siguiendo la siguiente composición y condiciones:

Composición:

Componente	Concentración o volumen
Tampón de reacción 10x	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µL
dNTP	1 µL
Cebador sentido	900 nM
Cebador antisentido	900 nM
Taq polimerasa	1 µL
ADN complementario	2 µL de producto de reacción
ddH <sub>2</sub> O	csp 25 µL

Condiciones

Segmento	Ciclos	
Desnaturalización	1	94 °C 3 min
Desnaturalización	40	94 °C 30s
Hibridación		55,5°C 30s
Elongación		72 °C 15s
Amplificación final	1	72 °C 90s

El resultado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa: el producto de amplificación se cargó en un gel de agarosa al 3% para visualizar los fragmentos amplificados y verificar su tamaño, utilizando Hiperladder IV como patrón de bandas.

**Determinación de la concentración óptima de sonda TaqMan:** Una vez seleccionados los cebadores, se procedió al ajuste de la concentración de sonda. Para la calibración se utilizó sangre periférica de perro sano (diagnosticado negativo por IFI y PCR). Se extrajo el ARN de la muestra y se realizó la síntesis de ADNc utilizando 90 ng de ARN. Se utilizó el siguiente esquema de PCR utilizando concentraciones distintas de sonda para cada gen a analizar.

## IV. Material y Métodos

### Esquema de PCR

Segmento	Ciclos	
Desnaturalización	1	95 °C 10 min
Amplificación	45	95 °C 15 s
		60 °C 1 min

Composición: Se utilizó el kit comercial FastStart Taqman Probe Master (Roche, Francia).

Componente	Concentración
MasterMix 2x	12,5 µL (1x)
Cebador Forward	900 nM
Cebador Reverse	900 nM
	160 nM
Sonda	200 nM
	240 nM
	280 nM
ADNc	2 µL de producto final de reacción
ddH <sub>2</sub> O	csp 25 µL

Se eligió la concentración de sonda atendiendo a parámetros como el Ct, la fluorescencia relativa máxima y el ruido de fondo.

### Obtención de los valores de expresión de las citoquinas

Para obtener valores de expresión de los dos genes de interés, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Este método comparativo utiliza la expresión del gen housekeeping o normalizador para normalizar la expresión del gen de interés y obtener valores relativos de su expresión. Parte de la asunción de una eficiencia igual en la amplificación de los genes de interés y el normalizador. De este modo se puede obtener el nivel de expresión relativo del gen de interés con respecto a distintos momentos de la toma de muestras, con respecto al tratamiento o con respecto a un animal control, por ejemplo.

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{normalizador}})_{\text{tratado}} - (Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{normalizador}})_{\text{no tratado/control}}$$

Por tanto,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  correspondería al número de veces que el gen de interés es expresado en los animales tratados con respecto a los animales no tratados o con respecto a un control sano.

En este estudio se eligió un animal sano (sin síntomas compatibles con la leishmaniosis, título IgG<sub>total</sub> <20 y qPCR negativa en sangre). Utilizando sus valores de expresión de citoquinas y la fórmula anterior, se pudo, para cada perro del ensayo en cada toma de muestras, establecer un valor relativo de expresión de citoquinas con respecto a este control.

Los valores de expresión de citoquinas mostrados en este estudio corresponden por tanto al número de veces que se expresa dicha citoquina con respecto al control sano. El índice IFNG/IL4 indicaría las diferencias de expresión de estas dos citoquinas, normalizadas o relativas al perro sano.

### **6.5.4. Análisis global de los resultados**

La eficacia de los distintos compuestos en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural se analizó utilizando los datos de carga parasitaria en los tejidos, las puntuaciones clínicas de los perros y sus títulos de anticuerpos IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG2. De esta forma, se comparó la evolución de estos datos y sus relaciones entre ellos, para detectar asociaciones entre los distintos valores y la presencia o ausencia de tratamiento, de tratamiento control, o su combinación.

Por un lado, se analizó la evolución de cada perro de forma individual; mientras que por otro lado se analizaron los datos por grupos de tratamiento.

Para ello se realizaron análisis de regresión lineal y de regresión logística para relacionar la influencia de las distintas variables sobre las cargas parasitarias para detectar posibles asociaciones.

El análisis de correlación se utilizó para encontrar relaciones entre los distintos parámetros cuantitativos (cargas parasitarias, niveles de expresión de citoquinas etc) se atendió, además de al nivel de significación ( $p$ -valor), al coeficiente de correlación producto-momento de Pearson o simplemente coeficiente "r" de Pearson en caso de variables cuantitativas que siguen una distribución normal o utilizando el test de correlación de Spearman en el caso de variables ordinales o que no responden a una distribución normal.

#### IV. Material y Métodos

El grado de relación entre las variables se definió de la siguiente manera atendiendo al valor absoluto del coeficiente "r" en los tests de Pearson y Spearman:

- $r \geq 0,7$  Correlación muy fuerte
- $0,4 < r < 0,69$  Correlación fuerte
- $0,3 < r < 0,39$  Correlación moderada
- $0,2 < r < 0,29$  Correlación débil
- $r < 0,2$  No existe correlación

A la hora de comparar las variaciones de cargas parasitarias medias de los distintos grupos, habitualmente se normalizaron los resultados convirtiéndolos en valores de "Reducción de carga parasitaria", calculando para cada perro la variación de carga parasitaria entre un análisis y el siguiente en porcentajes, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{Reducción de la carga parasitaria} = \frac{Cp_0 - Cp_1}{Cp_0} \times 100$$

Donde  $Cp_0$  es la carga parasitaria anterior y  $Cp_1$  es la carga parasitaria del punto a analizar. En caso de que la carga parasitaria anterior fuese 0, el porcentaje de reducción de la carga parasitaria se establece en -100.

#### **Criterio de eficacia de los compuestos**

Los indicadores utilizados fueron los que se describen a continuación. Se estableció una jerarquía entre ellos dependiendo de su valor para definir el estado del animal. Esta jerarquización también se ha aplicado a la hora de evaluar las relaciones de dependencia entre estos mismos indicadores.

#### **Carga parasitaria en médula ósea**

La médula ósea es un órgano que habitualmente contiene un gran número de amastigotes independientemente del estado clínico del animal (Momo et al., 2014). Es un tejido considerado como "profundo" (Dantas-Torres et al., 2014) y uno de los últimos órganos al que el parásito llega durante la progresión de la enfermedad. Además, junto con la carga parasitaria en bazo, es considerado el mejor tejido para evaluar la evolución de la enfermedad en el animal (Reis et al., 2009). Por estas razones y por su relativa accesibilidad, en el presente estudio se ha designado la carga parasitaria en este órgano como el principal indicador de eficacia de la terapia.

### **Carga parasitaria en ganglio poplíteo**

Tras el contacto con la piel, el parásito se disemina por la sangre y el sistema linfático. En los nódulos linfáticos se produce hiperplasia e hipertrofia de éstos, a veces no asociados a la carga parasitaria en este tejido (Lima et al., 2004). La carga parasitaria en ganglio poplíteo puede estar relacionada con el estado clínico del perro (Moreira et al., 2010), aunque esta afirmación es controvertida, pues otros autores no encuentran relación entre estas variables (Lima et al., 2004) e incluso dan más valor a la carga parasitaria en la piel como marcador del estado clínico (Giunchetti et al., 2008). En el presente estudio se ha considerado la carga parasitaria en ganglio poplíteo como un indicador secundario de la eficacia del tratamiento por su relevancia y accesibilidad, pero no está clara su relación con la progresión de la enfermedad y el estado clínico del perro.

### **Indicadores inmunológicos**

El título de anticuerpos IgG total y los títulos de anticuerpos de los subtipos IgG1 e IgG2 se consideraron marcadores secundarios de la eficacia del tratamiento. Son factores que reflejan de forma indirecta la parasitación a través de la respuesta inmune del perro, pero que también están relacionados con la progresión de la enfermedad por lo que son de gran valor diagnóstico (el título de IgG<sub>total</sub> es un "gold standard") y pronóstico. Los niveles de IgG1 e IgG2, así como el parámetro cociente IgG2/IgG1 son tratados con precaución a este respecto..

Los niveles de expresión de las citoquinas interferón- $\gamma$  e interleuquina 4 también son un reflejo del tipo de inmunidad, Th1 ó Th2, influyendo sobre los niveles de anticuerpos de uno u otro tipo, teniendo por tanto tanta o más importancia que aquéllos.

### **Carga parasitaria en sangre**

La carga parasitaria en sangre es consecuencia de la parasitación de otros órganos. Se ha considerado como un marcador terciario de la eficacia del tratamiento. En los análisis estadísticos se ha considerado como una variable dependiente de las otras cargas parasitarias.

### **Puntuación clínica**

La puntuación clínica es un parámetro suma de la severidad de distintos signos clínicos generales, hematológicos, enzimáticos, bioquímicos y cutáneos. Esta puntuación depende de los anteriores parámetros. Podría considerarse un

#### IV. Material y Métodos

marcador cuaternario, por lo que en los estudios siempre se ha considerado como una variable dependiente.

Atendiendo a las anteriores consideraciones, **se consideró eficaz el tratamiento cuando:**

- 1- En los perros con parásito en médula ósea, la carga parasitaria en este tejido se redujo al menos en un 50% entre el análisis pre-tratamiento (día 0) y el análisis post-tratamiento (día 120).
- 2- En los perros sin parásito en médula ósea, se consideró eficaz cuando disminuyeron la carga parasitaria en ganglio poplíteo y la parasitemia al menos en un 50%

Se consideraron **recidivas** en el análisis de seguimiento (día 210), cuando la carga parasitaria aumentó en este análisis con respecto al análisis del día 120 en los perros en los que el tratamiento fue considerado eficaz. Se utilizó la carga parasitaria en el tejido asociado al criterio de eficacia utilizado. Las recidivas se clasificaron en:

- Parciales: El aumento en la carga parasitaria fue superior al del análisis del día 120, sin rebasar el umbral del 50% de reducción de la carga parasitaria que establecen los criterios de eficacia.
- Totales: El aumento en la carga parasitaria rebasó el 50% de reducción establecido en los criterios de eficacia.

#### **6.6. Evaluación toxicológica durante el ensayo:**

Para la evaluación toxicológica, además del peso del animal, se consideraron diversas pruebas hematológicas y de bioquímica sanguínea, que se recogen en la tabla 4 junto con los valores de referencia de cada uno.

Los análisis fueron realizados por el laboratorio de análisis veterinario ANLAVE (Granada) donde las muestras fueron enviadas inmediatamente tras su recolección. Los parámetros bioquímicos y hematológicos se realizaron utilizando un analizador automático Targa BT-2000 Plus (Biotechnica, Italia) mediante métodos espectrofotométricos, excepto en el caso de la fórmula leucocitaria que se realizó por microscopía óptica. Los valores de referencia son los propios del laboratorio. Estos datos no solo sirvieron para la evaluación toxicológica del compuesto, sino también para analizar la evolución clínica de la enfermedad.

<b>Hematología</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Valores de referencia</b>
Hemoglobina	[12 – 18 g/dL]
Eritrocitos	[5'5 - 8'5 millón/ $\mu$ L]
Hematocrito	[37 – 55 %]
Leucocitos	[5'5 - 16'9 mil/ $\mu$ L]
Neutrófilos Cayados	[0 – 3 %]
Neutrófilos C.	[0 - 0'3 mil/ $\mu$ L]
Neutrófilos Segmentados	[60 – 77 %]
Neutrófilos S.	[3 – 12 mil/ $\mu$ L]
Eosinófilos	[2 – 10 %]
Basófilos	[0 – 1 %]
Linfocitos	[12 – 30 %]
Linfocitos	[1 - 4'8 mil/ $\mu$ L]
Monocitos	[3 – 10 %]
Plaquetas	[175 – 500 mil/ $\mu$ L]
Volumen corpuscular medio	[60 – 72 $\mu$ m <sup>3</sup> ]
Hemoglobina corpuscular media (HCM)	[19'5 - 24'5 pg]
Concentración de HCM	[31 – 37 $\mu$ m <sup>3</sup> ]
<b>Bioquímica clínica</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Valores de referencia</b>
Colesterol total	[125 – 270 mg/dL]
Triglicéridos	[40 - 140 mg/dL]
Creatinina	[0'6 - 2 mg/dL]
Urea	[10 - 45 mg/dL]
Amilasa	[370 - 1.500 U/L]
GOT (AST)	[10 - 88 U/L]
GPT (ALT)	[10 - 88 U/L]
Proteínas totales	[5'4 - 7'7 g/dL]
Albúmina	[2'8 - 4 g/dL]
Globulinas totales	[2,7 - 4'4 g/dL]
Albúmina/Globulinas	[0'7 - 1'1]
Calcio	[8 - 11'5 mg/dL]
Fósforo	[2'2 - 5'5 mg/dL]
Fosfatasa alcalina	[20 - 121 U/L]
Glucosa	[70 - 120 mg/dL]
Lipasa	[25 - 530 U/L]
Bilirrubina total	[0'1 - 0'6 mg/dL]
Bilirrubina directa	[0 - 0'3 mg/dL]

Tabla 4. Parámetros hematológicos y de bioquímica clínica evaluados en la sangre de los perros junto con los valores de referencia considerados normales.

## IV. Material y Métodos

### 6.6.1. Criterio de toxicidad

Fueron definidos como signos de toxicidad o poca tolerabilidad frente al compuesto: pérdida de peso, presencia de náuseas o vómitos y aparición de alteraciones en las concentraciones séricas de ALT, AST, fosfatasa alcalina (ALP), Urea, Creatinina o bilirrubina (total o directa) no asociadas al empeoramiento clínico de la enfermedad y de magnitud dos veces superior al límite superior de normalidad.

En el caso de existir alguna/s de estas alteraciones, se analizaron con detenimiento su nivel y grado de alteración y su asociación con otras alteraciones con el fin de encontrar un patrón de daño hepático, renal o de otros órganos o tejidos.

## 7. Estudio de las proteínas Histona Desacetilasa en *L. mexicana*

El estudio de las proteínas HDAC en *Leishmania* consistió en la realización de un análisis bioinformático con el objetivo de identificar estas proteínas en el parásito, y su grado de homología con las enzimas HDAC de otros tripanosomátidos. La segunda parte consistió en la localización de las enzimas dentro del parásito: para este estudio se utilizó como modelo *L. mexicana*, al estar disponible su utilización bajo las condiciones de bioseguridad utilizadas según la legislación de Reino Unido. Se realizaron constructos genéticos con el fin de etiquetar cada proteína con la proteína verde fluorescente (GFP).

### 7.1. Cepa del parásito y su cultivo

***L. mexicana* MNYC/BZ/1962/M379:** Se trata de una cepa de *L. mexicana* aislada de un ratón de monte (*Nyctomys sumichrasti*) en Belize. Es una cepa de referencia para *L. mexicana* de la OMS.

**Cultivo de promastigotes de *L. mexicana*:** El cultivo de *L. mexicana* se realiza en frascos tipo falcon de 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup> utilizando volúmenes de 10 o 30 mL de medio M199 completo respectivamente. Se incuban en una estufa a 28 °C. Se deben realizar pases de los cultivos en un intervalo máximo de 7 días, realizando un subcultivo 1:10 con medio fresco precalentado a 28 °C.

**Medio M199:** Adquirido de Gibco (Estados Unidos). Medio estándar monofásico líquido de cultivo de promastigotes de *Leishmania* spp. Se suplementa con SBF 10%, HEPES 40 mM y hemina 5 µg/mL.

Elaboración	
Polvo M199	9,5 g
SBF	100 mL
Hemina 2,5 mg/mL	2 mL
HEPES 1M pH 7.2	40 mL
dH <sub>2</sub> O	csp 1L

Se disuelve el polvo M199 en agua y se añade el tampón hepes. Se esteriliza por filtración, se añade SBF y hemina estéril y se guarda a 4 °C.

## 7.2. Cepa bacteriana y su cultivo

**Cepa procariota: *Escherichia coli* XL Blue:** Esta cepa bacteriana se cultiva en placas de cultivo petri con LB-agar. También en frascos de cultivo con medio LB líquido de 10 mL (Minipreps) o en matraces Erlenmeyer con 50-200 mL de cultivo (Midipreps) a 37 °C y agitación (200rpm) durante toda la noche. Tras su cultivo se puede almacenar a 4 °C hasta 3 semanas.

**Medio Luria Broth (LB):** Medio estándar líquido de cultivo de *E. coli*. Utilizado para el cultivo de ésta en minipreps y midipreps.

Elaboración	
LB polvo	20 g
Ampicilina (1000 mg/mL)	1 mL
dH <sub>2</sub> O	csp 1L

Se disuelve el polvo y se esteriliza en autoclave. Se añade ampicilina y se almacena a 4 °C.

**Medio LB-Agar:** Medio sólido estándar de cultivo de *E. coli* para el aislamiento de colonias transformadas.

Elaboración	
LB-Agar polvo	20 g
Ampicilina (1000 mg/mL)	1 mL
dH <sub>2</sub> O	csp 1L

Se disuelve el polvo y se esteriliza en autoclave. Se añade ampicilina y se reparte en placas Petri de cultivo bacteriológico. Se almacenan a 4 °C.

## 7.3. Análisis bioinformático

### 7.3.1. Búsqueda de secuencias y alineamiento local

Usando las secuencias publicadas de las proteínas Histona desacetilasa 1 (DAC1), DAC2, DAC3, DAC4, Sir2 Related Protein 1 (Sir2 RP1), Sir2 RP2 y Sir2 RP3 por Wang et al. en 2010, Alsford y Horn en 2002, Tavares 2008, García-Salcedo 2003 y Alsford 2007, descritas en *T. brucei* y *L. major*, se realizó una búsqueda de proteínas utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos TriTrypDB. La base de datos libre integrada TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>)

recoge información genética, anotaciones de genes, de proteínas y de su expresión de los parásitos tripanosomátidos, *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp, así como herramientas bioinformáticas. El valor E (E-value o expectancy value), en el campo del alineamiento de secuencias, es el número de secuencias que podríamos encontrar por azar similar a la encontrada al buscar en una base de datos. Ampliando la definición, sería la probabilidad de encontrar un alineamiento tan bueno por azar. Cuanto mas bajo es el valor E, mejor es el alineamiento. Un valor E de 0 solo aparecerá con dos secuencias idénticas.

Se eligieron las proteínas con un valor E de  $10^{-20}$  o inferiores, claro indicativo de ortología.

### **7.3.2. Diseño de cebadores**

El diseño de cebadores para la amplificación por PCR de las regiones de ADN genómico de *L. mexicana* se realizó utilizando los software Gene Construction Kit<sup>®</sup> versión 3.5 (Textco Biosoftware) y ApE Plasmid Editor Versión 2.0 (University of Utah, Estados Unidos).

El diseño de cebadores para la síntesis de fragmentos largos por PCR-Fusión se realizó utilizando la herramienta web Fusion PCR primer designer ([www.richardwheeler.net/interactive/bioinf/dnatools/](http://www.richardwheeler.net/interactive/bioinf/dnatools/)).

### **7.2.3. Determinación de los patrones de splicing y poliadenilación**

Se evaluó la presencia y adición de splice leaders y los patrones de poliadenilación utilizando la aplicación web SLaP mapper ([www.stevекellylab.com/software/slap](http://www.stevекellylab.com/software/slap), Fiebig et al. 2014).

### **7.4. Plásmidos utilizados**

A continuación se describen los plásmidos que se han utilizado en la transfección para el etiquetado o "tagging" de proteínas, usados tanto mediante la estrategia plasmídica como con el método de PCR fusión.

**pLENT (*Leishmania* ENdogenous Tagging) versión 1-YFP-Bleo**

Utilizado para la estrategia plasmídica con tags en la región N-terminal. Su estructura incluye:

- Resistencia a ampicilina (Amp), para la selección de colonias de bacterias.
- Gen de resistencia a bleomicina (BLE) como factor de selección de mutantes de *L. mexicana*.
- Gen de la proteína amarilla fluorescente (YFP, Yellow Fluorescent Protein), fusionada con la región codificante (CDS).
- Flanco 5', fragmento de 500pb en la región no codificante a 5' del CDS.
- CfPGKB 5' UTR: Región no traducida (Untranslated región, UTR) en 5' del gen fosfoglicerato kinasa de *Crithidia fasciculata*.
- CfGSPS 3' UTR: UTR 3' del gen glutationil espermidina sintetasa.

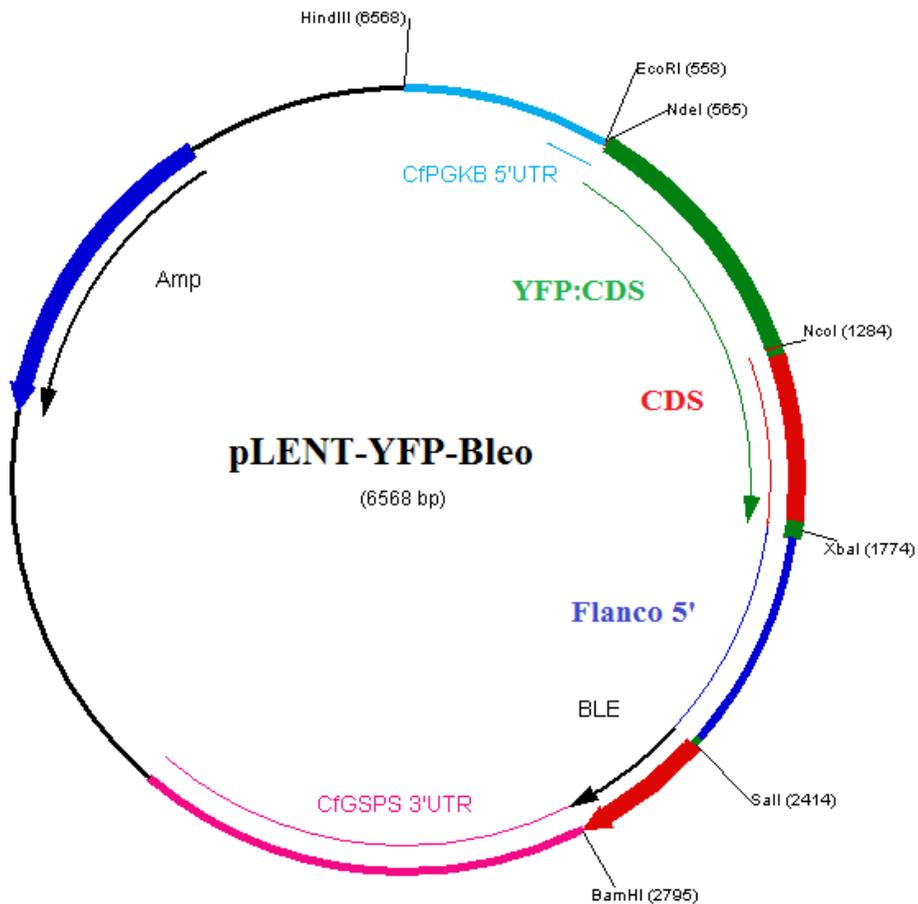


Figura 10. pLENT (*Leishmania* ENdogenous Tagging) versión 1-YFP-Bleo

**Plásmido pPOT versión 2 (PCR Only Tagging)**

Este vector diseñado para PCR-fusión se utilizó para el etiquetado de proteínas en posición N-terminal. En su estructura contiene:

- Regiones no traducidas 3' de los genes de la actina y de la aldolasa.
- Marcadores de resistencia a blasticidina (BlastR, Blastidina S desaminasa) y a higromicina (hygR, higromicina fosfotransferasa).
- Gen de la proteína amarilla fluorescente (eYFP) con etiquetas Ty para inmunolocalización.
- Marcador de resistencia a ampicilina (ampR).
- Sitios únicos de unión para cebadores.

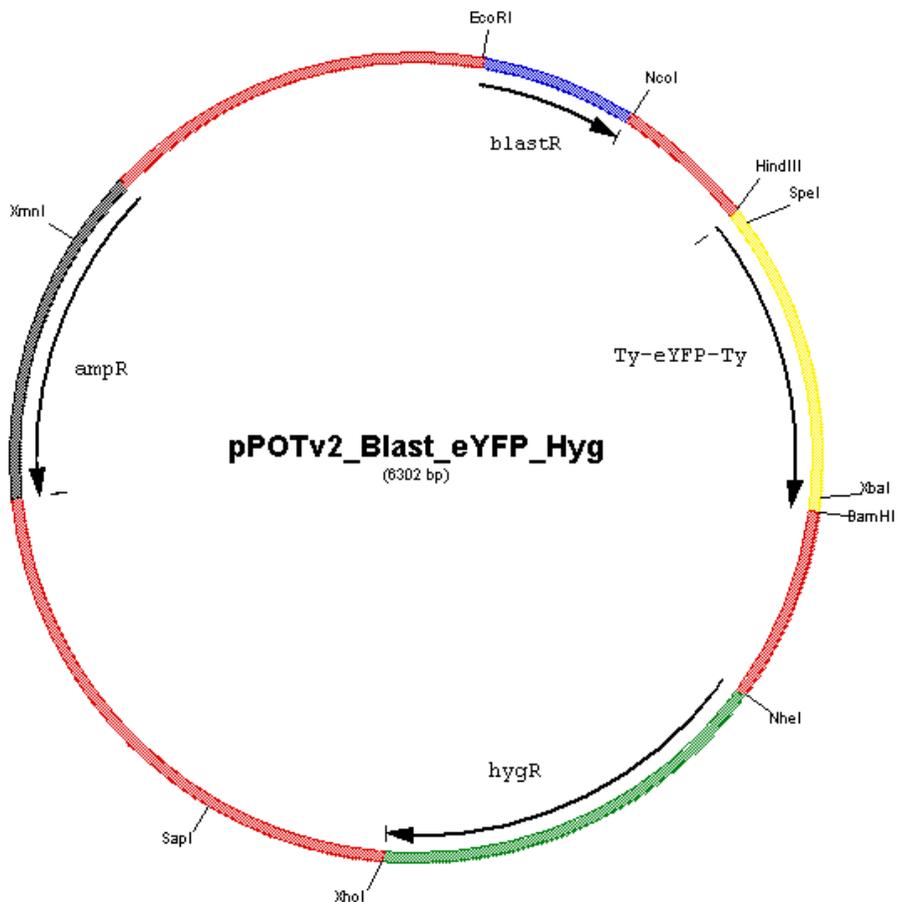


Figura 11. Plásmido pPOT versión 2 (PCR Only Tagging)

### Plásmido pJ1170

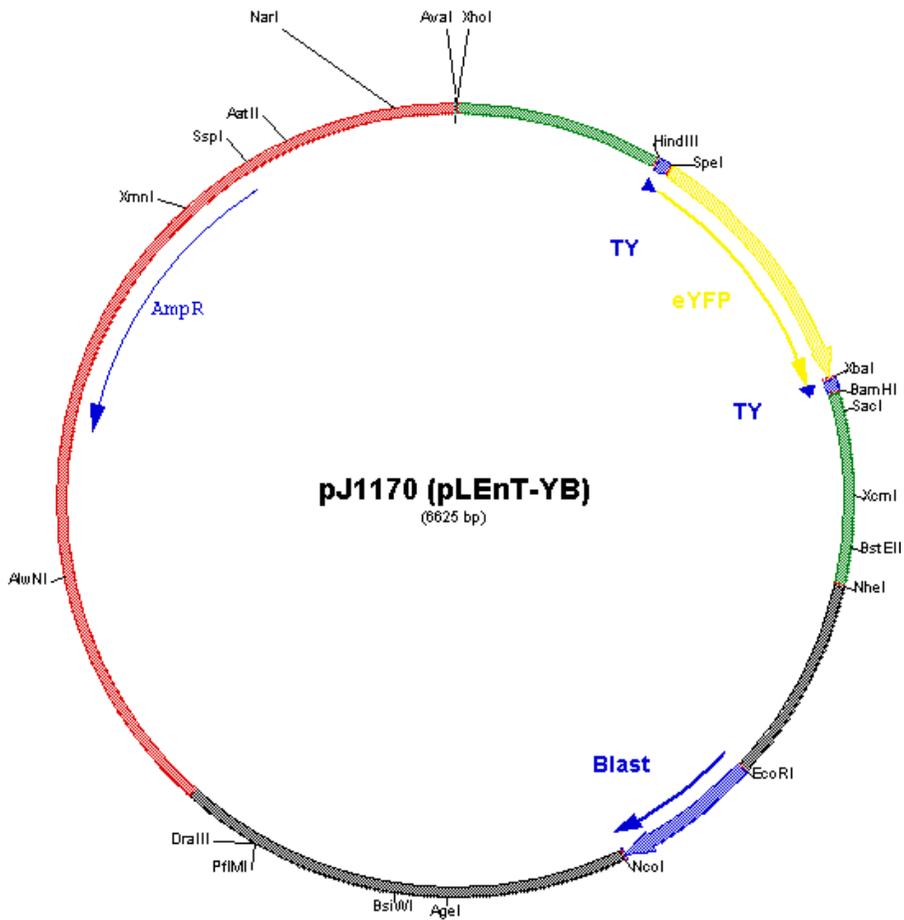


Figura 12. Plásmido pJ1170

Este plásmido se utilizó para el etiquetado de proteínas en posición C terminal utilizando la estrategia PCR-fusión. Es una versión actualizada del plásmido pLENT v1, con resistencia a Blastidina y epítos Ty.

#### 7.5. Estrategia y diseño de etiquetado o “tagging” de proteínas

Con el objetivo de determinar la localización de estas proteínas dentro de las células, se decidió utilizar como estrategia el “tagging” o etiquetado de proteínas. El fundamento de esta técnica es el diseño de un inserto que añade en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína, la proteína verde fluorescente (GFP), de forma que la proteína emite fluorescencia y es fácil localizarla.

Para la síntesis de los insertos se siguieron dos estrategias distintas: síntesis utilizando un plásmido y PCR fusión.

### 7.5.1. Estrategia plasmídica

Esta estrategia se utilizó para los genes ortólogos de DAC1, DAC2, DAC3, DAC4 y Sir2 RP1 en *T. brucei*. Para la estrategia plasmídica, primero se eligió la localización del "tag". De acuerdo a los resultados obtenidos por otros autores, se utilizó el tag en posición N-terminal para estas proteínas.

A continuación se utilizaron cebadores que amplificasen: a. una región de 500 nucleótidos del flanco 5' del gen y b. los primeros 500 nucleótidos en 5' de la región codificante del gen (CDS). Estos cebadores debían incluir lugares de corte para enzimas de restricción adecuadas al plásmido a utilizar. Utilizando el plásmido pLENT anteriormente mencionado, se eliminan las regiones Flanco 5' y CDS y se sustituyen por las del gen de interés.

Los **cebadores** utilizados para la amplificación de los fragmentos del flanco 5' y de CDS fueron los siguientes.

Fragmento		Secuencia 5'-3'
DAC1 5'	F	CCC TCT AGA CTC CCT CGC CTC ACA AAC
	R	TTT GTC GAC GAT CCG TCC CAC CCA TTC
DAC1 CDS	F	TTT CCA TGG GAC GCG TTG CAC AAG G
	R	TTG TCT AGA CAC GTA GCA GAA CCC GGA G
DAC2 5'	F	TTT TCT AGA AGC GCA CGC GAG CAG CTT C
	R	CCC GTC GAC CGC AGA TTA TTA TAA CTG
DAC2 CDS	F	TTT CCA TGG TCA TCT CCG GAG CAG CTT C
	R	GGG TCT AGA TAG GGA TAT CTC GTC CAG
DAC3 5'	F	TTC TCT AGA GAA CAC GTC AGC CAG CTC
	R	TTT GTC GAC TCG GCG ATG CCT AGC TCA G
DAC3 CDS	F	TTT CCA TGG CCG AAG CGG CAG CGC AGC
	R	GGG TCT AGA CCT AGA GTG CAC GCG GCG
DAC4 5'	F	TTT GCG GCC GCC TAA AGC GAT TCT GCC TG
	R	TTT TGT CGA CGG GTG AAC GCC GGT ATG C
DAC4 CDS	F	TTT CCA TGG CCG CCA CCA CGT TTT GCG
	R	TTT GCG GCC GCT CGA CAG GCA GAA CGT CG
Sir2 RP1 5'	F	CCC TCTAGA TCT CCC TGT CAT ACA AGG
	R	CCC GTC GAC CTC CAA CAT TAA CGT GAA G
Sir2 RP1 CDS	F	TTT CCA TGG ACA GCG TCT CCG AGA GCG
	R	TCC TCT AGA CAA TGC AGG CGG CGG CAG

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de la región codificante y su correspondiente flanco en 5' de cada gen de proteína HDAC de *L. mexicana*

## IV. Material y Métodos

### PCR

Las condiciones de la PCR para la síntesis de estos fragmentos fueron las siguientes:

Composición:

Componente	Volumen (concentración)
<b>Tampón 10x con Mg<sup>2+</sup></b>	5 µL
<b>10x dNTP (2 mM)</b>	5 µL (200 µM)
<b>10 µM forward</b>	5 µL (1µM)
<b>10 µM reverse</b>	5 µL (1µM)
<b>Roche Expand High Fidelity Taq</b>	0,5 µL
<b>DNA genómico</b>	1pg-1µg
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	csp 50 µL

Esquema de PCR:

Etapa	Ciclos	Condiciones
<b>Desnaturalización</b>	1	94° C 3 min
<b>Amplificación</b>	30	94 °C 30s
		55 °C (ajustable) 30s
		72 °C 45s (1 min/kb)
<b>Elongación</b>	1	72 °C 7min

El producto de amplificación se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y se purifica con un kit de purificación de producto de PCR. En caso de aparición de bandas no específicas, se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y un kit de extracción de ADN en gel.

El proceso continúa con la digestión de estos fragmentos y de los vectores a utilizar con las enzimas adecuadas, su ligación y la transformación bacteriana con los plásmidos obtenidos. Las bacterias sembradas en placa de Petri con el constructo correcto (resistentes a ampicilina) son entonces seleccionadas y cultivadas en Minipreps. Se extrae el ADN plasmídico a estos cultivos y se verifica con un análisis de digestión con enzimas de restricción que el plásmido es correcto. Se cultivan en Midipreps o Minipreps hasta obtener la cantidad suficiente de plásmido (son necesarios unos 10 µg de plásmido completo). Una vez obtenido, se lineariza cortando con una enzima de restricción, se purifica y se realiza la transfección.

### 7.5.2. PCR fusión

Esta estrategia consiste en la síntesis de fragmentos largos de ADN utilizados como vectores para transfección. Se basa en el uso de un fragmento de plásmido o vector que incluye los genes de resistencia y de la proteína fluorescente. Se utilizó para la síntesis de insertos de los genes DAC1, DAC2, DAC3, DAC4 y Sir2 RP1 en posición N-terminal y de Sir2 RP2 y Sir2 RP3 en posición C-terminal.

Esta síntesis de fragmentos largos tiene dos etapas:

En la primera etapa, se sintetizan a partir de ADN genómico fragmentos largos que se utilizarán como cebadores en la siguiente etapa, en la que, utilizando como molde el fragmento de plásmido, se sintetiza en fragmento destinado a la transfección.

Las condiciones de la primera PCR fueron las siguientes:

Composición:

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
<b>ADN genómico (~200 ng/μL)</b>	1 μL
<b>Cebador forward (TF) 100 μM</b>	1 μL
<b>Cebador reverse (TF) 100 μM</b>	1 μL
<b>DMSO</b>	1 μL
<b>Tampón 10x con 1,5 mM MgCl<sub>2</sub></b>	5 μL
<b>dNTP 10x</b>	5 μL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	csp 49,5 μL
<b>HiFi polimerasa</b>	0,5 μL

Para esta reacción se utilizó la técnica "Hot-Start PCR" en la que se añade la Taq polimerasa al alcanzar los 94 °C con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas con los cebadores.

En esta etapa se obtiene para cada proteína a etiquetar, dos fragmentos, uno 5' y otro 3', que serán los cebadores de la siguiente reacción.

#### IV. Material y Métodos

Condiciones:

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Condiciones</b>
<b>Desnaturalización</b>	1	94° C 5 min
<b>Amplificación</b>	25	94 °C 30s
		60 °C (ajustable) 30s
		72 °C 30s (1 min/kb)
<b>Elongación</b>	1	72 °C 7min

El producto de amplificación se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa se purifica con un kit de purificación de producto de PCR. En caso de aparición de bandas no específicas, se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y un kit de extracción de ADN en gel.

Las condiciones de la segunda etapa de PCR-Fusión fueron las siguientes:

Composición:

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
<b>Cassette Resistencia/GFP</b>	20 ng
<b>Fragmento 5'</b>	1 µL
<b>Fragmento 3'</b>	1 µL
<b>DMSO (opcional)</b>	1 µL
<b>Tampón 10x con 1,5 mM MgCl<sub>2</sub></b>	5 µL
<b>dNTP 10mM</b>	1 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Hasta 47,5 µL
<b>HiFi polimerasa o HiFi Phusion</b>	0,5 µL
<b>Cebador NF 100 µM</b>	1 µL
<b>Cebador NR 100 µM</b>	1 µL

Condiciones

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Condiciones</b>
<b>Desnaturalización</b>	1	94° C 2 min	98° C 2 min
<b>Annealing</b>	1	55 °C 3 min	55 °C 3 min
<b>Amplificación</b>	30	68 °C 3 min	72 °C 3 min
		94 °C 30s	98 °C 30s
		55°C 3 min	55°C 3 min
<b>Elongación</b>	1	68 °C 7min	72 °C 7min

En esta segunda reacción se añade la HiFi polimerasa o HiFi Phusion tras las dos primeras etapas, durante la fase de amplificación a 68 °C.

Los cebadores NF y NR se añaden en el sexto ciclo de la tercera etapa, durante la desnaturalización (94/98 °C).

El producto de amplificación se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa se purifica con un kit de purificación de producto de PCR. En caso de aparición de bandas no específicas, se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y un kit de extracción de ADN en gel.

Mediante este método se necesitan ~2 µg de producto de PCR por cada transfección.

Los cebadores utilizados en la Fusion-PCR se resumen en la tabla 6:

Gen	ID	Secuencia	Vector	Tag	
DAC1	LmxM.21.0680	5'TF	TCTGGGCCGTGGCCTAAT	pPot v2 Blast/eYFP/Hyg	N
		5'TR	CTTGCTGTGCCCTAGCTTGGCGATCCGTCACC		
		3'TF	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGGACGCGTTGCACAAGG		
		3'TR	CCCATCAATGTCCCACTAGC		
		NF	GTGAGACAGCGTAGTTGTCC		
DAC2	LmxM.24.1370	NR	TGTAGCGATGGAGTGCTCC	pPot v2 Blast/eYFP/Hyg	N
		5'TF	CCCCCTCCCCCTTCAAC		
		5'TR	CTTGCTGTGCCCTAGCTTCGCAGATTATTATAACTGCGGG		
		3'TF	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGTCATCTCCGGAGCAGC		
		3'TR	GGACGAGCATGACACACAG		
DAC3	LmxM.21.1870	NF	GATTACAGCATCTGCCGAG	pPot v2 Blast/eYFP/Hyg	N
		NR	CATGTATTCTGCACTGTCGAG		
		5'TF	TTCATGGGCGGTTACTCTTG		
		5'TR	CTTGCTGTGCCCTAGCTTTGTCGTCGTCGGCGATGC		
		3'TF	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGCCGAAGCGGCAGCG		
DAC4	LmxM.08.1090	3'TR	CCGATGGCGGTGAGGTG	pPot v2 Blast/eYFP/Hyg	N
		NF	CATGCGGTAATCTGGGACG		
		NR	AAGTGTGCTTTGCAGCCGC		
		5'TF	TCCCTTCCACCGTCAGAAG		
		5'TR	CTTGCTGTGCCCTAGCTTGGGTGAACGCCGGTATGC		
DAC4	LmxM.08.1090	3'TF	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGCCGCCACCACGTTTTG	pPot v2 Blast/eYFP/Hyg	N
		3'TR	TGTAGCAGCATGCGCGCG		
		NF	AAGGCCGCTGTGAAGTGAG		
		NR	CGAAACACCACCCACGG		

#### IV. Material y Métodos

<b>Sir2 RP1</b> LmxM.26.0210	<b>5'TF</b>	TCCTTCCAGGATTAGCACAAC	<b>pPot v2</b> <b>Blast/eYFP/Hyg</b>	<b>N</b>
	<b>5'TR</b>	CTTGCTGTGCCCTAGCTTCTCCAACATTAACGTGAAGTTA		
	<b>3'TF</b>	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGACAGCGTCTCCGAGAG		
	<b>3'TR</b>	CCCGGGCCTTCTCCAG		
	<b>NF</b>	AACACCAGCTCAGCGATCC		
<b>Sir2 RP2</b> LmxM.23.1210	<b>5'TF</b>	CGGACGGCGACTACAGTG	<b>pLENTv2</b> <b>eYFP/Blast</b>	<b>C</b>
	<b>5'TR</b>	CTCCTCGCCCTTGCTCACGAGTTGAATCGCCTTCTGGC		
	<b>3'TF</b>	GGTTATGTGTGGGAGGGCTAACTGCTCCGTCACACCAGC		
	<b>3'TR</b>	TGCCATCGCATGGGTGG		
	<b>NF</b>	CAACGGAGGCCGGAATG		
<b>Sir2 RP3</b> LmxM.33.2140	<b>5'TF</b>	ACATGCATGGCGAGCTTCTG	<b>pLENTv2</b> <b>eYFP/Blast</b>	<b>C</b>
	<b>5'TR</b>	CTCCTCGCCCTTGCTCACCTTTTTCGAGCTCTCTTTCAGC		
	<b>3'TF</b>	GGTTATGTGTGGGAGGGCTAACTGGCCCCGAACCGATTGG		
	<b>3'TR</b>	GGAAGACAGAGAGGAGAGAG		
	<b>NF</b>	AAGGTCCGCTGCACAGCC		
	<b>NR</b>	GTCACGGCGGCCTCAAC		

Tabla 6. Cebadores utilizados para la reacción de PCR-fusión. 5'TF= Cebador "forward" de la región 5'; 5'TR= Cebador "reverse" de la región 5'; 3'TF= Cebador "forward" de la región 3'; 3'TR= Cebador "reverse" de la región 3'; NF= Cebador "forward" para la segunda reacción (PCR anidada o Nested); NR= Cebador reverse para la segunda reacción.

#### 7.6. Digestión

Tanto para analizar los constructos genéticos sintetizados (plásmidos, productos de PCR fusión etc) como para preparar la ligación entre insertos de ADN y plásmidos de clonación, se utilizó la digestión por enzimas de restricción. Todas las enzimas fueron suministradas por NEB (Reino Unido) y se utilizaron con tampones de NEB y Roche.

Las condiciones de las digestiones fueron las siguientes:

Componente	Preparación para	Análisis
<b>Tampón 10x</b>	5 µL	1 µL
<b>ADN</b>	Variable (~5 µg)	Variable (~0,5µg)
<b>Enzima A (10 U/µL)</b>	2 µL	0,2 µL
<b>Enzima B (10U/µL)</b>	2 µL	0,2 µL
<b>ddH2O</b>	csp 50 µL	csp 10 µL

La digestión se realiza a la temperatura idónea para la(s) enzima(s). El tiempo de digestión varía desde 45min en el caso de análisis de plásmidos, hasta 3h en el caso de la preparación de secuencias para la clonación.

### 7.7. Reacción de ligación

Tras la síntesis, se realizó una reacción de ligación entre el plásmido y el/los insertos, digeridos todos con las enzimas de restricción adecuadas. Se incluyen controles negativos (utilizando solo vector digerido) y positivos (con plásmidos cerrados funcionales).

Esta reacción puede ser sencilla, utilizando un solo fragmento, o doble, con dos fragmentos. La reacción se realiza de forma que la relación molar Vector:Inserto sea 1:3 y la cantidad total de ADN en la reacción de aproximadamente 100 ng (10 ng/μL). El cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad del inserto (ng)} = \frac{\text{Longitud del inserto (kb)}}{\text{Longitud del vector (kb)}} \times \text{Cantidad del vector (ng)}$$

La reacción se realizó con reactivos de NEB (Reino Unido) y Roche en las siguientes condiciones:

Componente	Control negativo	Ligación
Vector	1	1
Inserto	-	3
Tampón 10x	1	1
T4 Ligasa de ADN	1	1
ddH <sub>2</sub> O	csp 10 μL	csp 10 μL

Se mezclan los componentes y se deja la reacción durante 1h a temperatura ambiente o toda la noche en el frigorífico.

### 7.8. Transformación bacteriana

La transformación se hizo con la cepa *E. coli* XL-Blue. Se utilizaron lotes de la bacteria competente conservados a -85 °C. El procedimiento fue el siguiente:

1. Descongelación del vial con bacterias en hielo
2. Se añaden 100 μL de suspensión de bacterias descongeladas a 5 μL del producto de ligación en un tubo eppendorf y se colocan en hielo durante 20

## IV. Material y Métodos

- minutos. También se realizan controles de transformación negativos (con plásmido digerido sin ligar) y controles positivos (con un plásmido completo).
3. Se aplica un choque térmico de exactamente 1 minuto a 42 °C en un bloque térmico o baño termostataado.
  4. Tras el choque térmico, se vuelven a colocar los tubos en hielo durante 2 minutos.
  5. Se siembran las bacterias en placas de cultivo bacteriano con medio de cultivo LB-agar suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Se cultivan hasta el día siguiente durante aproximadamente 16h a 37 °C.

### **7.8.1. Selección y amplificación de clones**

Tras la incubación durante la noche, se comprueba la presencia de colonias en el control positivo y su ausencia en el control negativo. Se seleccionan colonias aisladas transformadas con los plásmidos de interés con una micropipeta y se cultivan en Minipreps o Midipreps durante aproximadamente 16h.

### **7.9. Electroforesis en Geles de Agarosa**

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1x y bromuro de etidio a un voltaje entre 80 y 120 mV. Se utilizaron como referencia marcadores de peso molecular entre 500 b a 10 kb o entre 100 y 1000 b. La muestra de ADN se utilizó mezclada con tampón de carga teñido con azul de bromofenol. El resultado se visualizó en un transiluminador, tomando una fotografía tras cada reacción.

### **7.10. Purificación de producto de PCR**

#### **7.10.1. Purificación directa del producto de PCR**

Se utilizó el kit comercial QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Alemania), basado en columnas de afinidad. Se siguió el proceso según las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se cuantificó la cantidad de ADN y su calidad.

#### **7.10.2. Purificación a través de geles de agarosa**

Se utilizó el kit comercial QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN, Alemania). Se cortó la banda de amplificación del fragmento de interés con un bisturí limpio y se pesó para calcular la cantidad idónea de tampón de disolución de gel de

agarosa. Se siguió el proceso según las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se cuantificó la cantidad de ADN y su calidad.

### **7.11. Extracción de ADN plasmídico**

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de Minipreps se utilizó el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Alemania), utilizando entre 1-5 mL de cultivo bacteriano. Se siguió el proceso según las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se cuantificó la cantidad de ADN y su calidad utilizando el dispositivo Nanodrop ya mencionado.

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de Midipreps se utilizó el kit comercial HiSpeed® Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Alemania), partiendo de 50 mL de cultivo bacteriano. Se siguió el proceso según las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se cuantificó la cantidad de ADN y su calidad.

### **7.12. Transfección del parásito**

#### **Precipitación de ADN**

Una vez obtenida la cantidad suficiente de ADN para la transfección, se concentró mediante el siguiente procedimiento:

1. Precipitar el ADN mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto.
2. Incubar en hielo durante  $\geq 10$  min.
3. Centrifugar a  $> 10,000$  g 15 min.
4. Retirar sobrenadante y añadir 1 ml de alcohol 70%.
5. Centrifugar a  $> 10,000$  g 15 min.
6. Retirar sobrenadante y dejar secar en atmósfera estéril.
7. Resuspender en 10  $\mu$ L de ZPFM (Zimmerman's Post Fusion Medium) o de tampón Amaxa por transfección.

#### IV. Material y Métodos

##### 7.12.1. Transfección por método clásico

Este método se realiza en un Electroporador BTX ECM 830 (Harvard Apparatus, Estados Unidos). Se utiliza el siguiente tampón para la transfección, ZPFM, cuya composición es la siguiente:

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
<b>NaCl 2.5M</b>	2,6 mL
<b>KCl 1M</b>	0,4 mL
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5M</b>	0,8 mL
<b>Acetato de magnesio 1,5M</b>	50 µL
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M</b>	75 µL
<b>Acetato de calcio 1.5M</b>	3 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	csp 50 mL

Se mezclan los componentes y se esteriliza por filtración

Por cada transfección, el procedimiento es el siguiente:

1. Se centrifugan  $2-3 \times 10^7$  promastigotes procedentes de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (densidad  $\leq 1 \times 10^7$  Parásitos/mL) a 800 g durante 7 min.
2. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 10 mL de ZPFM. Se centrifuga a 800g durante 7 min.
3. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 500 µL de ZPFM.
4. Se utilizan cubetas de electroporación de 1 cm. Se colocan en éstas 10 µL del constructo a transformar y 500 µL de cultivo en ZPFM y se mezcla.
5. Se coloca en el electroporador, se cierra y se realizan dos pulsos a 1,7 kV de 100 µs. Un sonido tipo "click" y la aparición de burbujas indican la correcta realización de la transfección.
6. En esterilidad, se traspasa el contenido de la cubeta a un frasco de cultivo tipo falcon de 25 cm<sup>2</sup> con 10 mL de medio M199 completo atemperado a 28 °C. Se comprueba la viabilidad del cultivo y se incuban a 28 °C durante 8-16h.
7. Pasado ese tiempo se añaden los fármacos de selección. Se cultiva durante una semana (se pueden realizar pases si el cultivo es muy denso) y tras ese tiempo se observan los mutantes, resistentes al fármaco de selección.

### 7.12.2. Transfección por método Amaxa®

*Leishmania* también se puede transfectar utilizando el dispositivo Amaxa Nucleofector II, con el kit Human T-Cell Kit (VPA-1002, Lonza, Suiza).

El procedimiento es el mismo que el clásico con las siguientes diferencias:

1. Solo se centrifuga una vez el cultivo y se resuspende en 100 µL de T-Cell Nucleofector solution.
2. Se utiliza una cubeta Amaxa® y la electroporación se lleva a cabo con el programa estándar X-001.

### 7.12.3. Fármacos de selección

Los fármacos de selección utilizados fueron adquiridos de Melford (Reino Unido) y su concentración se detalla en la siguiente tabla:

Producto	Concentración (µg/mL)
Bleomicina	5
Blasticidina	25

### 7.13. Western Blot

Esta técnica se utiliza para asegurar la presencia de la proteína en los supuestos mutantes, tanto en los mutantes con una proteína fusión GFP como en los mutantes sobreexpresando una proteína con tag myc. De este modo se evitan falsos mutantes que solo hayan integrado el gen GFP y la resistencia antibiótica sin expresar la proteína de interés.

Las proteínas que se buscan mediante esta técnica son la proteína de fusión GFP y el péptido myc.

#### **Preparación de la muestra: Lisado celular de *L. mexicana***

Para la preparación del extracto celular se utiliza el tampón de muestras de Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol y 0,125M Tris HCl, pH 6.8). El procedimiento se lleva a cabo en campana de extracción de gases. Se escoge un cultivo en fase de crecimiento exponencial ( $0,5-1 \times 10^7$  Parásitos/mL). Se centrifuga 5min 1200g y se lava con 10 mL de PBS y se resuspende en 1 mL de PBS. Se vuelve a centrifugar 1min en microcentrífuga a velocidad máxima. Se elimina el sobrenadante y se resuspende

#### IV. Material y Métodos

el pellet en tampón de muestras previamente calentado a 100 °C en la campana de extracción de gases, hasta una concentración de  $4 \times 10^8$  Parásitos/mL. Se hierve la muestra a 100 °C durante 3min y se colocan entonces en hielo. Una vez enfriada se les da un golpe de centrifuga y se utiliza o se almacena a -80 °C hasta su uso, en cuyo caso es necesario hervirla de nuevo antes de utilizarla.

#### **Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se prepara el molde del gel y se llena con gel de resolución al 10% preparado en campana de extracción de gases dejando espacio para el peine y se añade una capa de isopropanol. Se deja polimerizar durante 30 min. Se elimina el isopropanol, se lava con agua y se seca con papel whatman. Se añade el gel de apilamiento y se coloca el peine. Se deja polimerizar durante 30 min.

La composición de los geles de resolución y apilamiento es la siguiente:

<b>Componente</b>	<b>Gel de resolución</b>	<b>Gel de apilamiento</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	4 mL	2,7 mL
<b>mezcla de</b>	3,3 mL	670 µL
<b>Tris 1,5M a pH 8.8</b>	2,5 mL	500 µL
<b>SDS 10%</b>	100µL	40 µL
<b>persulfato de</b>	100 µL	40 µL
<b>TEMED</b>	4 µL	4 µL

Se introduce el gel en el aparato de electroforesis y se llena el tanque con tampón de corrido, se retira el peine y se cargan las muestras y el marcador de peso molecular. La electroforesis se lleva a cabo a 15 V/cm. Una vez terminado, se corta y retira el gel de apilamiento y se coloca el gel de resolución en tampón de transferencia Western.

#### **Transferencia**

Se coloca el gel en tampón de transferencia (tampón Towbin: Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol, 0,1% SDS, pH ajustado entre 8,2 y 8,4) hasta cubrirlo. Se incuba durante 10 min junto con un trozo de membrana de nitrocelulosa y dos de papel secante "blot" para que se saturen. Se ensambla el conjunto en una unidad de transferencia Hoefer TE 77 en el siguiente orden: Base de la unidad (ánodo), papel secante saturado, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida, papel secante saturado y la Tapa de la unidad (cátodo). Se conecta a la fuente de energía a 50 V y la transferencia se lleva a cabo a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> durante 1h. Se desmonta la unidad y se lava la membrana con ddH<sub>2</sub>O.

### DetECCIÓN DE ANTÍGENOS

Se utiliza anticuerpo IgG anti-GFP o anti-myc de ratón como anticuerpo primario y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa obtenido en conejo, ambos adquiridos de Roche (Francia).

La composición de los tampones utilizados fue la siguiente:

Tampón	Composición
20x TBS	200 mM Tris, pH 7.4, 3 M NaCl
TBS-Tween	1x TBS + 0,05% Tween 20
Tampón de bloqueo	1x TBS + 5% leche desnatada

Se incubó la membrana de nitrocelulosa en tampón de bloqueo durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se introduce la membrana en una bolsa termosellable, se llena con al menos 5 mL de anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (dilución 1:1000), se sella y se incubó en agitación durante 1h a temperatura ambiente. Se lava la membrana tres veces con TBS-Tween. Se repite la incubación con anticuerpo secundario (diluido en tampón de bloqueo a 40 mU/mL) y se repite el lavado. Una vez lavada, se introduce la membrana en reactivo para quimioluminiscencia a temperatura ambiente durante 1-5 min. Se coloca la membrana húmeda en un film de plástico y se coloca en el cassette de autoradiografía. Se expone la membrana a un film de autoradiografía Kodak BioMax durante entre 30s a 3 min de exposición. Se marca la posición de la membrana y del marcador de peso molecular en el film.

#### **7.14. Fijación de preparaciones y observación de fluorescencia en mutantes**

Para la microscopía de fluorescencia de las células expresando las proteínas de fusión fluorescentes, se recogieron  $5 \times 10^6$  parásitos, se lavaron con una solución de PBS-Reactivo Hoechst (500 ng/ $\mu$ L) tres veces y se resuspendió en 100  $\mu$ L de esa solución. Se dejaron sedimentar 15  $\mu$ L de esta suspensión en un portaobjetos, colocando un cubreobjetos antes del análisis microscópico.

Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia Leitz DMRB (Leica) usando una cámara Coolsnap FX, utilizando filtros para FITC (fluorescencia) y para DAPI (tinción Hoechst de ácidos nucleicos) se analizaron con el software informático libre ImageJ y micro-manager.

## IV. Material y Métodos

## **V. Resultados**

## V. Resultados

## 1. Ensayos in vitro

### 1.1. Ensayos de actividad de diversos compuestos sobre promastigotes de *L. infantum*

Estos ensayos se concibieron con la intención de facilitar la fase de cribado de nuevos compuestos dada la mayor facilidad de cultivo de esta fase del parásito. Con este método se evaluaron los siguientes compuestos de síntesis: SAHA (ácido hidroxámico-suberoilánilida), MTC-305, MDG, ECL, YSL. También se evaluó el compuesto natural (-)- $\alpha$ -bisabolol.

#### 1.1.1. SAHA y MTC-305, nuevo derivado hidroxámico de síntesis

El producto SAHA fue evaluado a 1, 5 y 10  $\mu$ M sin reducir la viabilidad de los promastigotes (Gráfico 1).

El compuesto MTC-305 se evaluó también a 1, 5, 10 y 100  $\mu$ M y no mostró reducción en la viabilidad celular a ninguna de ellas.

Por tanto, ninguno de los productos presentó actividad frente a promastigotes, que mostraron a las máximas concentraciones ensayadas valores de viabilidad de  $99,34 \pm 5,2$  % (MTC-305 a 100  $\mu$ M) y  $102,28 \pm 6,7$  % (SAHA a 10  $\mu$ M).

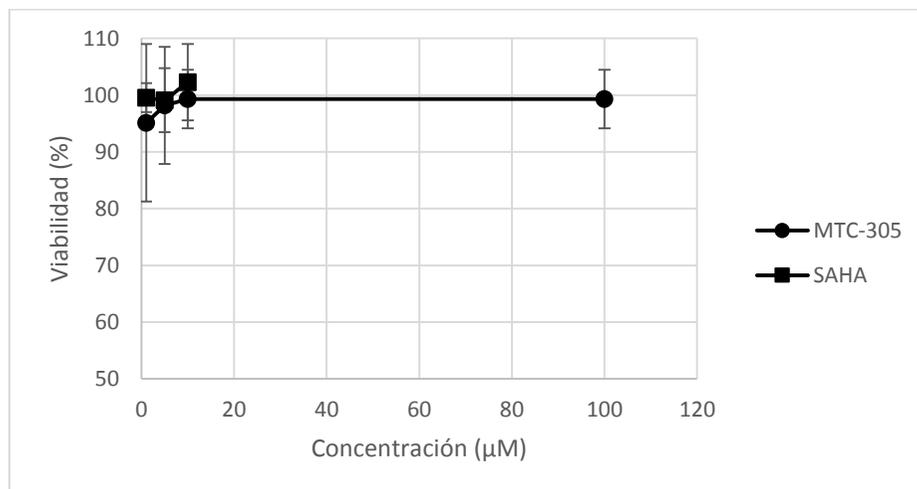


Gráfico 1. Viabilidad de los promastigotes de *L. infantum* (%) sometidos a distintas concentraciones de compuesto MTC-305 o SAHA.

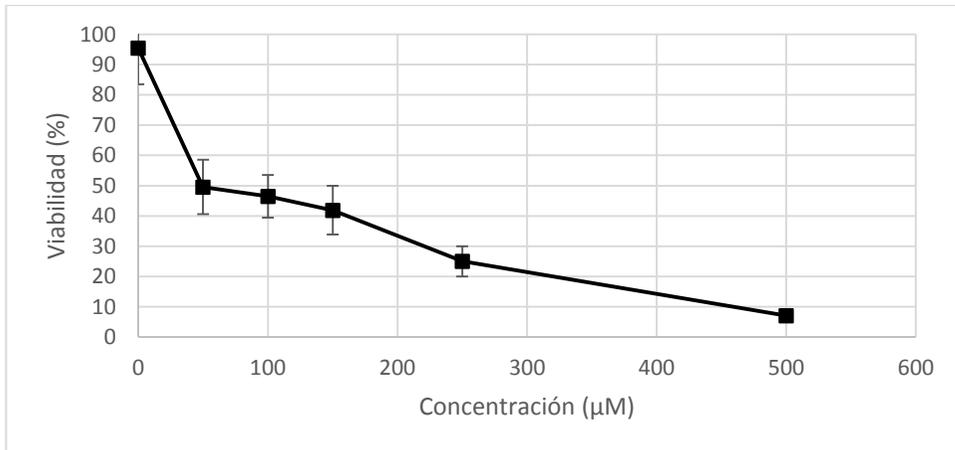
## V. Resultados

### 1.1.2. Otros derivados hidroxámicos de síntesis

Dada la ineficacia de SAHA y MTC-305 frente a promastigotes y el éxito alcanzado con el modelo de amastigotes intracelulares (*apartado 1.2.2*), el cribado de compuestos se realizó a continuación con el último. No obstante, los compuestos activos frente a amastigotes se ensayaron también frente a promastigotes. Ninguno de estos compuestos, ECL, MDG y YSL, mostró actividad *in vitro* frente a promastigotes en el rango de 1-100  $\mu\text{M}$ , con valores de viabilidad del parásito próximos al 100% a la máxima concentración utilizada (100  $\mu\text{M}$ ).

### 1.1.3. (-)- $\alpha$ -bisabolol

Este producto fue evaluado a concentraciones de 50, 100, 150, 250 y 500  $\mu\text{M}$ . Como se puede observar en el gráfico 2, la eficacia de este compuesto frente a promastigotes de *L. infantum* es dosis dependiente y la  $\text{IC}_{50}$  es inferior a 50  $\mu\text{M}$ . A 250  $\mu\text{M}$ , este sesquiterpeno reduce la viabilidad hasta el 25% y hasta el 7% a 500  $\mu\text{M}$ .



**Gráfico 2.** Actividad del (-)- $\alpha$ -bisabolol frente a promastigotes de *L. infantum* en términos de porcentaje de viabilidad.

## **1.2. Ensayos de actividad sobre amastigotes intracelulares en macrófagos**

Esta prueba se convirtió en el experimento de elección para la selección de compuestos activos frente a *Leishmania* spp. Las razones fueron las siguientes:

- a. El ensayo es muy eficiente y sus resultados en las condiciones realizadas precisos a pesar de la variabilidad en los porcentajes de infección.
- b. El compuesto MTC-305 resultó ineficaz frente a promastigotes pero muy eficaz frente a amastigotes intracelulares (fase del parásito realmente relevante en terapia). El uso de los tests frente a promastigotes hubiera dejado pasar desapercibidos compuestos muy interesantes para el tratamiento.

Por tanto, los ensayos frente a promastigotes pasaron a un segundo plano pero de gran interés para reforzar la hipótesis de que estos nuevos compuestos no son eficaces frente a esta fase del parásito.

### **1.2.1. Puesta a punto del modelo de infección experimental *in vitro***

La optimización del modelo de infección es un paso crucial para la evaluación satisfactoria de resultados. Es importante contar con una cepa de parásito recientemente aislada y que no haya sufrido muchos subcultivos (un máximo de 10) para que conserve la capacidad infectiva, así como un protocolo adecuado de infección con el que se pueda evaluar la eficacia de los compuestos de forma eficiente.

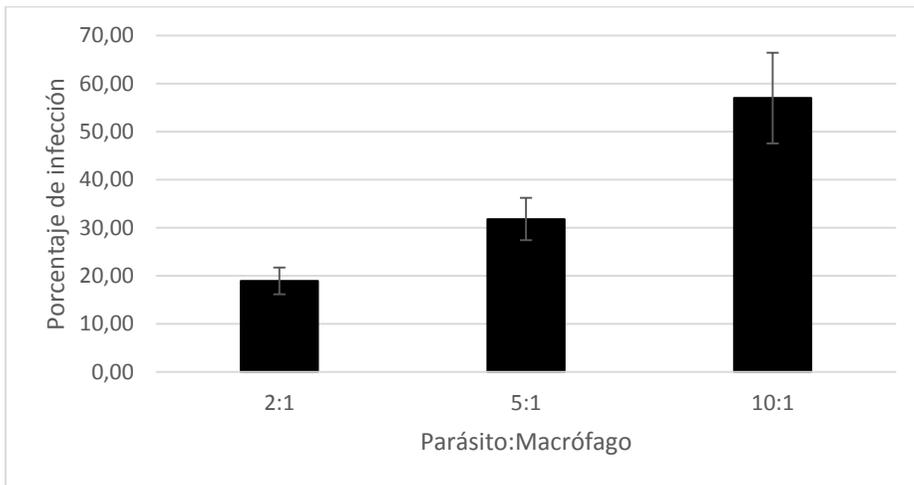
Para la puesta a punto del modelo de infección, evaluamos la capacidad de infección de dos cepas de *L. infantum*: *L. infantum* MHOM/ES/07/DP532 y MHOM/ES/90/DP204. Tras el cultivo y diferenciación de los macrófagos derivados de la médula ósea (BMMΦ), se infectaron, manteniendo los macrófagos en contacto con promastigotes del parásito durante 2h a distintas proporciones Parásito: BMMΦ, siendo éstas 2:1, 5:1, 10:1 y 20:1. Los resultados se evaluaron a las 48h.

La cepa DP204 mostró una marcada falta de capacidad infectiva, no encontrándose ningún amastigote en las preparaciones.

Por el contrario, la cepa DP532 resultó muy infectiva, como se aprecia en el gráfico 3, mostrando altas tasas de infección en los macrófagos, especialmente en las proporciones 10:1 y 20:1. No elegimos esta última debido a que en estas preparaciones, el número de macrófagos estaba seriamente disminuido, lo cual

## V. Resultados

podría afectar a la evaluación de posteriores resultados. Por tanto fue elegida para los siguientes experimentos la cepa DP532 en una proporción 10:1.



**Gráfico 3. Puesta a punto del modelo de infección. Media y desviación estándar del porcentaje de infección de los macrófagos utilizando la cepa DP532.**

### **1.2.2. Evaluación del SAHA y otros compuestos hidroxámicos de síntesis**

Se evaluaron 22 compuestos incluyendo el SAHA frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en macrófagos. De éstos, 5 productos mostraron una alta actividad ( $IC_{50} < 10 \mu M$ ). Aunque la  $IC_{50}$  del SAHA fue inferior a  $10 \mu M$ , no se puede considerar un producto a considerar en ensayos *in vivo* dado que muestra citotoxicidad sobre los macrófagos a  $20 \mu M$ .

La tabla 7 resume la actividad y toxicidad de los compuestos sometidos a cribado. Todos ellos fueron evaluados a varias concentraciones en el rango 1-100  $\mu M$ . Aquellos compuestos que resultaron interesantes, fueron evaluados posteriormente con mayor detalle, como es el caso de MTC-305, SPF-841, MDG, ECL y YSL, para la determinación exacta de su  $IC_{50}$ , de la citotoxicidad  $CC_{50}$  o de su actividad frente a otras especies de *Leishmania*.

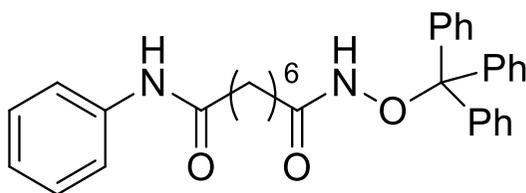
El compuesto SAHA mostró actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en macrófagos, pero también mostró citotoxicidad a  $20 \mu M$ , observando un número reducido de macrófagos a esas concentraciones. Dado que es un compuesto muy estudiado, se recurrió a la bibliografía, encontrándose que su  $CC_{50}$  en líneas celulares de mamífero es de  $6,5 \mu M$  (Patil et al. 2010), siendo un compuesto tan citotóxico como activo frente a *L. infantum*, y siendo esta actividad

no selectiva (mostraría un índice de selectividad, SI=1). Por estas razones no se llevaron a cabo más investigaciones con este producto, *in vitro* o *in vivo*.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	Citox <sub>BMDM</sub> (μM)	CC <sub>50,L929</sub> (μM)
SAHA	6.3±3.8	20	NA
MTC-305	3.21±1.8	>100	>100
MAR71	82.92±13.7	>100	NR
SPF581A	33.64±17.0	>100	NR
SPF251	>100	>100	NR
SPF873	74.9±21.0	>100	NR
SPF881	69.1±6.2	100	NR
SPF913	>100	>100	NR
SPF984	>100	100	NR
SPF925	>100	>100	NR
SPF947	>100	1	NR
SPF533A	>100	>100	NR
SPF841	3.67±4.9	>100	NR
SPF765	>100	>100	NR
SPF761	>100	>100	NR
SPF813	>100	>100	NR
SPF777	50-100	>100	NR
SPF1042	50-100	>100	NR
SPF857	20-50	>100	NR
ECL	0.33±0,1	>100	>100
MDG	0.69±0.1	>100	>100
YSL	1.05±0.1	>100	>100
PI	1.50±0.1	10	6.08±0.2
MA	144.40±41.0	200	273.08±12.2

Tabla 7. Actividad y toxicidad de SAHA y derivados en ensayos *in vitro*. Se muestra la actividad (IC<sub>50</sub>) frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*, la concentración a la que se observa citotoxicidad en BMDM (Citox<sub>BMDM</sub>) y citotoxicidad en fibroblastos L929 (CC<sub>50,L929</sub>) del SAHA y sus 21 derivados y los productos control de referencia isetonato de pentamidina (PI) y antimonio de meglumina (MA). NR= No realizado.

### 1.2.3. Propiedades, características químicas y actividad frente a parásitos kinetoplástidos del compuesto MTC-305



**MTC**

**Figura 13. Estructura química del compuesto MTC-305. Ph= Radical fenilo**

Se trata de un compuesto derivado del SAHA en el grupo hidroxilo del ácido hidroxámico con la adición de un grupo tritilo, dando lugar a un éster del ácido hidroxámico (hidroxamato). Debido al radical tritilo, el compuesto es muy poco hidrosoluble.

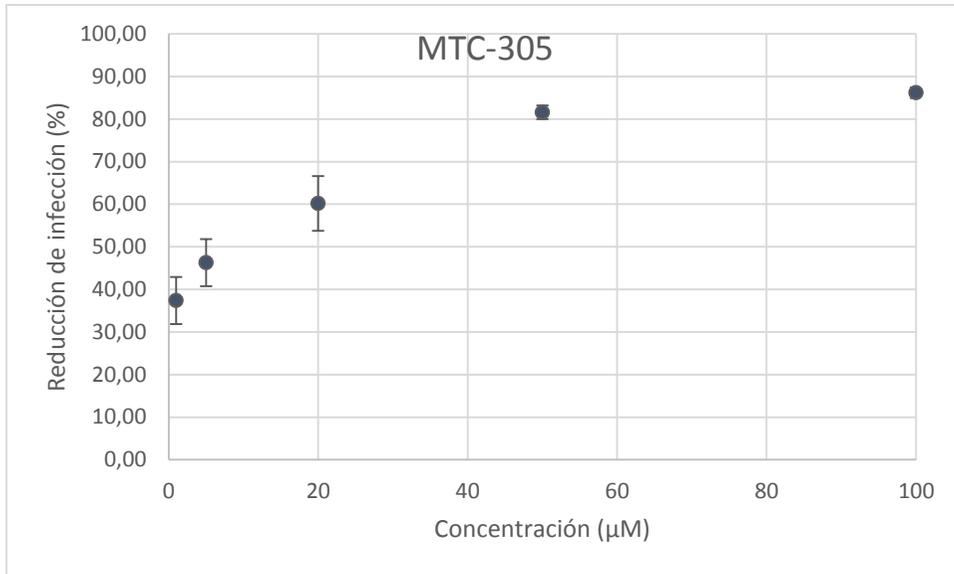
Propiedades:

- Peso molecular: 506,63 g/mol
- Solubilidad: En DMSO
- Aspecto: Polvo blanco, solución cristalina

Este producto no tiene actividad frente a promastigotes de *L. infantum*.

Fruto de la elevada variabilidad en los experimentos de infección (34-97 % de infección en los controles), se pudo observar que su actividad se ve afectada por la carga de parásito. De este modo, se elaboró un modelo matemático que incluía como variables independientes: el porcentaje de infección inicial de los macrófagos (dado por el porcentaje de infección de los controles sin tratamiento) y la concentración de producto.

El compuesto MTC-305 resultó muy activo frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*; en este modelo su  $IC_{50}$  es 3,21  $\mu$ M (considerando un porcentaje de infección del 50%) y su curva de actividad responde a un modelo logarítmico (Gráfico 4).



**Gráfico 4. Actividad del MTC-305 frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*. Reducción del porcentaje de infección a 1, 5, 20, 50 y 100 µM. Media y desviación estándar de 6 experimentos con porcentajes de infección inicial de entre el 32-98%.**

Se obtuvo un modelo de regresión múltiple con la siguiente fórmula:

$$RP = 43,539 - 0,144 \times I + 26,948 \times \log C \quad (R^2 = 79,0\%)$$

Donde  $RP$  es la reducción en el porcentaje de infección,  $I$  es el nivel de infección de los macrófagos no tratados (en %) y  $C$  es la concentración del MTC-305 (µM).

La significación estadística para las variables independientes,  $I$  y  $C$ , y para el modelo fue  $p < 0,01$ .

Otros parámetros del modelo fueron:

- Error estándar de la estimación = 9,16
- Error absoluto de la media = 6,75

Con los cuales se pueden elaborar intervalos de confianza.

Como se puede observar en la tabla 8, el MTC-305 fue evaluado posteriormente en distintas especies del género *Leishmania*, tanto viscerotrópicas (*L. donovani*) como dermatotrópicas (*L. major* y *L. tropica*). También se evaluó frente a amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

## V. Resultados

MTC-305 resultó muy eficaz frente a amastigotes intracelulares de todas las especies de *Leishmania*, especialmente frente a las dermatrópicas; también resultó eficaz frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi*.

Su citotoxicidad en fibroblastos L929 fue nula hasta 100  $\mu\text{M}$  (máxima concentración ensayada), concentración a la que la viabilidad celular no resultó diferente a la del control.

El índice de selectividad del compuesto se determinó y resultó muy alto en todas las especies evaluadas, con valores mayores de 30.

Como principal inconveniente, el compuesto MTC-305 muestra muy baja solubilidad, que limita tanto su uso *in vitro* a concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$  como su administración *in vivo*.

V. Resultados

	IC <sub>50</sub> (μM) Amastigote intracelular (Media±SD)					Citotoxicidad	Índice de selectividad				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>T. cruzi</i>	CC <sub>50</sub> (μM) (Media±SD)	(CC <sub>50,L929</sub> /IC <sub>50,Leishmania</sub> )				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>T. cruzi</i>	L929	<i>L. infantum</i> <sup>a</sup>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>T. cruzi</i>
<b>MTC-305</b>	3,21±1,8	2.91±0.2	1,00±0,3	0,71±0,2	0,63±0,2	>100	>31	>34	>100	>140	>160
<b>MA</b>	144,40±41,0	96,37±7,4	101,13±12,4	123,33±5,8	NR	273,08±12.2	2	3	3	2	NR
<b>PI</b>	1,50±0,1	0,88±0,2	0,96±0,2	0,62±0,1	1,81±0,4	6,08±0,2	4	7	6	10	3

Tabla 8. Actividad, citotoxicidad frente a fibroblastos L929 e índice de selectividad del compuesto MTC-305 y los controles de referencia frente a amastigotes intracelulares de distintas especies de *Leishmania* y frente a amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. NR=No realizado. PI= Isetionato de pentamidina, MA= Antimoniato de meglumina, SD= desviación estándar.

#### **1.2.4. Actividad frente a *L. infantum* de otros compuestos derivados del SAHA**

Los compuestos evaluados fueron MAR-71, SPF-251 y SPF-581A. Ninguno de ellos mostró una actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* similar a la del MTC-305 (tabla 7).

#### **1.2.5. Estructura química y actividad frente a *L. infantum* de compuestos derivados de MTC-305**

Los compuestos SPF-873, SPF-881 y SPF-947 (figura 14) fueron derivados del MTC-305 con modificaciones en los radicales fenilo del grupo tritilo. Los dos primeros mostraron una actividad moderada (tabla 7) frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* con  $IC_{50} > 50 \mu M$ . El compuesto SPF-947 mostró una elevada citotoxicidad sobre los macrófagos, con una  $CC_{50}$  inferior a  $1 \mu M$ .

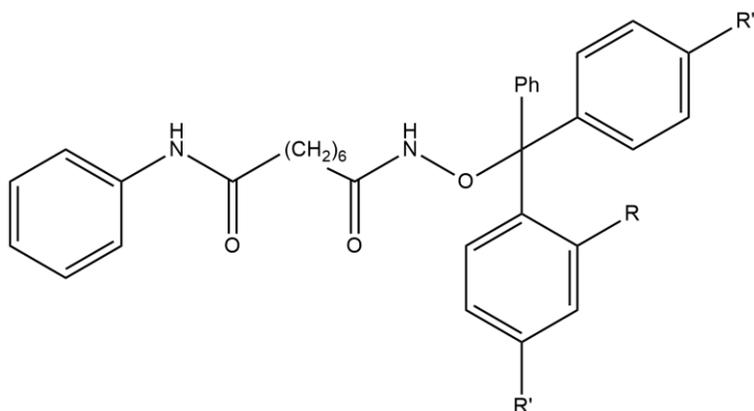


Figura 14. Compuestos derivados de MTC-305 sin actividad antiparasitaria. SPF-873: R=Cl; R', R''=H. SPF-881: R, R'=H; R''=CH<sub>3</sub>. SPF-947: R=H; R', R''=OCH<sub>3</sub>.

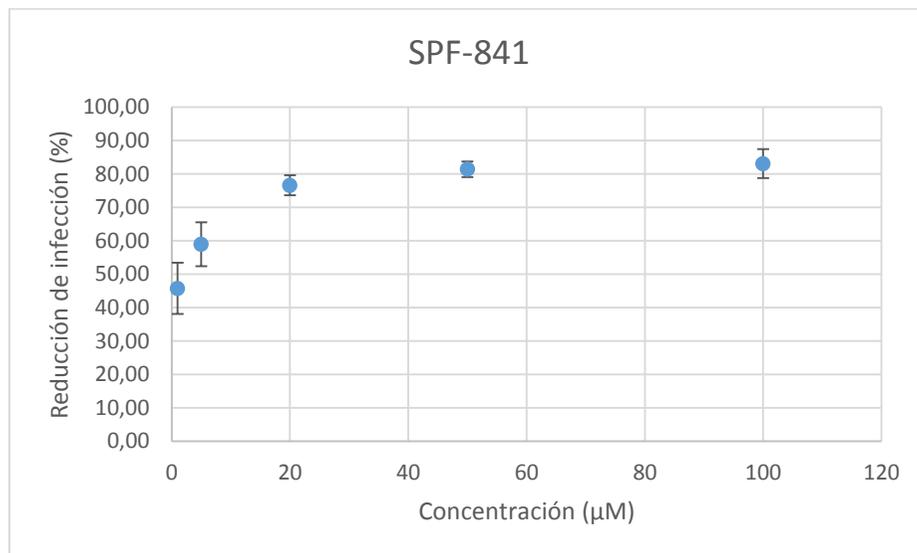
### 1.2.6. Propiedades, características químicas y actividad frente a *L. infantum* del compuesto SPF-841

Con una modificación en el hidroxámico (o-alkilado) y una estructura ligeramente distinta a la del SAHA,

Su perfil de síntesis es complicado, razón por la cual no se analizó *in vitro* en más profundidad o *in vivo*. Sin embargo, es un producto importante desde el punto de vista de las relaciones estructura-actividad, al ser el primer compuesto con el que se ha obtenido actividad frente a *L. infantum* similar a la mostrada por MTC-305.

Propiedades:

- Peso molecular: 668,80 g/mol
- Solubilidad: Inferior al MTC-305
- Aspecto: Polvo blanco, solución transparente



**Gráfico 5. Actividad del compuesto SPF-841 frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en términos de porcentaje de reducción de infección.**

La actividad anti-*Leishmania* del compuesto responde a un modelo de tipo logarítmico, como se puede observar en la siguiente fórmula:

$$RP = 45,7839 + 8,80051 \times \ln C \quad (R^2 = 88\%)$$

- Error estándar de la estimación = 5,56
- Error absoluto de la media = 4,47

## V. Resultados

Como se puede observar en el gráfico 5, SPF-841 es un compuesto muy activo frente a amastigotes de *L. infantum* ( $IC_{50}=3,67 \mu M$ ) pero con una solubilidad muy reducida que no permite determinar una relación dosis-respuesta a partir de  $20 \mu M$ .

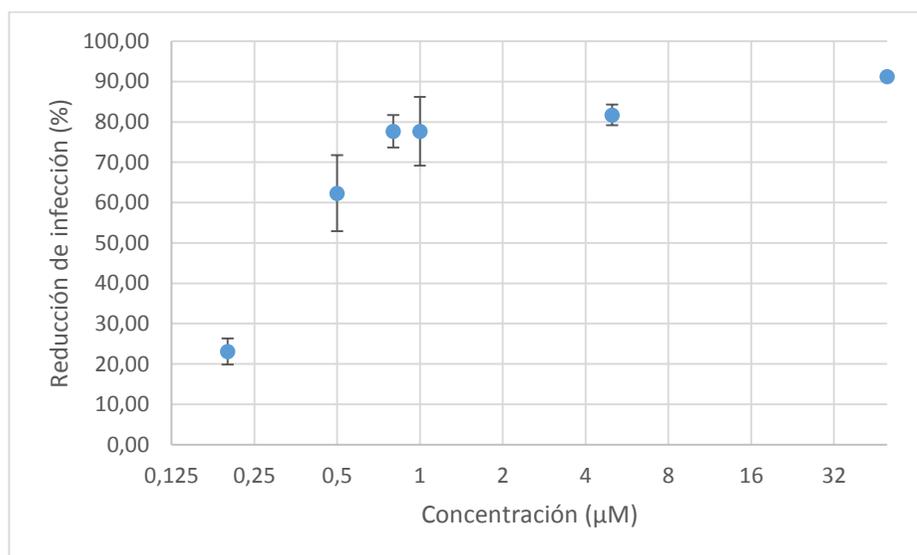
Este producto no es citotóxico *in vitro* frente a BMM $\Phi$  en el rango 1-100  $\mu M$ .

### **1.2.7. Propiedades, características químicas y actividad frente a *L. infantum* del compuesto ECL**

El compuesto no es eficaz frente a promastigotes mientras que frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* muestra la actividad más elevada de entre todos los compuestos ensayados. Como otras estructuras, comparte el problema de la baja hidrosolubilidad.

Propiedades:

- Peso molecular: 585,53 g/mol
- Solubilidad: Inferior al MTC-305
- Aspecto. Polvo blanco, solución cristalina



**Gráfico 6. Actividad del compuesto ECL frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en términos de porcentaje de reducción de infección**

Como se observa en el gráfico 6, existe una relación dosis-respuesta de tipo sigmoïdal (sin umbral). Se obtuvo el siguiente modelo matemático:

$$RP = 88,9063 - 12,9636/C \quad (R^2 = 93\%)$$

- Error estándar de la estimación = 5,86547
- Error absoluto de la media = 4,66031

Su actividad es casi diez veces superior a la del MTC-305:

$$IC_{50} = 0,33 \pm 0,1$$

El compuesto no es citotóxico en BMM $\Phi$  ni en fibroblastos L929 en el rango 1-100  $\mu$ M. Este producto presenta sin embargo graves problemas en su síntesis y solubilidad, lo que dificulta su trabajo en animales, de forma que no se continuó trabajando con él.

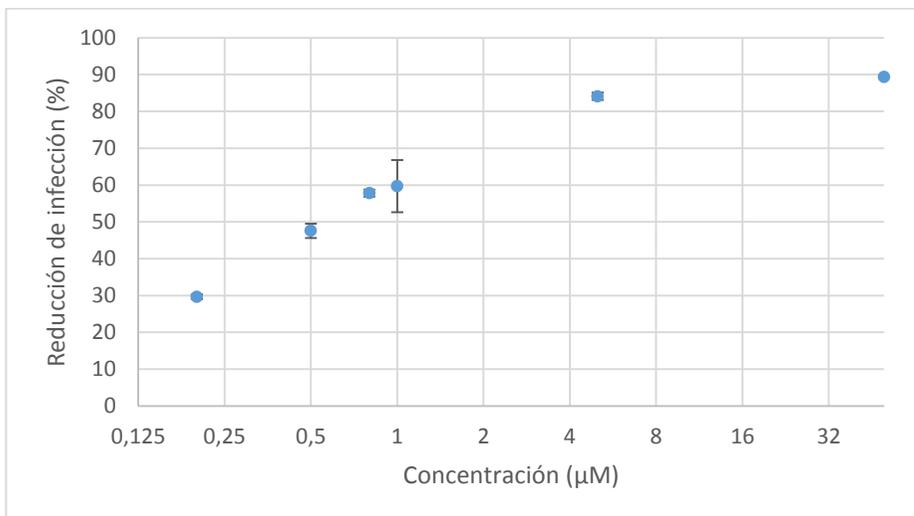
## V. Resultados

### 1.2.8. Propiedades, características químicas y actividad frente a *L. infantum* del compuesto MDG

Se trata de un compuesto hidroxamato O-alkilado con radicales distintos al MTC-305. El compuesto MDG mostró una gran actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*, mejorando incluso al MTC-305, con una mejor solubilidad. Carece de actividad frente a promastigotes de *L. infantum*.

Propiedades:

- Peso molecular: 354,44 g/mol
- Solubilidad: Mejor a la del MTC-305
- Aspecto: Polvo blanco, solución cristalina



**Gráfico 7. Actividad del compuesto MDG frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en términos de porcentaje de reducción de infección.**

Su actividad frente al parásito responde a un patrón de doble inversa como se puede observar en el gráfico 7 y en la siguiente fórmula:

$$RP = \frac{1}{(0,0118124 + 0,0044687/C)} \quad (R^2 = 97\%)$$

- Error estándar de la estimación = 0,0012
- Error absoluto de la media = 0,0008

Obteniendo una  $IC_{50} = 0,69 \pm 0,1 \mu M$

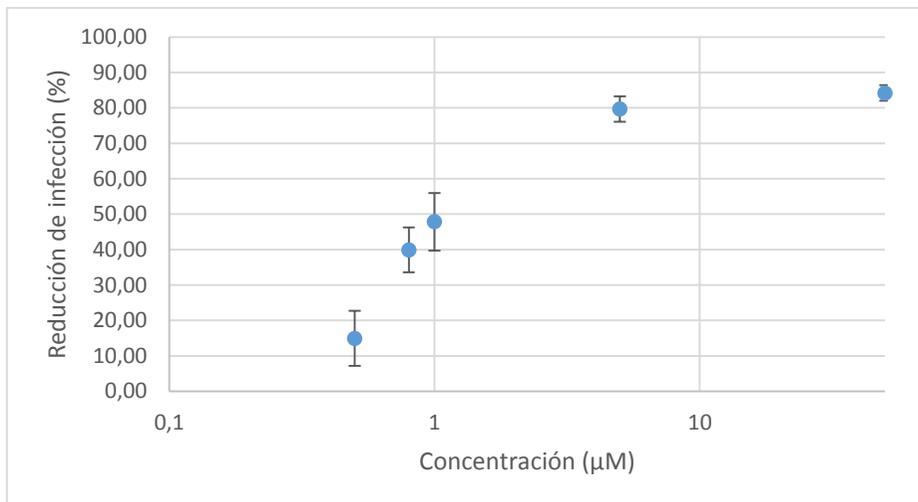
Su citotoxicidad es nula en BMMΦ y en fibroblastos L920, no reduciendo la viabilidad de estos en el rango 1-100 µM.

### 1.2.9. Propiedades, características químicas y actividad frente a *L. infantum* del compuesto YSL

Como SPF-841, se trata de un compuesto distinto al SAHA pero con un O-alquil hidroxamato del MTC-305. Mostró una gran actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* (similar a MDG), aunque no frente a promastigotes, como los anteriores.

Propiedades:

- Peso molecular: 492,6 g/mol
- Solubilidad: Mejor a la del MTC-305
- Aspecto: Polvo blanco, solución cristalina



**Gráfico 8. Actividad del compuesto YSL frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en términos de porcentaje de reducción de infección.**

Al igual que el MTC-305, su relación dosis-respuesta responde a un patrón sigmoideal sin umbral, como se puede observar en la siguiente fórmula y en el gráfico 8.

$$RP = 85,9582 - \frac{37,8821}{C} \quad (R^2 = 93\%)$$

- Error estándar de la estimación: 5,00
- Error absoluto de la media: 2,33

Obteniendo una  $IC_{50} = 1,05 \pm 0,1$

No mostró citotoxicidad frente a  $BMM\Phi$  ni frente a fibroblastos L929.

## V. Resultados

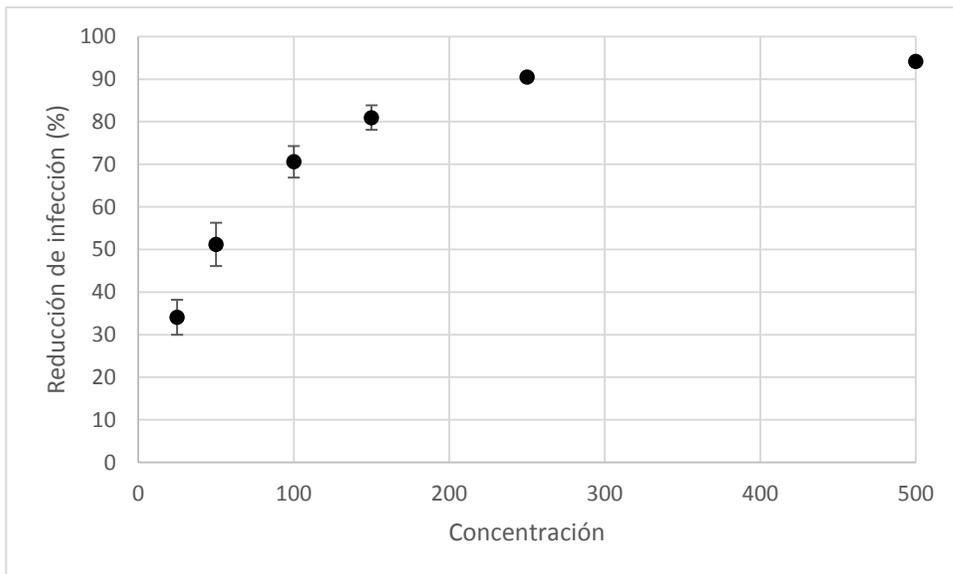
### 1.2.10. Actividad frente a *Leishmania* spp. y frente a *T. cruzi* del compuesto (-)- $\alpha$ -bisabolol

Este derivado sesquiterpénico de origen natural se evaluó frente a parásitos en un rango de concentraciones de 25-500  $\mu$ M.

Al igual que en los casos anteriores, la elevada variabilidad en los niveles de infección de los experimentos indujeron a la elaboración de un modelo matemático que reflejara la influencia del nivel de infección de los macrófagos en la actividad del compuesto:

$$RP = 116,38 - \frac{2273,02}{C} - 0,53 \times I \quad (R^2 = 90,5\%)$$

Donde  $R$  es la reducción de infección en porcentaje, " $C$ " es la concentración ( $\mu$ M) e " $I$ " es el nivel de infección de los macrófagos sin tratamiento.



**Gráfico 9. Actividad del (-)- $\alpha$ -bisabolol frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* en términos de porcentaje de reducción de infección.**

Como se puede observar en el gráfico 9, la relación entre las variables es sigmoide (sin umbral).

La actividad del (-)- $\alpha$ -bisabolol frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* resultó moderada ( $IC_{50}=56,93 \mu$ M)

La citotoxicidad del producto resultó muy baja. Evaluándolo en el rango 50-1000  $\mu\text{M}$  se observó que la viabilidad de los fibroblastos L929 tratados con el compuesto hasta 500  $\mu\text{M}$  permaneció similar a las de los fibroblastos no tratados ( $86,7 \pm 11\%$  viabilidad,  $p > 0,1$ ) y solo se detectó citotoxicidad a 1000  $\mu\text{M}$ , donde la viabilidad descendió a  $62,3 \pm 20\%$ . Por tanto, la citotoxicidad celular fue muy reducida. Con estos datos se elaboró un modelo de regresión con el fin de predecir la  $\text{CC}_{50}$  del compuesto, resultando ésta en  $1148,2 \pm 149 \mu\text{M}$ .

Gracias a la baja toxicidad del compuesto, el índice de selectividad del (-)- $\alpha$ -bisabolol resultó elevado, como se puede observar en el gráfico 9, con valores de SI mayores que 20.

En la tabla 9 se pueden observar las eficacias del (-)- $\alpha$ -bisabolol frente a amastigotes intracelulares de *L. donovani*, las otras especies dermatrópicas, *L. major* y *L. tropica*, así como frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. Al igual que en el caso del MTC-305, la especies dermatrópicas resultaron más sensibles al tratamiento con (-)- $\alpha$ -bisabolol que los demás.

V. Resultados

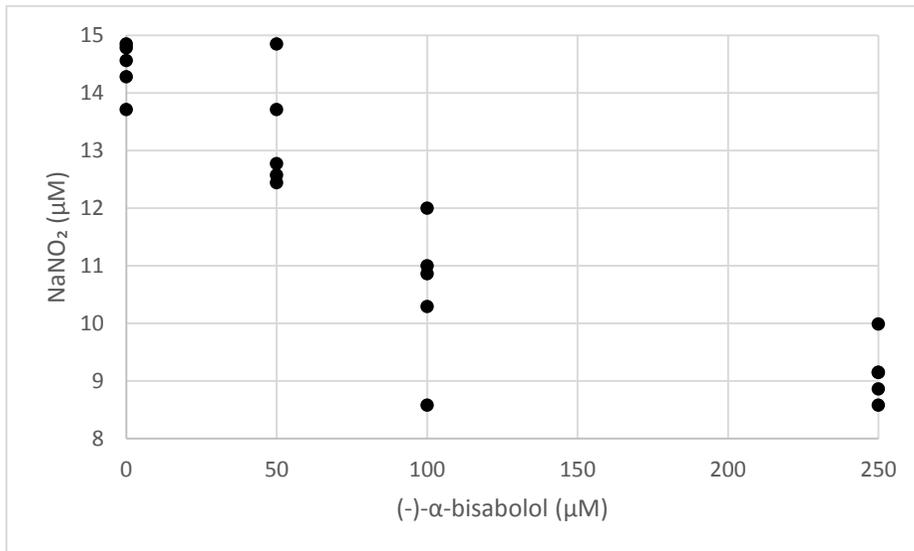
	IC <sub>50</sub> (μM) Amastigote Intracelular (Media±SD)					Citotoxicidad	Indice de selectividad				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>T. cruzi</i>	CC <sub>50</sub> (μM) (Media±SD)	(CC <sub>50,L929</sub> /IC <sub>50,Leishmania</sub> )				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>T. cruzi</i>	L929	<i>L. infantum</i> <sup>a</sup>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>T. cruzi</i>
<b>(-)-α-bisabolol</b>	56,93±7,9	39,39±7,0	33,68±8,1	25,21±2,9	45,39±10,0	1148,2±148	20	29	34	46	25
<b>MA</b>	144,40±41,0	96,37±7,4	101,13±12,4	123,33±5,8	NR	273,08±12,2	2	3	3	2	NR
<b>PI</b>	1,50±0,1	0,88±0,2	0,96±0,2	0,62±0,1	1,81±0,4	6,08±0,2	4	7	6	10	3

Tabla 9. Actividad, citotoxicidad e índice de selectividad del (-)-α-bisabolol y los controles de referencia frente a amastigotes intracelulares de distintas especies de *Leishmania* y frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. MA= Antimoniato de meglumina, PI= Isetionato de pentamidina, NR=No realizado, SD= desviación estándar.

### 1.3. Evaluación del mecanismo de acción del (-)- $\alpha$ -bisabolol

#### Influencia sobre la generación de óxido nítrico en macrófagos

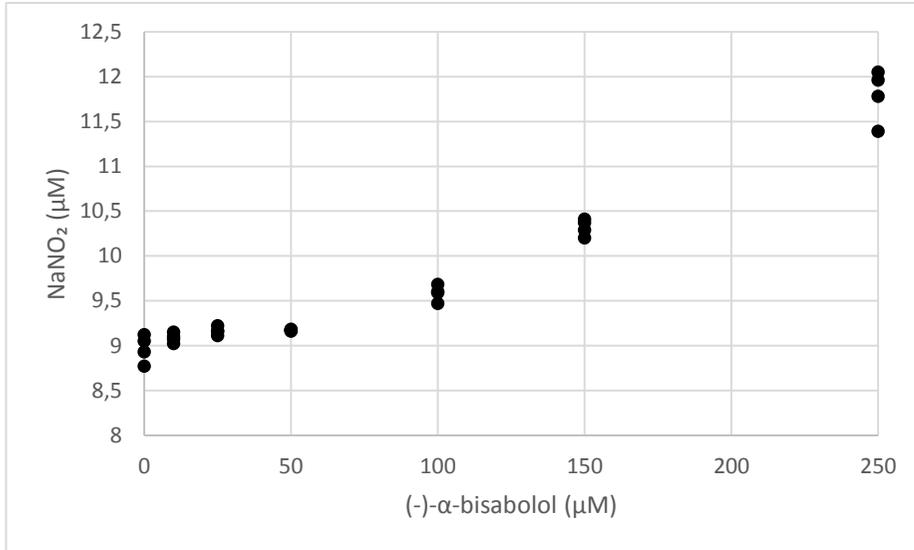
Este compuesto natural disminuye la generación de óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ) en macrófagos J774.2 no infectados de una forma dosis-dependiente ( $p < 0,05$ ) como muestra el siguiente gráfico.



**Gráfico 10.** Influencia del (-)- $\alpha$ -bisabolol sobre la generación de  $\text{NO}^*$  en macrófagos J774.2 no infectados

Al infectar los macrófagos, también decrece la generación de  $\text{NO}^*$  conforme aumenta el porcentaje de infección. Sin embargo, cuando se trata de macrófagos infectados tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol la tendencia se invierte de forma significativa ( $p < 0,05$ ). En el gráfico 11 se muestra la influencia de este sesquiterpeno sobre la generación de  $\text{NO}^*$  en macrófagos infectados por *L. tropica* utilizando resultados similares de infección (porcentaje de infección de entre el 30-33%).

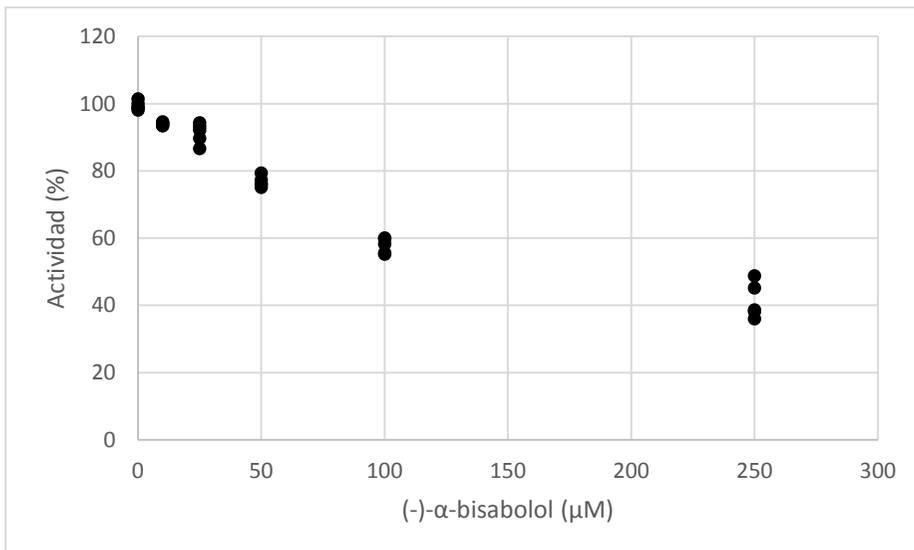
## V. Resultados



**Gráfico 11.** Efecto del compuesto natural en la generación de  $\text{NO}^*$  en macrófagos J774.2 infectados con *L. tropica* al mismo nivel de infección (30-33%)

### Evaluación del daño mitocondrial en el parásito y resistencia a óxido nítrico

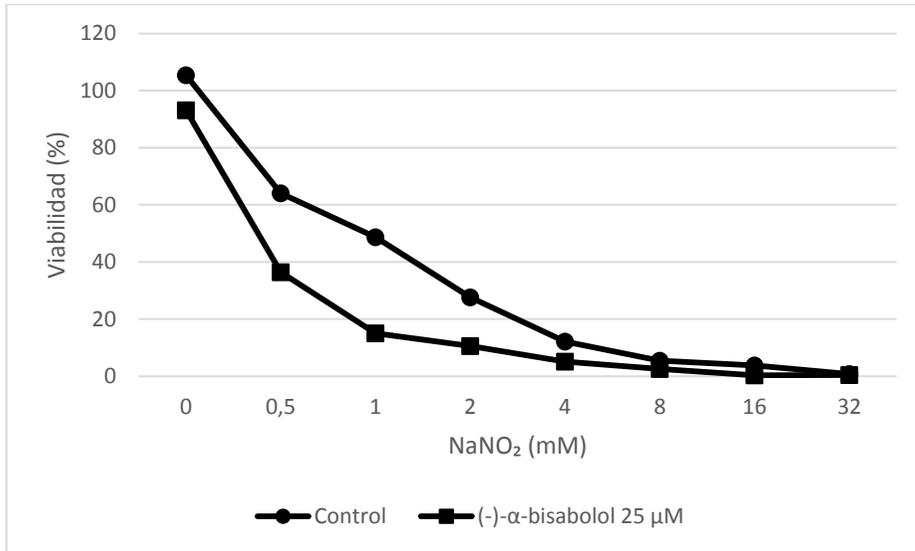
Se ha evaluado la afectación mitocondrial del (-)- $\alpha$ -bisabolol sobre promastigotes de *L. tropica*. Se observa como al aumentar la concentración de (-)- $\alpha$ -bisabolol, disminuye la actividad enzimática del parásito incluso tratándose de periodos de exposición cortos, en este caso 4h ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 12.** Influencia del (-)- $\alpha$ -bisabolol sobre la actividad enzimática del parásito *L. tropica*

Por último, se analizó la resistencia del parásito a concentraciones crecientes de  $\text{NaNO}_2$  (precursor de óxido nítrico) en parásitos incubados previamente durante 2h con el sesquiterpeno.

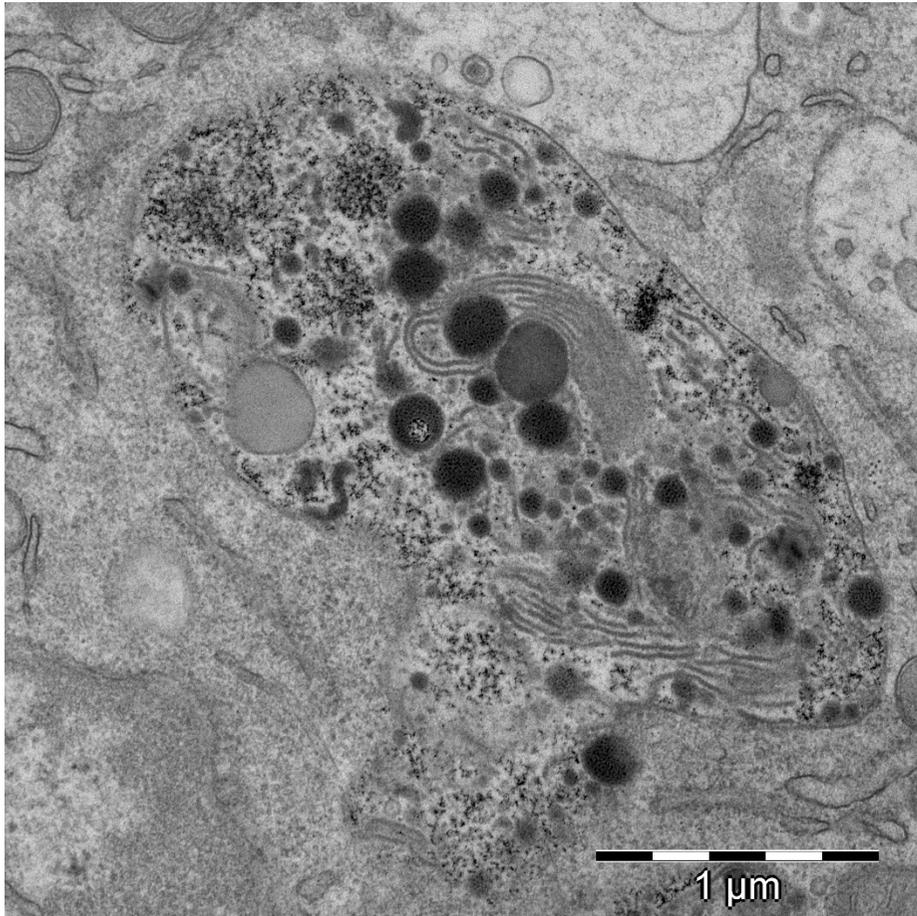
En la siguiente gráfica se observa como el parásito es más susceptible a la acción del  $\text{NO}^*$  cuando se incuba previamente con el compuesto, presumiblemente por su daño a nivel mitocondrial.



**Gráfico 13.** Influencia del (-)- $\alpha$ -bisabolol sobre la resistencia a  $\text{NO}^*$  de promastigotes de *L. tropica*. Se muestra la viabilidad media de los parásitos sin incubar o incubados con el compuesto natural durante 2h.

### **Ultraestructura de los amastigotes sometidos a tratamiento con (-)- $\alpha$ -bisabolol**

En las siguientes fotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión se puede observar como el compuesto penetra en los macrófagos y llega hasta el parásito (zonas electrodensas u oscuras). De hecho, el compuesto se localiza preferentemente dentro del parásito.



**Figura 15. Amastigote intracelular de *L. tropica* con el compuesto en su interior (zonas oscuras o electrodensas).**

En estas fotografías se observa como el compuesto se distribuye por todos los compartimentos del parásito. Sin embargo, éste no apareció por otras zonas del macrófago, indicando que llega selectivamente a los amastigotes. La estructura de estos amastigotes se encuentra muy deteriorada ya que las fotografías fueron obtenidas tras 48h de tratamiento con el compuesto a 25  $\mu$ M.

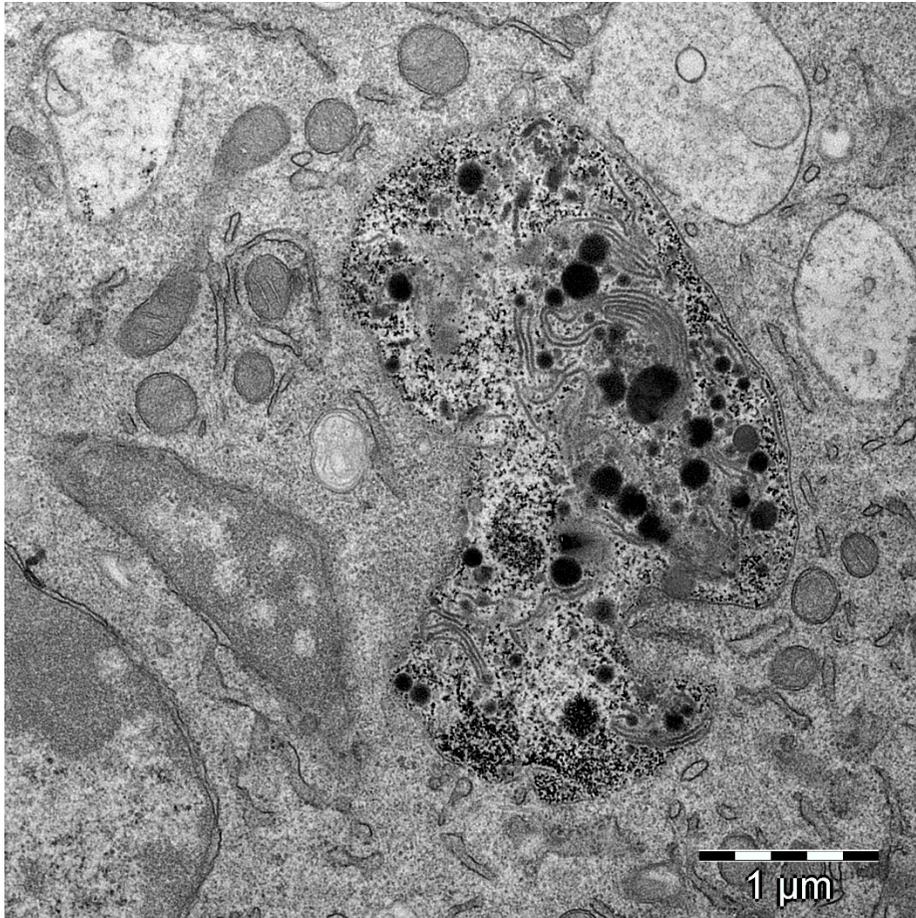


Figura 16. Amastigote de *L. tropica* seriamente alterado por el (-)- $\alpha$ -bisabolol. Se observa la localización de éste solo dentro del parásito.

#### 1.4. Ensayos *in vitro* frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* con el compuesto MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y de oro

Como se ha mencionado anteriormente, el compuesto MTC-305 es muy insoluble, por lo que se vehiculizó el compuesto en nanopartículas de PLGA o de oro. La vehiculización del compuesto fue llevada a cabo por el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada. Los ensayos para comparar las formulaciones vehiculizadas del MTC-305, entre sí y con el tratamiento con MTC-305 libre se realizaron por triplicado. La tabla 10 muestra los resultados de reducción de infección encontrados comparándolos con los resultados teóricos de reducción de infección obtenidos con el modelo teórico del compuesto MTC-305 libre para un nivel de infección del 71,1%.

<b>Tratamiento Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Resultado experimental, % (media<math>\pm</math>de)</b>	<b>Resultado teórico, % (media [intervalos 95%])</b>
<b>MTC-305 libre. 5</b>	64,72 $\pm$ 7,4	51,82 [33,8 – 69,8]
<b>MTC-305 PLGA. 3,21</b>	54,29 $\pm$ 8,8	46,77 [28,7 – 64,9]
<b>MTC-305 Oro. 14,3</b>	70,59 $\pm$ 1,2	69,28 [51,1 – 87,5]

Tabla 10. Resultados del tratamiento *in vitro* con MTC-305 encapsulado en nanopartículas. Los resultados se muestran en porcentaje de reducción de infección

Los resultados obtenidos experimentalmente se corresponden con los aproximados por el modelo. Por tanto, la vehiculización con nanopartículas de PLGA o de oro no afecta negativamente a la eficacia del MTC-305 *in vitro*.

No se observó citotoxicidad en los macrófagos infectados tratados con nanopartículas de PLGA u oro solas, o con el compuesto vehiculizado en estas nanopartículas, en sus distintas concentraciones.

## 2. Experimentos *in vivo* sobre ratones infectados experimentalmente

### 2.1. Optimización de la infección experimental

El modelo animal elegido para llevar a cabo los ensayos de infección experimental con *L. infantum* fue el ratón Balb/c.

Se hicieron grupos de 4 ratones hembra Balb/c de 6 semanas de edad y se infectaron con la cepa de *L. infantum* MCAN/ES/07/DP534 utilizando distintas fases del parásito, dosis y vías de infección y distintos tiempos de sacrificio tras la infección.

Los factores evaluados en el modelo fueron los siguientes:

- Dosis de infección:  $10^6$ ,  $10^7$  o  $10^8$  parásitos por inoculación
- Vía de infección: Intravenosa o intraperitoneal
- Tiempo de evaluación de la infección: 14, 28 o 60 días post infección.
- Fase infectiva: Promastigote o amastigote

Dosis (millones)	10	10	100	100	10	10	1	1	10	10
Sacrificio	28	14	28	60	28	14	14	28	14	28
Fase	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A
Vía de inoculación	IP	IP	IP	IP	V	V	V	V	V	V
Carga parasitaria en bazo	1074,5	0	12,4	44,3	0,72	1,01	0,8	0,52	1,78	12,06
Improntas	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
Cultivos	+++	-	+++	+++	+	-	+++	-	-	+++

**Tabla 11. Optimización del modelo experimental.** La tabla muestra las cargas parasitarias (parásitos por miligramo de bazo), presencia de amastigotes en improntas de hígado o bazo (positivo o negativo) y aislamiento de parásito en cultivo en bazo (+), en bazo, hígado y médula ósea (+++) o negativo (-) para cada una de las variables evaluadas. La dosis infectiva se muestra en millones de parásitos, el sacrificio en días post infección, la fase del parásito promastigote (P) o amastigote (A); y la vía de inoculación intraperitoneal (IP) o intravenosa (V).

## V. Resultados

El grupo de ratones infectados con  $10^7$  promastigotes en fase estacionaria de cultivo, por vía intraperitoneal y sacrificado a los 28 días de la infección, fue el que mostró mejores resultados al aplicar una PCR cuantitativa en tiempo real (1074,5 parásitos/mg en hígado). Además, en este grupo se consiguió aislar el parásito de hígado, bazo y médula ósea, y se observaron amastigotes en improntas de bazo e hígado.

Las condiciones del modelo de infección optimizado y que se utilizaron en los experimentos de evaluación *in vivo* son así las siguientes:

- Dosis de infección: 10 millones de parásitos
- Cepa: MCAN/ES/2007/DP534
- Vía: Intraperitoneal
- Tiempo de infección (hasta inicio del tratamiento): 4 semanas (28 días)
- Fase infectiva: Promastigotes de cultivo en fase estacionaria (5-7 días de cultivo).

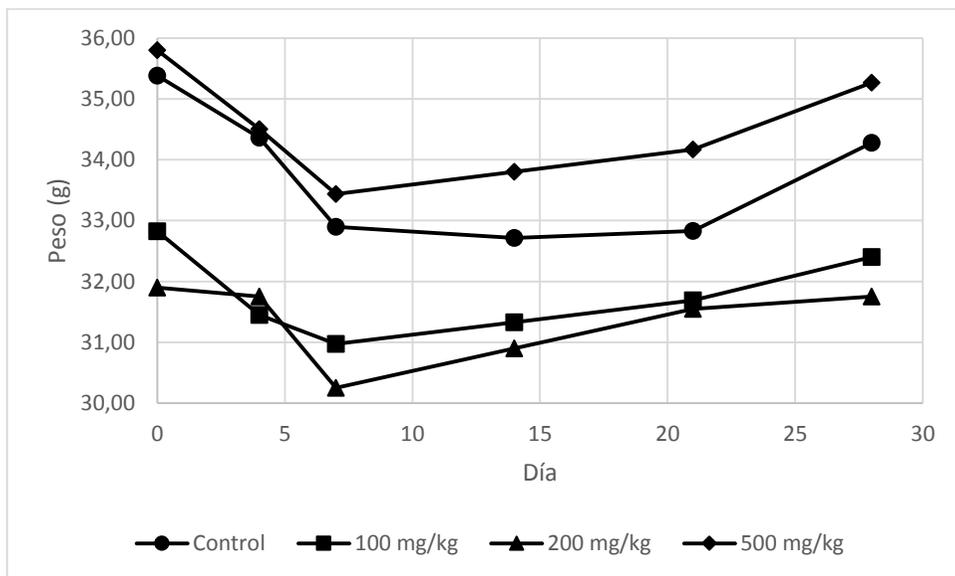
### **2.2. Evaluación *in vivo* del compuesto MTC-305 libre**

#### **2.2.1. Toxicidad en animales sanos del compuesto MTC-305 libre**

Se realizó un experimento de toxicidad subaguda con dosis repetidas. Se dividieron 40 ratones Swiss (ICR-CD1) de 6-8 semanas de edad en 4 grupos y se trataron durante 14 días. Se observaron y pesaron hasta el día 28 del experimento, cuando fueron sacrificados. El compuesto se disolvió en DMSO puro que luego se diluyó en solución de suero fisiológico (SSF) de forma que la dosis deseada de producto se administrase en un volumen de 500  $\mu$ L con una concentración final de 0,5% de DMSO. El tratamiento se administró por vía intraperitoneal. Para la máxima dosis se utilizó el compuesto vehiculizado en nanopartículas de oro. Los tratamientos fueron:

- Grupo control, tratado con solución de suero fisiológico (SSF) con 0,5% DMSO.
- Grupo M100, tratado con 100 mg/kg/día de MTC-305 libre
- Grupo M200, tratado con 200 mg/kg/día de MTC-305 libre
- Grupo M500, tratado con 500 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro

Ningún animal murió durante el tratamiento ni durante el periodo de observación. No se observaron signos de sufrimiento, dolor o diarrea en ninguno de los animales del ensayo. A pesar de que el objetivo del ensayo era la determinación de una dosis letal 50% (LD<sub>50</sub>), ésta no se logró determinar. Los resultados indican que la LD<sub>50</sub> es muy superior a 500 mg/kg, lo que facilita enormemente la selección de una dosis con la que empezar el tratamiento en animales infectados.



**Gráfico 14. Evolución del peso medio de los ratones sanos tratados con distintas dosis de MTC-305 libre**

Como muestra el gráfico 14, todos los ratones, incluyendo los del grupo control, sufrieron un descenso en su peso durante la primera mitad del periodo de tratamiento (días 0-7), peso que fueron recuperando progresivamente durante el resto del periodo de tratamiento y hasta el final del periodo de observación (días 8-28) casi por completo. La disminución inicial en su peso no fue nunca mayor del 5%.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los órganos (bazo, riñón e hígado) de los animales tratados a las distintas dosis y los de los ratones control.

Sin embargo, al realizar la necropsia, se encontraron pequeños acúmulos del producto precipitado en el peritoneo en los grupos tratados con el compuesto libre, debido posiblemente a su baja solubilidad y elevadas dosis.

## V. Resultados

### **2.2.2. Evaluación del compuesto MTC-305 libre en animales infectados**

#### **2.2.2.1. Eficacia frente a *L. infantum***

Dada la flexibilidad de dosis otorgada por el ensayo en animales sanos, se eligió una dosis de compuesto de 25 mg/kg, basada en ensayos con el fármaco SAHA en ratones, el análogo estructural más cercano al MTC-305.

El experimento incluyó 25 ratones Balb/c de 4 semanas de edad infectados experimentalmente en las condiciones indicadas en 2.1 repartidos en 3 grupos:

- Grupo Control (C): Recibe suero fisiológico estéril con 0,5% DMSO.
- Grupo Glucantime® (G): Recibe 17 mg Sb<sup>V</sup>/kg al día de antimonio de meglumina durante 7 días.
- Grupo MTC-305 (M): Recibe 25 mg/kg al día de MTC-305 libre durante 7 días.

Grupo	Carga parasitaria (Parásitos/mg)	
	Hígado	Bazo
C	0,70 ± 0,5	1,04 ± 0,9
M	0,40 ± 0,3	0,20 ± 0,2
G	0,55 ± 0,4	0,84 ± 0,7

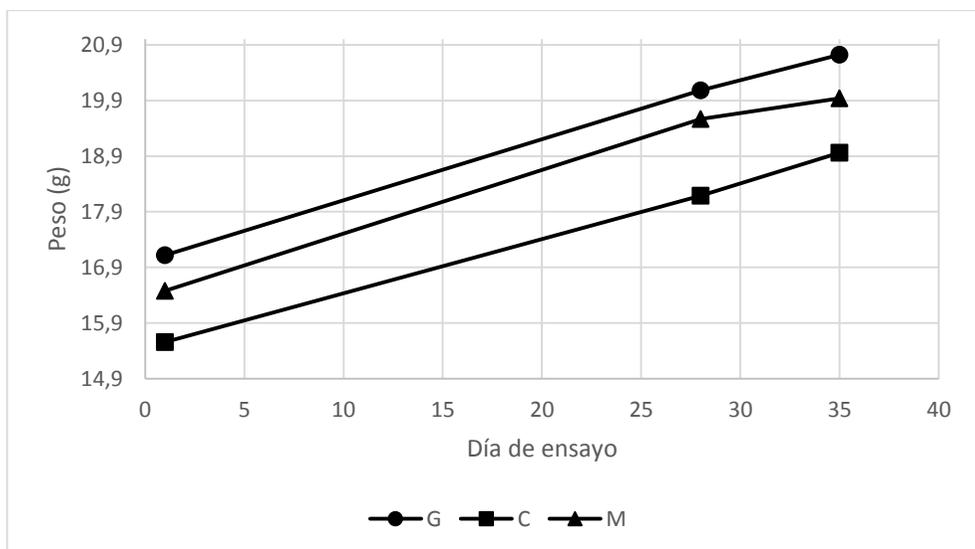
**Tabla 12. Carga parasitaria de hígado y bazo del primer ensayo de tratamiento con MTC-305 libre. Media ± desviación estándar**

Como se puede observar en la tabla 12, el tratamiento con el compuesto MTC-305 libre disminuyó, con respecto al control, la carga parasitaria en hígado y bazo. Sin embargo, estas reducciones, debito a la elevada variabilidad de las cargas parasitaria en ambos grupos, C y M, no resultaron estadísticamente significativas ni en hígado ( $p > 0,1$ ) ni en bazo ( $p = 0,076$ ). Tampoco el tratamiento con antimonio de meglumina mostró una actividad diferente en el bazo o en el hígado frente al control ( $p > 0,1$ ).

### 2.2.2.2. Toxicidad del compuesto MTC-305 libre en animales infectados

Con respecto a la toxicidad en animales infectados, se confirmaron las conclusiones obtenidas en el tratamiento de los animales sanos: no se observaron signos de sufrimiento, dolor o diarrea en los animales tratados; tampoco se observó, al contrario que en los experimentos con animales sanos, disminución en el peso de los animales durante el tratamiento (gráfico 15). Como muestra la tabla 13, entre los grupos de tratamiento o control, sanos o infectados tampoco se observaron diferencias en los parámetros bioquímicos y enzimáticos analizados en suero o plasma, ni en los pesos de sus órganos ( $p > 0,1$ ).

A pesar de la drástica disminución en la dosis con respecto al ensayo en animales sanos, también en este experimento se observaron depósitos de compuesto precipitado en el peritoneo de los animales necropsiados.



**Gráfico 15.** Evolución del peso de los ratones tratados con MTC-305 libre desde su infección hasta su sacrificio. C= Grupo Control, recibe suero fisiológico estéril con 0,5% DMSO. G= Recibe 17 mg Sb<sup>v</sup>/kg al día de antimoniato de meglumina durante 7 días. M= Recibe 25 mg/kg al día de MTC-305 libre durante 7 días.

Grupo	Parámetros bioquímicos y enzimáticos					Peso de los órganos	
	ALP (U/L)	UREA (mg/dL)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	CREAT (mg/dL)	Bazo	Hígado
<b>C</b>	274 ±148	53 ±20	81 ±41	298 ±213	67 ±9	113 ±15	760 ±71
<b>G</b>	236 ±101	44 ±8	46 ±41	379 ±303	47 ±15	114 ±8	840 ±127
<b>M</b>	197 ±31	46 ±19	51 ±9	329 ±222	65 ±4	112 ±14	863 ±61

Tabla 13. Evaluación de la toxicidad del tratamiento con MTC-305 libre en los ratones infectados y sanos. Media  $\pm$  desviación estándar de los valores bioquímicos y enzimáticos analizados y de los pesos de los órganos. C= Grupo Control, recibe suero fisiológico estéril con 0,5% DMSO. G= Recibe 17 mg Sb<sup>V</sup>/kg al día de antimonio de meglumina durante 7 días. M= Recibe 25 mg/kg al día de MTC-305 libre durante 7 días.

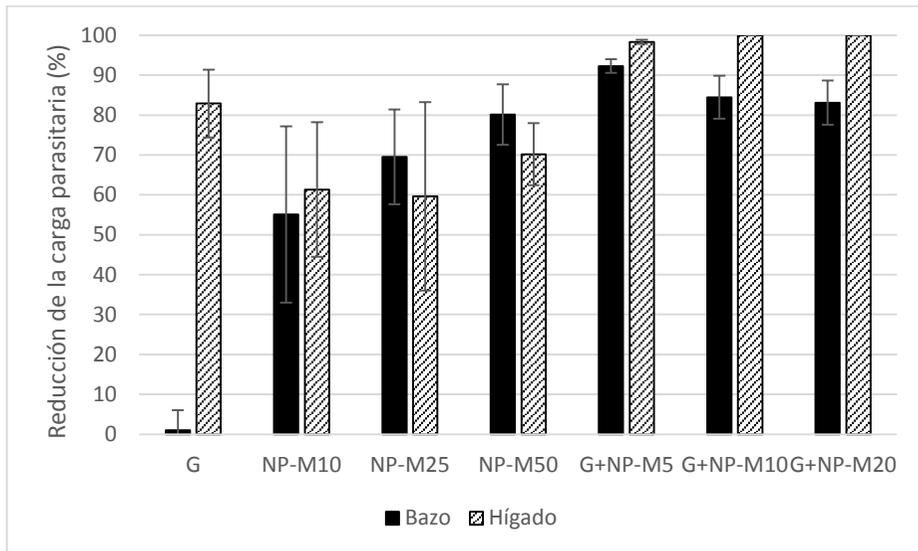
### 2.2.3. Evaluación *in vivo* del compuesto MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA

El diseño experimental fue el siguiente: Se hicieron 5 grupos de 7 ratones infectados experimentalmente con *L. infantum* en las condiciones indicadas en 2.1.

- Grupo Control (C): Tratado con una suspensión de nanopartículas de PLGA vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados.
- Grupo Glucantime® (G): Tratado con 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día de antimonio de meglumina.
- Grupo MTC-305 NP-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA.
- Grupo MTC-305 NP-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA.
- Grupo NP-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA.
- Grupo G+NP-M6,25: Tratado con 6,25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día de antimonio de meglumina.
- Grupo G+NP-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día.
- Grupo G+NP-M20: Tratado con 20 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día.

La duración del tratamiento fue de 14 días

### 2.2.4. Evaluación de la eficacia frente a *L. infantum*



**Gráfico 16.** Medias de los porcentajes de reducción de las cargas parasitarias en hígado y bazo de los distintos grupos de ratones. G: Tratado con 104 mg SbV/kg/día de antimonio de meglumina. NP-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA. NP-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA. NP-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA. G+NP-M6,25: Tratado con 6,25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y 104 mg SbV/kg/día de antimonio de meglumina. G+NP-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y 104 mg SbV/kg/día. G+NP-M20: Tratado con 20 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de PLGA y 104 mg SbV/kg/día.

En los ratones control, la infección fue mayor en el bazo que en el hígado (45,4 frente a 5,3 parásitos/mg) y las cargas parasitarias muy variables. Como muestra el gráfico 16, el tratamiento con antimonio de meglumina demostró ser eficaz en el hígado ( $p=0,027$ ), reduciendo la carga parasitaria en aproximadamente un 80% mientras que se mostró totalmente ineficaz en el bazo.

En hígado, los tratamientos con MTC-305 a 10, 25 mg/kg y a 50 mg/kg no redujeron la carga parasitaria con respecto al control ( $p>0,1$ ). En el bazo, el tratamiento a 25 mg/kg redujo de forma estadísticamente significativa ( $p=0,0139$ ) la carga parasitaria en un 69%. A 50 mg/kg también redujo la carga parasitaria de forma significativa ( $p=0,0023$ ) en un 80%. Estos tratamientos, aunque claramente superiores al tratamiento con Glucantime<sup>®</sup>, no demostraron ser mejores que éste ni a 25 ( $p=0,089$ ) ni a 50 mg/kg ( $p=0,062$ ), posiblemente debido a la gran variabilidad en los resultados del compuesto antimonial.

## V. Resultados

Las combinaciones de antimonio de meglumina con MTC-305 mostraron una gran eficacia reduciendo la carga parasitaria en hígado en un 98% ( $p=0,001$ ) y en bazo en un 92% ( $p=0,001$ ) con respecto al control a 6,25 mg/kg. Esta combinación demostró ser mejor que el antimonio de meglumina tanto en el bazo ( $p=0,042$ ) como en el hígado ( $p=0,020$ ). Las combinaciones con 10 y 20 mg/kg de MTC-305 fueron también muy eficaces en hígado y bazo ( $p < 0,01$ ) y superaron al tratamiento de referencia ( $p < 0,05$ ) pero el incremento en la dosis de MTC-305 no supuso una mejora desde el punto de vista estadístico, aunque es de destacar que no se encontró parásito en hígado en los ratones tratados con estos regímenes.

### 2.2.5. Evaluación de la toxicidad del tratamiento

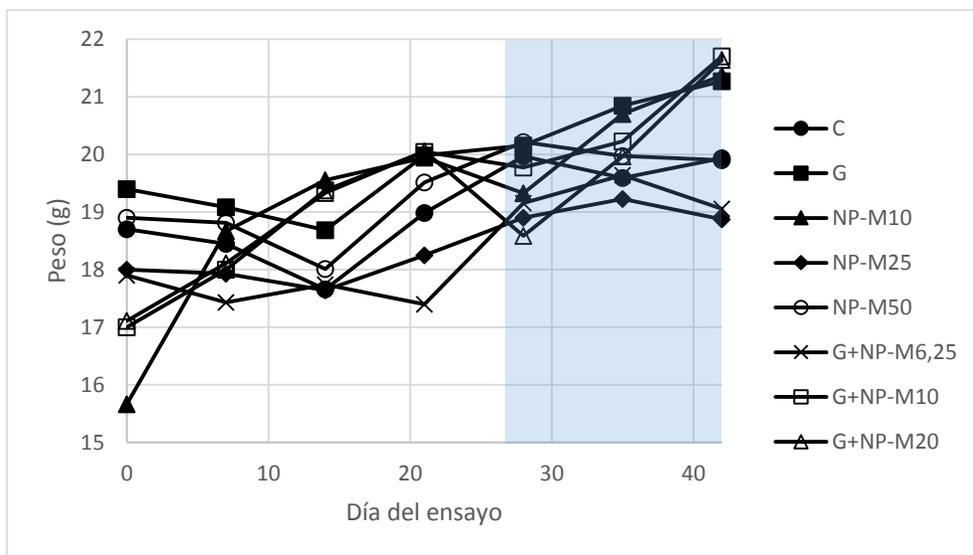


Gráfico 17. Evolución del peso de los ratones durante el periodo de infección y posterior tratamiento con MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA. Media de los pesos por grupo. La zona sombreada indica el tiempo de tratamiento. G: Tratado con 104 mg SbV/kg/día de antimonio de meglumina. NP-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA. NP-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA. NP-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA. G+NP-M6,25: Tratado con 6,25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA y 104 mg SbV/kg/día de antimonio de meglumina. G+NP-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA y 104 mg SbV/kg/día. G+NP-M20: Tratado con 20 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA y 104 mg SbV/kg/día. C: Tratado con una suspensión de nanopartículas de PLGA vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados.

El gráfico 17 muestra la evolución en el peso de los ratones. Solo el grupo G+NP-20 muestra una disminución superior al 5% al iniciar el tratamiento, que recupera durante los siguientes días. No se observaron signos de malestar o dolor en los ratones durante el tratamiento con el compuesto.

Tratamiento	Parámetros bioquímicos y enzimáticos					Peso del órgano	
	GOT	GPT	ALP	UREA	CREAT	Bazo	Hígado
	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg)	(mg)
<b>C</b>	541 ±205	52 ±34	200 ±65	53 ±13	59 ±13	116 ±28	896 ±129
<b>G</b>	501 ±131	64 ±52	214 ±89	55 ±9	56 ±11	107 ±13	933 ±211
<b>NP-M10</b>	214 ±28	54 ±19	282 ±62	62 ±13	55 ±18	130 ±13	900 ±109
<b>NP-M25</b>	578 ±157	62 ±39	242 ±66	45 ±15	60 ±10	143 ±18	800 ±92
<b>NP-M50</b>	422 ±263	63 ±62	238 ±57	57 ±11	60 ±16	167 ±22	861 ±153
<b>G+NP-M6,25</b>	538 ±201	53 ±34	273 ±54	62 ±11	74 ±9	134 ±28	847 ±58
<b>G+NP-M10</b>	348 ±36	59 ±26	222 ±58	59 ±9	52 ±19	144 ±27	801 ±39
<b>G+NP-M20</b>	370 ±54	55 ±22	252 ±49	58 ±11	57 ±15	153 ±16	969 ±86

**Tabla 14. Evaluación de la toxicidad del tratamiento con MTC-305 vehiculado en nanopartículas de PLGA en los ratones infectados. Media ± desviación estándar de los valores bioquímicos y enzimáticos analizados y de los pesos de los órganos**

Tampoco se vieron alterados debido al tratamiento los valores bioquímicos y enzimáticos ( $p > 0,1$ ) con respecto al control sin tratamiento ni los pesos de los órganos ( $p > 0,1$ ). Estos resultados refuerzan la idea de inocuidad del compuesto MTC-305, esta vez adsorbido sobre nanopartículas de PLGA.

### **2.2.6. Evaluación in vivo del compuesto MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro**

Se hicieron 9 grupos de 7 ratones infectados experimentalmente con *L. infantum* en las condiciones indicadas en 2.1. El diseño experimental fue el siguiente:

- Grupo control (NO): Tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados.
- Grupo Glucantime® (G): Tratado con 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día de antimonio de meglumina.
- Grupo MTC-305 NO-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro.
- Grupo MTC-305 NO-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro.
- Grupo MTC-305 NO-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro.

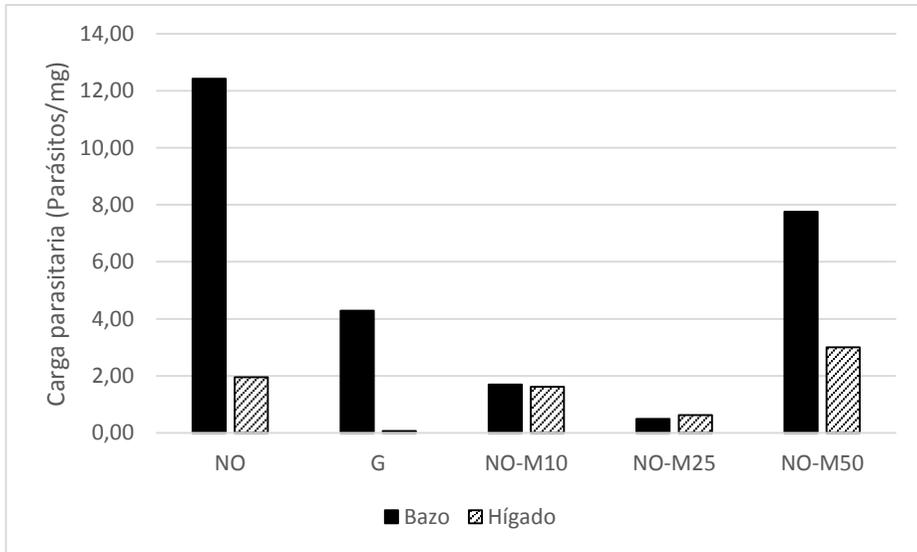
El tratamiento duró 14 días

### **2.2.7. Evaluación de la eficacia frente a *L. infantum***

En general las cargas parasitarias en este ensayo fueron inferiores a las del anterior, con unas diferencias más acentuadas entre las cargas parasitarias en bazo y las del hígado (gráfico 18)

Confirmando las observaciones previas, el antimonio de meglumina resultó muy eficaz en el hígado pero su efectividad en el bazo fue muy reducida ( $p > 0,1$ ).

El MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro redujo la carga parasitaria en bazo en un 86% ( $p=0,0268$ ) a 10 mg/kg y en un 96% a 25 mg/kg ( $p=0,00254$ ); esta última dosis superó en efectividad al tratamiento con el producto de referencia ( $p=0,0268$ ). En el hígado, y pese a reducir la carga parasitaria hasta en un 70% a 25 mg/kg, la efectividad de NO-M25 no resultó estadísticamente significativa ( $p=0,0701$ ).



**Gráfico 18. Medias de las cargas parasitarias en bazo (Parásitos/mg) en los distintos grupos de animales. NO: Tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados. G: Tratado con 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día de antimoniato de meglumina. NO-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro. NO-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro. NO-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro.**

### **2.2.8. Evaluación de la toxicidad**

No se observó disminución en el peso de los animales debida al tratamiento (gráfico 19). Tampoco se observaron signos o síntomas de toxicidad: los animales no mostraron signos de sufrimiento, dolor o diarrea. Tampoco se observaron variaciones en los niveles de los parámetros bioquímicos o enzimáticos analizados en sangre ( $p > 0,1$ ), ni en los pesos de los órganos ( $p > 0,1$ ), como muestra la tabla 15.

## V. Resultados

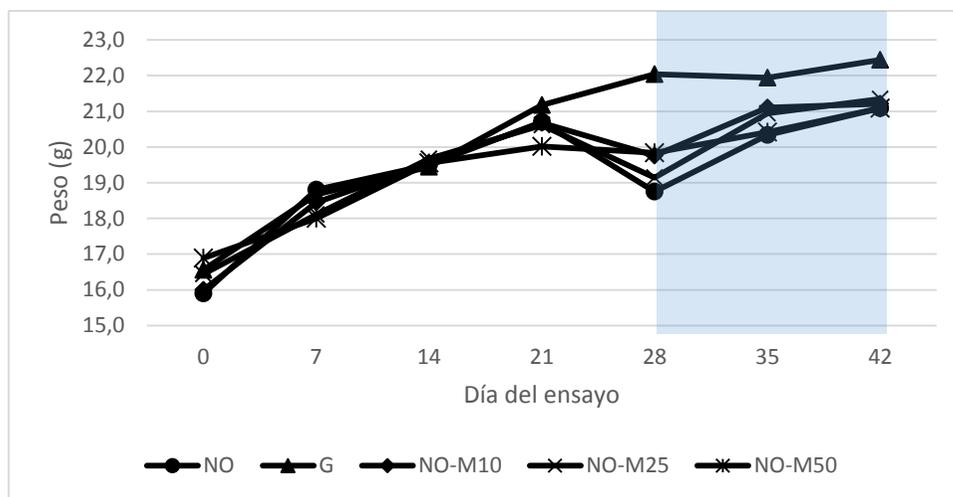


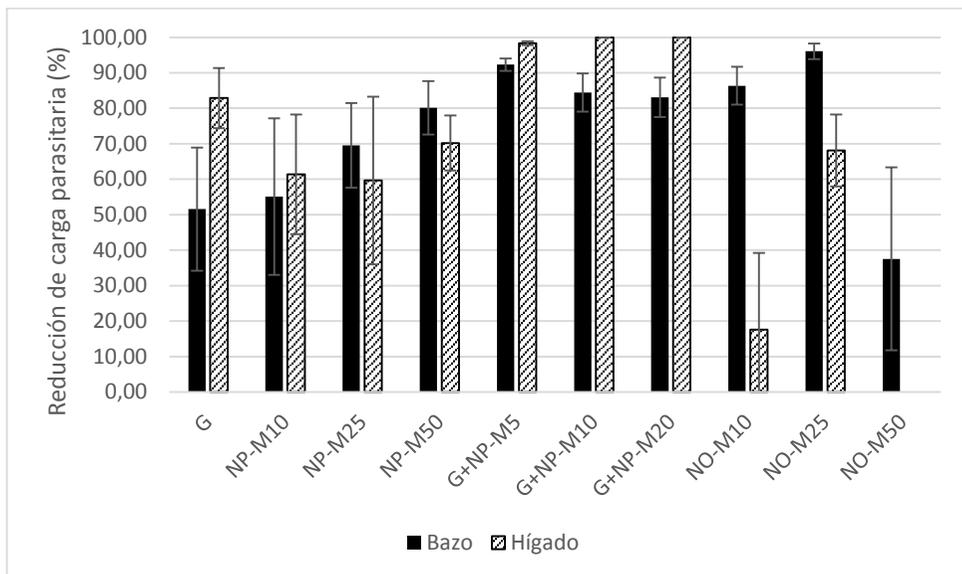
Gráfico 19. Evolución del peso de los animales del ensayo con MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro. Media del grupo. NO: Tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados. G: Tratado con 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día de antimonio de meglumina. NO-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro. NO-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro. NO-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro.

Tratamiento	Parámetros bioquímicos y enzimáticos					Peso de los órganos	
	GOT (U/L)	GPT (U/L)	ALP (U/L)	UREA (mg/dL)	CREAT (mg/dL)	Bazo (mg)	Hígado (mg)
NP	308 ±37	44 ±11	254 ±67	59 ±14	52 ±14	143 ±17	852 ±59
NO	419 ±183	64 ±26	253 ±51	57 ±11	62 ±18	127 ±20	962 ±186
G	424 ±33	51 ±25	229 ±53	53 ±9	61 ±15	106 ±10	896 ±151
NO-M10	221 ±49	63 ±21	259 ±41	62 ±8	58 ±14	118 ±24	884 ±83
NO-M25	255 ±78	49 ±24	280 ±66	62 ±12	48 ±12	135 ±11	841 ±98
NO-M50	455 ±69	64 ±25	257 ±75	57 ±7	57 ±16	133 ±23	1005±140

Tabla 15. Evaluación de la toxicidad del MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro. Media ± desviación estándar de los valores bioquímicos y enzimáticos analizados y de los pesos de los órganos. NO: Tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados. G: Tratado con 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día de antimonio de meglumina. NO-M10: Tratado con 10 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro. NO-M25: Tratado con 25 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro. NO-M50: Tratado con 50 mg/kg/día de MTC-305 vehiculado en nanopartículas de oro.

### 2.2.9. Comparación de la eficacia de los distintos tratamientos y formulaciones de MTC-305

Debido a la divergencia de cargas parasitarias en los controles de los distintos ensayos para la comparación de la eficacia de los distintos tratamientos y formulaciones, se normalizaron los resultados en términos de porcentaje de reducción en la carga parasitaria. En los tratamientos en régimen de monoterapia con MTC-305 se observa una relación dosis respuesta (excepto a 50 mg/kg para la formulación con nanopartículas de oro), encontrándose que el mejor tratamiento en monoterapia es MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro a 25 mg/kg. Entre los tratamientos con la combinación de MTC-305 y el antimonio meglumina de no hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis de MTC-305.



**Gráfico 20.** Porcentajes de reducción de la carga parasitaria en hígado y bazo de los ratones tratados con todas las modalidades de tratamiento. Se indica la media y su desviación estándar. G= antimonio de meglumina 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg; NP-M10= MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de PLGA a 10 mg/kg; NP-M25= MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de PLGA a 25 mg/kg; NP-M50= MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de PLGA a 50 mg/kg; G+NP-M5= antimonio de meglumina 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg+ MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de PLGA a 5 mg/kg; G+NP-M10= antimonio de meglumina 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg+ MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de PLGA a 10 mg/kg; G+NP-M20= antimonio de meglumina 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg+ MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de PLGA a 20 mg/kg; NO-M10= MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de oro a 10 mg/kg; NO-M25= MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de oro a 25 mg/kg; NO-M50= MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de oro a 50 mg/kg.

### **2.3. Evaluación *in vivo* del compuesto MDG**

Este compuesto mostró mayor solubilidad y actividad frente a *L. infantum* in vitro que el MTC-305, siendo un buen candidato a ser evaluado en el modelo animal

A pesar de su mayor solubilidad, para la administración in vivo fue necesaria su vehiculización. En este caso sólo se usaron las nanopartículas de oro, descartando el uso del compuesto libre o vehiculizado en nanopartículas de PLGA.

#### **2.3.1. Evaluación de la toxicidad sobre animales sanos**

Previo al tratamiento en animales infectados, se realizó un ensayo de toxicidad en animales sanos con el fin de determinar la LD<sub>50</sub> del compuesto. Para ello se utilizaron 10 ratones ICR (CD-1) de 6 semanas de edad y de ambos sexos y se les trató, con 500 mg/kg de MDG al día durante dos semanas. Se realizó un seguimiento de estos animales durante dos semanas adicionales para evaluar signos de dolor, sufrimiento, diarrea, pérdida de peso o muerte.

Ningún animal murió durante el ensayo ni se observó ningún otro signo, lo que indica que el compuesto carece de toxicidad aguda o subaguda.

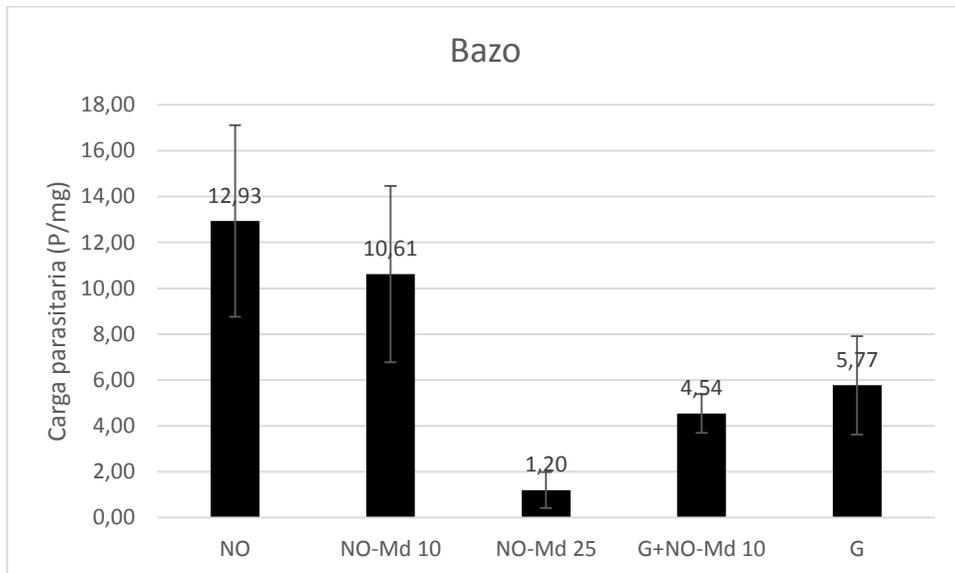
#### **2.3.2. Evaluación de la eficacia frente a *L. infantum***

Se hicieron 5 grupos de 7 ratones infectados en las condiciones indicadas en el apartado 2.1, que recibieron distintos tratamientos:

- Grupo control (NO): Tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados.
- Grupo NO-Md 10: Tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculizado en nanopartículas de oro.
- Grupo NO-Md 25: Tratado con 25 mg/kg/día de MDG vehiculizado en nanopartículas de oro.
- Grupo G: Tratados con antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día.
- Grupo G+NO-Md 10: Tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculizado en nanopartículas de oro y antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día.

El tratamiento tuvo una duración de 10 días

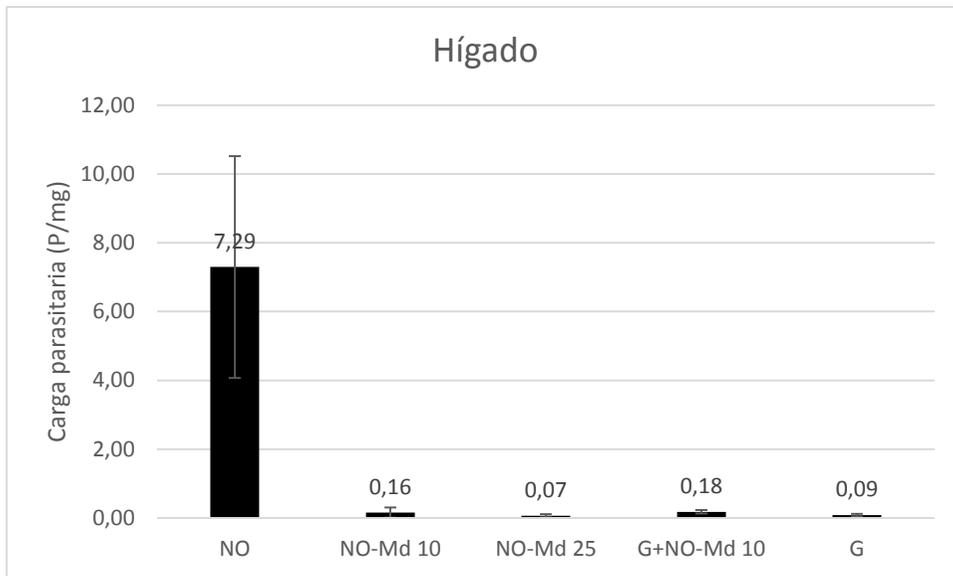
Como se puede observar en el gráfico 21, el compuesto es muy eficaz en bazo a 25 mg/kg ( $p=0,0153$ ) reduciendo la carga parasitaria en más de un 90%, aunque esta reducción no resultó superior en sentido estricto a la del compuesto de referencia ( $p=0,0568$ ). Los tratamientos con antimonio de meglumina, a pesar de disminuir la carga parasitaria en más de un 50%, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los controles sin tratamiento en monoterapia ( $p > 0,1$ ) ni combinado con MDG a una dosis de 10 mg/kg ( $p=0,0869$ ).



**Gráfico 21. Cargas parasitarias medias en bazo de los distintos grupos de tratamiento. NO=** tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados; **NO-Md 10=** tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro. **NO-Md 25=** tratado con 25 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro. **G=** tratados con antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día; **G+NO-Md 10=** tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro y antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg/día.

Por el contrario, en el hígado el compuesto demostró una alta efectividad tanto a 10 mg/kg como a 25 mg/kg, reduciendo las cargas parasitarias en un 98% ( $p=0,0344$ ) y en más de un 99% ( $p=0,0331$ ) respectivamente (gráfico 22). Los tratamientos con el compuesto antimonial también mostraron gran eficacia en el hígado al igual que ya se vio en experimentos anteriores, tanto en monoterapia ( $p=0,0334$ ) como en combinación con MDG ( $p=0,0347$ ), reduciendo también la carga parasitaria en esta última combinación en más de un 95% en ambos casos.

## V. Resultados

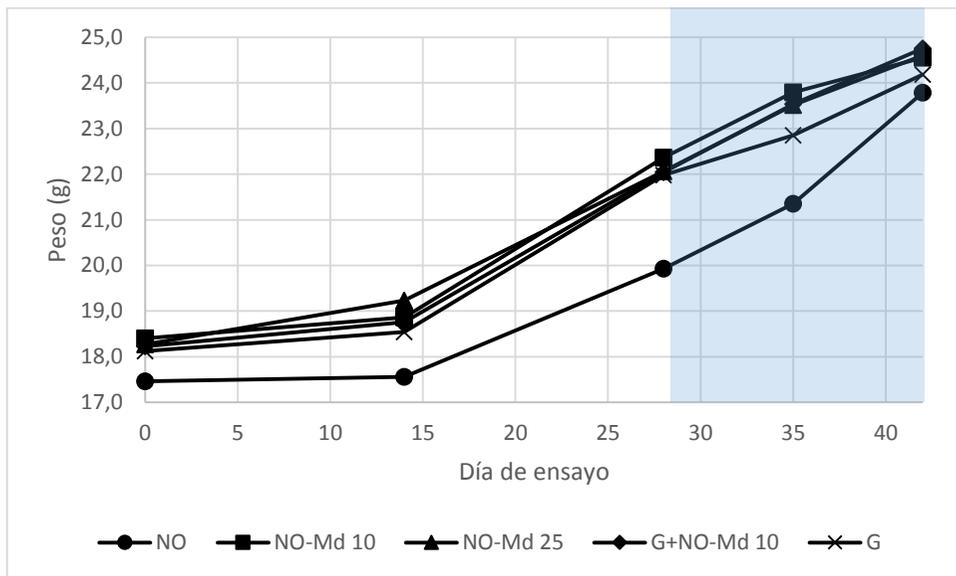


**Gráfico 22. Cargas parasitarias medias en hígado de los distintos grupos de tratamiento. NO= tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados; NO-Md 10= tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro. NO-Md 25= tratado con 25 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro. G= tratados con antimoniato de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día; G+NO-Md 10= tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro y antimoniato de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día.**

Como se puede apreciar, este compuesto mantiene la elevada actividad del MTC-305 en el bazo, añadiendo una gran efectividad en el hígado.

### 2.3.3. Evaluación de la toxicidad en el ensayo de infección

No se observó toxicidad durante el periodo de tratamiento con MDG. En general no hubo pérdida de peso debido a éste y el peso de los ratones evolucionó con normalidad durante todo el ensayo, como muestra el gráfico 23. Tampoco los ratones mostraron signos de sufrimiento, dolor o diarrea durante todo el ensayo.



**Gráfico 23.** Evolución del peso de los animales durante el ensayo con MDG. La zona sombreada indica el periodo de tratamiento. NO= tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados; NO-Md 10= tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro. NO-Md 25= tratado con 25 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro. G= tratados con antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día; G+NO-Md 10= tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculado en nanopartículas de oro y antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día.

Tampoco se observaron alteraciones en los valores de los parámetros bioquímicos y enzimáticos analizados en sangre ( $p > 0,1$ ). Con respecto a los pesos de los órganos, no se observaron diferencias entre los pesos de los bazo de los animales tratados en comparación con el control sin tratamiento. Sin embargo, al comparar los pesos de los hígados, encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,017$ ) entre los pesos de los hígados del grupo de referencia (G) y el grupo control sin tratamiento (NO), aunque esta ligera hepatomegalia no vino acompañada de alteraciones en los valores de las transaminasas en suero, como muestra la tabla 16.

## V. Resultados

Tratamiento	Parámetros bioquímicos y enzimáticos					Peso de órganos	
	GOT (U/L)	GPT (U/L)	ALP (U/L)	UREA (mg/dL)	CREAT (mg/dL)	Bazo (mg)	Hígado (mg)
<b>NO</b>	228 ±92	55 ±13	264 ±39	50 ±5	50 ±5	155 ±52	691±113
<b>NO-Md 10</b>	281 ±40	50 ±11	265 ±38	53 ±6	49 ±7	148 ±8	724±100
<b>NO-Md 25</b>	164 ±76	64 ±17	242 ±27	54 ±5	50 ±10	141 ±14	700±119
<b>G+NO-Md</b>	281 ±86	66 ±14	284 ±37	51 ±4	52 ±10	149 ±39	738±136
<b>G</b>	308 ±40	96 ±36	275 ±29	53 ±4	55 ±9	161 ±47	863±93

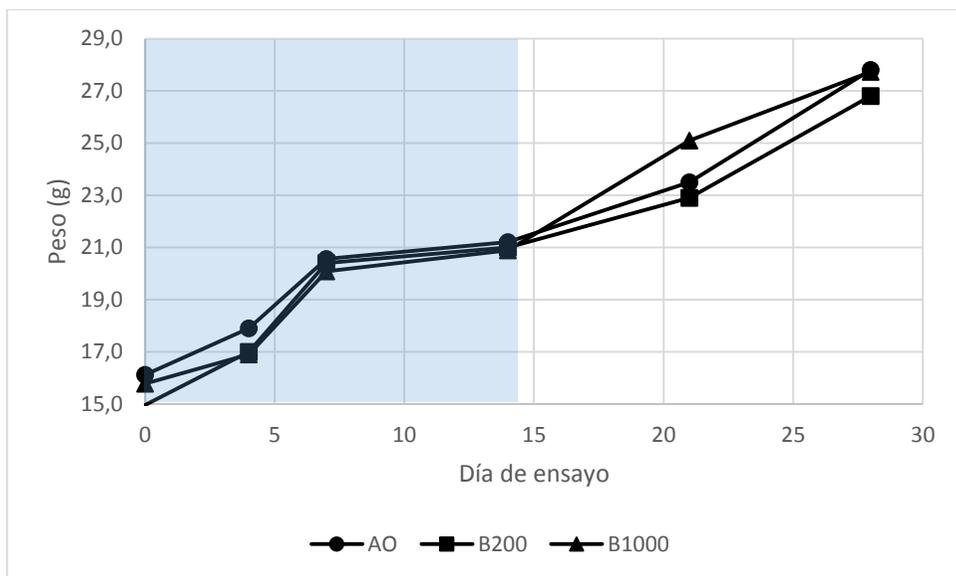
Tabla 16. Toxicidad del tratamiento con MDG en los ratones infectados. Media ± desviación estándar de los valores bioquímicos y enzimáticos analizados y de los pesos de los órganos. NO= tratado con una suspensión de nanopartículas de oro vacías, inoculando la misma cantidad de nanopartículas que en los animales tratados; NO-Md 10= tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculizado en nanopartículas de oro. NO-Md 25= tratado con 25 mg/kg/día de MDG vehiculizado en nanopartículas de oro. G= tratados con antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día; G+NO-Md 10= tratado con 10 mg/kg/día de MDG vehiculizado en nanopartículas de oro y antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>v</sup>/kg/día.

## 2.4. Evaluación *in vivo* del compuesto natural (-)- $\alpha$ -bisabolol

### 2.4.1. Evaluación de la toxicidad en animales sanos

Se realizó un ensayo de toxicidad subaguda en animales sanos (ratones Swiss) utilizando un grupo control (AO, tratado con el diluyente, aceite de oliva) y dos grupos que recibieron dos dosis diarias distintas de (-)- $\alpha$ -bisabolol durante dos semanas, 200 mg/kg (B200) y 1000 mg/kg (B1000). Se les observó durante dos semanas adicionales hasta ser sacrificados. En el ensayo no murió ningún animal, demostrando la falta de toxicidad aguda y subaguda y estableciendo una LD<sub>50</sub> en más de 1000 mg/kg.

Durante el ensayo se evaluaron los pesos de los animales, así como la aparición de signos de sufrimiento, dolor y diarrea, no encontrando pérdidas de peso significativas ni ninguno de estos signos, como muestra el gráfico 24.



**Gráfico 24.** Evolución del peso de los ratones en el ensayo de toxicidad sobre animales sanos con (-)- $\alpha$ -bisabolol. AO= tratados con diluyente, aceite de oliva; B200= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B1000= tratados con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva. La zona sombreada corresponde al periodo de tratamiento.

En este ensayo tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de animales control y los grupos de animales tratados, confirmando la inocuidad del tratamiento en animales sanos, como muestra la tabla 17.

Grupo	Parámetros bioquímicos					Pesos de los órganos		
	ALP (U/L)	UREA (mg/dL)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	CREAT (mg/dL)	Bazo (mg)	Hígado (mg)	Riñon (mg)
<b>AO</b>	192 ±83	51 ±11	54 ±47	352 ±87	61 ±15	89 ±8	781 ±62	113±7
<b>B200</b>	256 ±44	49 ±9	37 ±23	238±102	58 ±32	95 ±12	802±101	120±11
<b>B1000</b>	235 ±42	44 ±16	56 ±17	462±100	58 ±21	92 ±18	806 ±76	123±7

Tabla 17. Toxicidad de los animales sanos tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol. Media  $\pm$  desviación estándar de los valores bioquímicos y enzimáticos analizados y de los pesos de los órganos. AO= tratados con diluyente, aceite de oliva; B200= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B1000= tratados con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva.

#### 2.4.2. Evaluación de la eficacia del (-)- $\alpha$ -bisabolol frente a *L. infantum*

Se hicieron 6 grupos de 7 ratones infectados experimentalmente en las condiciones indicadas en 2.1.

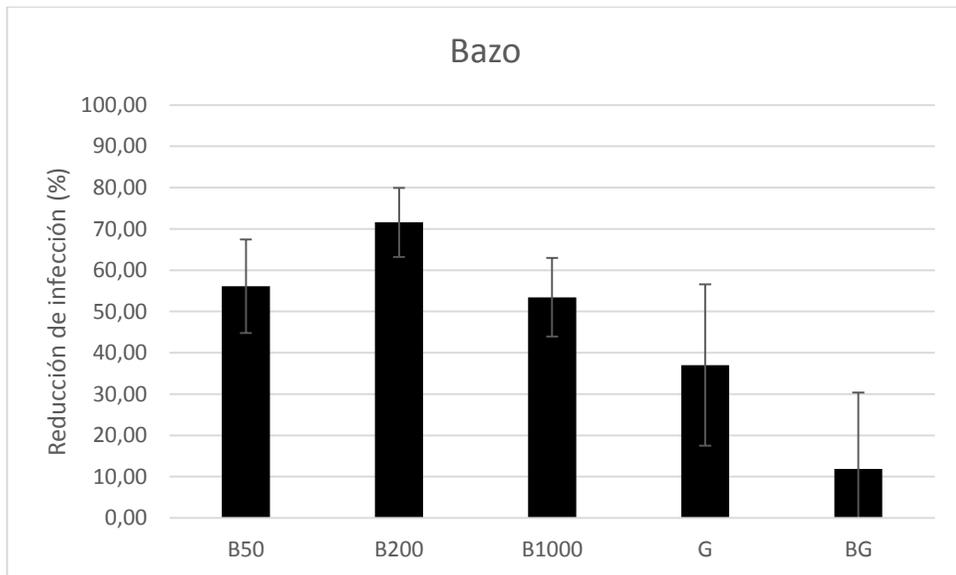
- Grupo control (AO): Tratado con 0,5 mL de aceite de oliva por vía oral.
- Grupo B50: Tratado vía oral con 50 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluidos en aceite de oliva, en un volumen final de 0,5 mL.
- Grupo B200: Tratado vía oral con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluidos en aceite de oliva, en un volumen final de 0,5 mL.
- Grupo B1000: Tratado vía oral con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluidos en aceite de oliva, en un volumen final de 0,5 mL.
- Grupo control de referencia (G): Tratado con antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg SbV/kg vía intraperitoneal
- Grupo combinación (BG): Tratado con antimonio de meglumina a una dosis de 104 mg Sb<sup>V</sup>/kg vía intraperitoneal y 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluidos en aceite de oliva, en un volumen final de 0,5 mL por vía oral.

El tratamiento duró 14 días.

Como en casos anteriores, se obtuvo una gran variabilidad en las cargas parasitarias en los controles entre los 3 experimentos. De nuevo, el órgano más parasitado fue el bazo, con unas cargas parasitarias de hasta 10 veces superiores a las del hígado en los controles sin tratamiento.

Los gráficos 25 y 26 muestran las reducciones en la carga parasitaria conseguidas por los distintos tratamientos con (-)- $\alpha$ -bisabolol en el bazo y el hígado respectivamente. En bazo, el tratamiento con este derivado sesquiterpénico resultó eficaz a 50 mg/kg, reduciendo la carga parasitaria en un 56% ( $p=0,05$ ); a

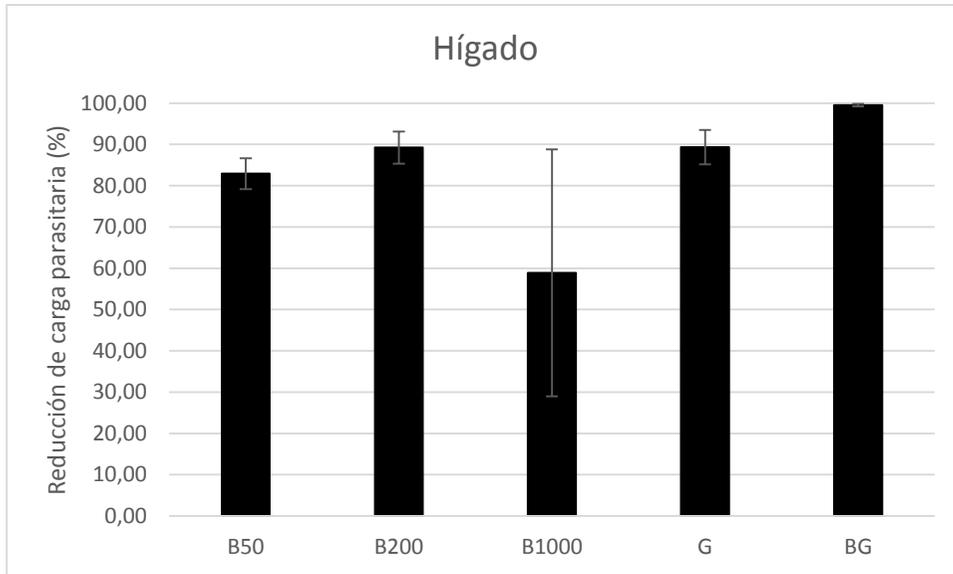
200 mg/kg, reduciendo un 72% la carga parasitaria ( $p=0,003$ ); y a 1000 mg/kg, que la redujo un 53% ( $p=0,0235$ ) aunque sin mostrar una relación dosis-respuesta debido a la menor eficacia de la dosis más elevada. El tratamiento con el producto de referencia no fue eficaz en este órgano ( $p>0,1$ ) ni tampoco la combinación entre éste y el (-)- $\alpha$ -bisabolol.



**Gráfico 25. Eficacia del (-)- $\alpha$ -bisabolol en el bazo de los ratones infectados en términos de porcentaje de reducción de la carga parasitaria. B50= tratados con 50 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B200= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B1000= tratados con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; G= tratados con antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg; BG= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva y antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg.**

En el hígado, el (-)- $\alpha$ -bisabolol resultó eficaz a 50 mg/kg (83% de reducción de la carga parasitaria,  $p=0,045$ ) y a 200 mg/kg, reduciendo en un 89% la carga parasitaria ( $p=0,038$ ). Sin embargo no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin tratamiento a la dosis más elevada de 1000 mg/kg ( $p=0,0884$ ) a pesar de reducir en un 59% la carga parasitaria en el hígado. El tratamiento con antimonio de meglumina mostró la efectividad habitual en este órgano, reduciendo en un 89% la carga parasitaria ( $p=0,014$ ). El tratamiento combinado del (-)- $\alpha$ -bisabolol y antimonio de meglumina resultó muy eficaz ( $p<0,01$ ), reduciendo un 99,5% la parasitación del hígado y superando en eficacia incluso al tratamiento con el producto antimonial en monoterapia ( $p=0,027$ ).

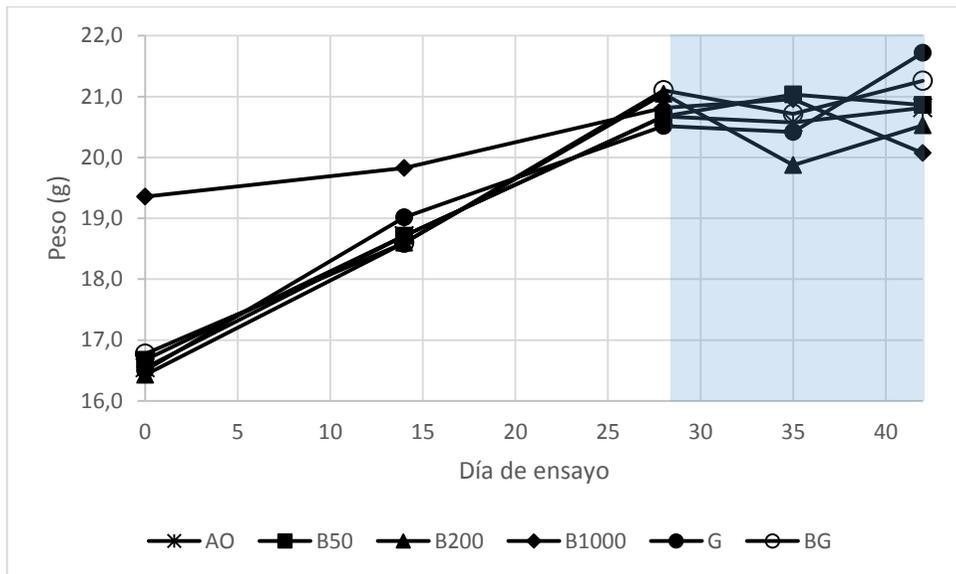
## V. Resultados



**Gráfico 26. Eficacia del (-)- $\alpha$ -bisabolol en el hígado de los ratones infectados en términos de porcentaje de reducción de la carga parasitaria. B50= tratados con 50 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B200= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B1000= tratados con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; G= tratados con antimonioato de meglumina a 104 mg SbV/kg; BG= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva y antimonioato de meglumina a 104 mg SbV/kg.**

### 2.4.3. Evaluación de la toxicidad del (-)- $\alpha$ -bisabolol en los animales infectados

El tratamiento con este compuesto no produjo dolor, sufrimiento, pérdida de peso (gráfico 27) u otros signos observables en los animales infectados que recibieron tratamiento con este compuesto.



**Gráfico 27. Evolución del peso de los ratones durante la infección y posterior tratamiento con (-)- $\alpha$ -bisabolol. AO= control, tratados con diluyente, aceite de oliva; B50= tratados con 50 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B200= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B1000= tratados con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; G= tratados con antimoniato de meglumina a 104 mg SbV/kg; BG= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva y antimoniato de meglumina a 104 mg SbV/kg. La zona sombreada corresponde al periodo de tratamiento.**

A las dosis de 50mg/kg y 200 mg/kg, el tratamiento no produjo alteraciones en los valores de los parámetros bioquímicos y enzimáticos evaluados en suero ni tampoco inflamación en el hígado o el bazo. Sin embargo, a 1000 mg/kg se observan ligeras alteraciones de los valores de GOT y del peso del hígado, lo que podría indicar hepatotoxicidad. Estas alteraciones no se observaron en el experimento con animales sanos.

V. Resultados

Grupo	Parámetros bioquímicos				Pesos de los órganos		
	ALP (U/L)	UREA (mg/dL)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	CREAT (mg/dL)	Bazo	Hígado
<b>AO</b>	274±148	53 ±20	81 ±41	298±213	67± 9	113±15	860±71
<b>B50</b>	200 ±61	52 ±18	77 ±32	321± 74	65 ±19	111,7±8	986±81
<b>B200</b>	356± 44	49± 9	37± 23	238±102	58± 32	104,1±11	881±99
<b>B1000</b>	335± 42	44 ±16	56 ±17	462±100	58± 21	123±18	1006±76
<b>G</b>	236±101	44± 8	46± 21	379±203	47 ±15	107,3± 8	970,3±25
<b>BG</b>	223± 65	45± 5	75 ±22	368± 72	61± 6	112 ±18	974±61

Tabla 18. Evaluación de la toxicidad del compuesto (-)- $\alpha$ -bisabolol en animales infectados. Media±desviación estándar de los parámetros evaluados y de los pesos de los órganos. AO= control, tratados con diluyente, aceite de oliva; B50= tratados con 50 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B200= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; B1000= tratados con 1000 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva; G= tratados con antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg; BG= tratados con 200 mg/kg de (-)- $\alpha$ -bisabolol diluido en aceite de oliva y antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg.

### 3. Ensayos clínicos en perros naturalmente infectados

#### 3.1. Muestreo y selección de los perros

Se analizaron 118 perros con la técnica de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos de la clase IgG frente a *Leishmania* en suero.

De los 114 analizados con la técnica IFI, 74 (62,7%) resultaron negativos (título IgG<sub>total</sub> <40), 13 (11,0%) con título =40, 12 (10,2%) título = 80, 6 con título =160, 7 con título 320, 2 con título 640 y 4 con título 1280.

Se realizó un análisis para detectar *L. infantum* por PCR en los 40 perros con título  $\geq 40$ , con los siguientes resultados:

Título IFI	n	% Positividad (qPCR)
40	13	23
80	12	50
160	6	83
320	7	71
640	2	50
1280	4	100

Tabla 19. Porcentaje de positividad mediante qPCR en sangre de los perros muestreados clasificados por su título de anticuerpos determinado por la técnica IFI. n= número de perros con ese título de anticuerpos.

Se seleccionaron 22 perros que cumplieron los criterios de inclusión sin cumplir ningún criterio de exclusión.

## V. Resultados

### 3.1.1. Perros seleccionados para el estudio

La siguiente tabla muestra la relación de los 22 perros seleccionados para el ensayo de tratamiento, indicando su raza, sexo, título de anticuerpos, resultado en la qPCR y tratamiento asignado. Todos ellos presentan título de anticuerpos IgG frente a *Leishmania* mayor o igual a 40, parásito en sangre detectado por qPCR y al menos dos signos clínicos compatibles con la enfermedad.

nº	Raza	Sexo	Título IFI	qPCR	Tratamiento	Síntomas
1	Cruce Labrador	H	1280	+	G	OS
2	Cruce pequeño	M	160	+	G	OS
3	Bóxer	M	1280	+	G	PS
4	Bóxer	M	160	+	G	OS
5	Pastor malinois	H	320	+	G	OS
6	Cruce Teckel	M	40	+	G	OS
7	Mastín	M	80	+	MTC	OS
8	Cruce grande	M	640	+	MTC	PS
9	Cruce mediano	H	320	+	MTC	OS
10	Cruce Labrador	H	80	+	MTC	OS
11	Podenco	M	80	+	MTC	PS
12	Podenco	M	320	+	MTC	PS
13	Cruce mediano	H	1280	+	GM	PS
14	Cruce Sharpei	M	160	+	GM	OS
15	Labrador	M	80	+	GM	OS
16	Pastor alemán	M	80	+	GM	OS
17	Pointer	M	320	+	GM	PS
18	Duck troling	M	80	+	GM	OS
19	Podenco	M	160	+	B	PS
20	Cruce mediano	M	1280	+	B	PS
21	Podenco	M	160	+	B	PS
22	Pastor alemán	M	40	+	B	OS

Tabla 20. Características de los perros seleccionados en el ensayo de tratamiento. Se indica el título de anticuerpos y las características clínicas al inicio del ensayo. En la columna "Sexo", H (hembra) y M (macho); en la columna tratamiento, MTC (MTC-305), G (Antimoniato de meglumina), GM (Combinación antimoniato de meglumina y MTC-305) y B ((-)- $\alpha$ -bisabolol). En la columna "raza", si no está clara, se identifica como "cruce" y se indica el tamaño. En la columna "síntomas" se clasifica a cada perro como oligosintomático (OS) si tiene 2 signos y polisintomático (PS) si tiene más de 2 signos compatibles con leishmaniosis canina.

Se hicieron 3 grupos de 6 perros cada uno, que recibieron tratamiento con Glucantime®, MTC-305 o la combinación de ambos, y otro grupo de 4 perros

tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol. Los perros se asignaron a cada grupo de forma aleatoria, pero intentando conseguir un equilibrio de perros oligosintomáticos y polisintomáticos en cada grupo.

### **3.2. Características clínicas relacionadas con la leishmaniosis de los perros incluidos en los ensayos antes del tratamiento**

El día antes de empezar la primera serie de tratamiento (día 0) se realizó una toma de muestras para evaluar el estado clínico, parasitológico e inmunológico de los animales.

Además de servir como punto de partida para evaluar la evolución de los animales durante el tratamiento, con este análisis se persigue establecer asociaciones entre los parámetros de tipo clínico, la parasitación de los tejidos y la respuesta inmunológica del animal.

#### **3.2.1. Cargas parasitarias**

Se detectó el parásito en ganglio en 16 de los 22 perros (72,7%) y en médula ósea en otros 16 (72,7%). En sangre se detectó el parásito en todos los animales mientras que en el pelo se detectó en 10 de los 13 perros en los que se analizó (76,9%). La siguiente tabla muestra las cargas parasitaria en los distintos tejidos.

<b>Tejido</b>	<b>Carga parasitaria</b>
<b>Sangre</b>	0,051 $\pm$ 0,2 P/ $\mu$ L
<b>Médula ósea</b>	148,9 $\pm$ 528 P/ $\mu$ L
<b>Ganglio poplíteo</b>	68,7 $\pm$ 116 P/ $\mu$ g
<b>Pelo</b>	9,34 $\pm$ 19,5 P/pelo

**Tabla 21.** Cargas parasitaria en los distintos tejidos en los perros antes del tratamiento expresados en Parásitos (P) por microlitro de tejido, por microgramo de ADN o por pelo

#### **3.2.2. Títulos de anticuerpos**

Se encontraron títulos de anticuerpos IgG<sub>total</sub> de entre 40 y 1280, de los cuales 4 perros tuvieron título 40 y el resto mayor o igual a 80, siendo el valor más encontrado un título de 160. Con respecto a la subclase IgG1, se encontró en el rango 0-1280, teniendo 16 perros títulos de 20 o menos. Mientras que IgG2, solo 3 perros tuvieron títulos inferiores a 40, con un máximo de 1280. El gráfico 28 muestra la dispersión de los títulos de anticuerpos.

## V. Resultados

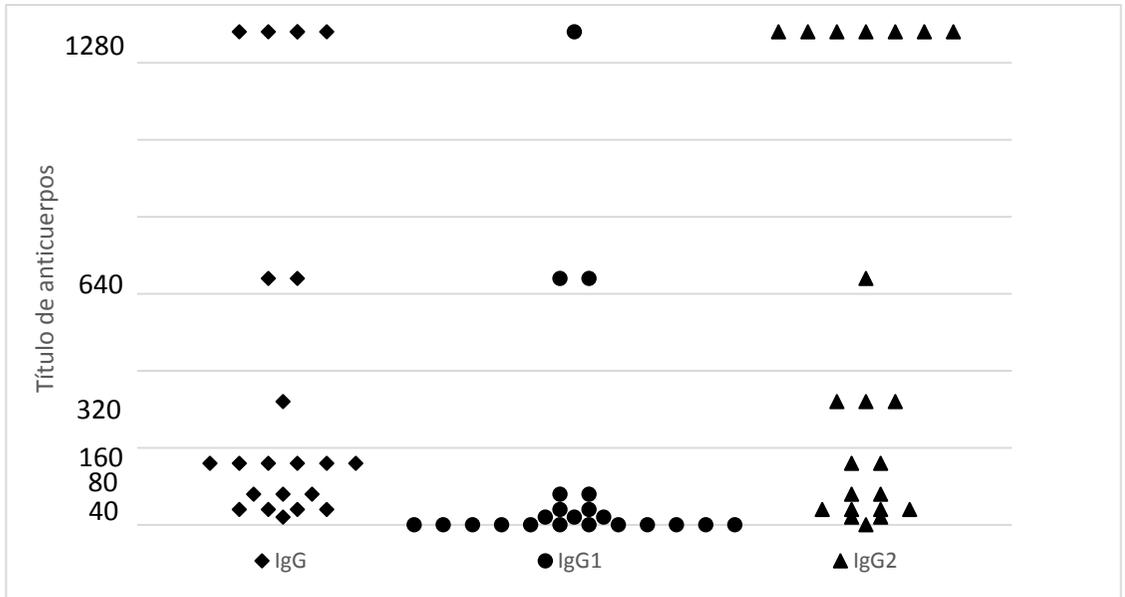


Gráfico 28. Gráfico de dispersión de los títulos de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2.

El coeficiente IgG2/IgG1 varió entre 0 y 1280.

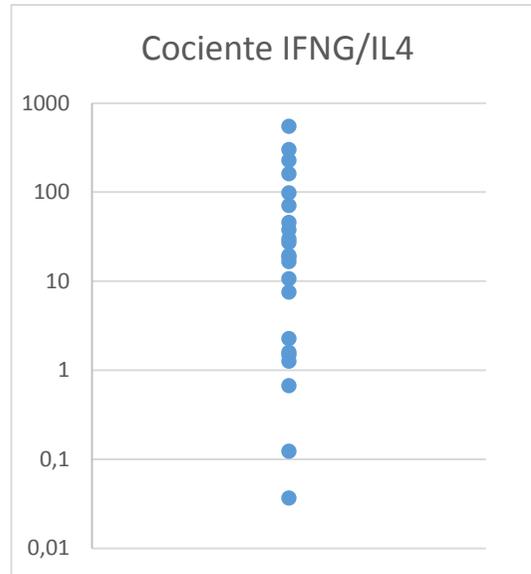
### 3.2.3. Expresión de citoquinas

Como se indica en la página 98, se eligió un perro sano, ajeno al ensayo, para determinar sus niveles de expresión de ambas citoquinas, definiendo el estado inmunológico de un perro sano para utilizarlo como control a la hora de obtener valores relativos de expresión de citoquinas en los perros del ensayo. Este perro mostró una mayor expresión relativa de interleuquina 4 (IL4) con respecto a interferón gamma (IFNG), concretamente 3,9 veces más.

La expresión relativa de IFNG en los perros del ensayo con respecto al control varió de 0,13 a 59,7 siendo la media  $10,78 \pm 16,8$ .

La expresión relativa de IL4 con respecto al control varió de 0,03 a 3,6 siendo la media de  $0,68 \pm 1,1$ .

El cociente IFNG/IL4 en los perros del ensayo se encontró entre 0,04 a 548,8 con respecto al control, con una media de  $73,8 \pm 133$  (grafico 29).



**Gráfico 29.** Gráfico de dispersión con los valores del cociente IFNG/IL4 para cada perro. Los valores inferiores a 1 indican mayor expresión IL4.

### **3.2.4. Prueba de hipersensibilidad retardada o intradermorreacción de Montenegro (IDR)**

La prueba IDR dio positivo en 8 de los 22 perros.

### **3.2.5. Manifestaciones clínicas**

Se encontraron valores de puntuación clínica (página 91) de entre 2-24 (media  $6,9 \pm 7$ ). La frecuencia de la presencia de los signos utilizados para el cálculo de la puntuación clínica (PC) se muestra en la siguiente tabla. Además, en esta tabla 22 se incluyen las alteraciones bioquímicas, hematológicas y enzimáticas detectadas en los perros y su frecuencia, aunque no fuesen utilizados para el cálculo del valor PC.

V. Resultados

<b>Signo clínico</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>%</b>	<b>PC</b>
Linfadenomegalia	20	90,9	Sí
Monocitopenia	17	77,3	
Lesiones cutáneas	17	77,3	Sí
Onicogriposis	12	54,5	Sí
Triglicéridos bajos	12	54,5	
Delgadez	11	50,0	Sí
Caspa	9	40,9	Sí
Bilirrubinemia elevada	9	40,9	
Eosinopenia	8	36,4	
Linfocitopenia	8	36,4	
Neutrófilo segmentados elevados	8	36,4	
Índices eritrocíticos alterados	6	27,3	
Uremia elevada	5	22,7	
Amilasa baja	5	22,7	
Ánimo bajo	4	18,2	Sí
Uveítis/Queratitis	4	18,2	Sí
Hiperqueratosis trufa/plantillas	4	18,2	Sí
Hiperqueratosis general	4	18,2	Sí
Índice Albúmina/Globulinas bajo	4	18,2	Sí
Trombocitopenia	4	18,2	
Linfocitosis	4	18,2	
Hemoglobina baja	3	13,6	
Alopecia	2	9,1	Sí
Anemia no regenerativa	2	9,1	Sí
Colesterol bajo	2	9,1	
Eritrocitos bajo	2	9,1	
Hematocrito bajo	2	9,1	
Proteínas séricas elevadas	2	9,1	
Fosfatasa alcalina elevada	2	9,1	
Dermatitis exfoliativa seca	1	4,5	Sí
Creatinina elevada	1	4,5	Sí
Neutrófilo segmentados bajos	1	4,5	
Lipasa baja	1	4,5	
GPT elevada	1	4,5	
Amilasa elevada	1	4,5	
Vómito	1	4,5	Sí
Diarrea	1	4,5	Sí
Conjuntivitis/Blefaritis	0	0,0	Sí
Palidez de las mucosas	0	0,0	Sí
Epistaxis	0	0,0	Sí
Ulceras o nódulos bucales	0	0,0	Sí
Esplenomegalia	0	0,0	Sí
Cojera	0	0,0	Sí

Tabla 22. Frecuencia de los signos clínicos alterados. En la columna “%” se indica el porcentaje de perros que muestran el signo. En la columna PC se indica si el signo clínico se utilizó para la suma de la puntuación clínica.

### 3.2.6. Análisis de los valores hematológicos y bioquímicos de los perros antes del tratamiento

Parámetro hematológico	Valores medios en los perros del ensayo
<b>Hemoglobina</b>	15,0 ± 3 g/dL
<b>Eritrocitos</b>	6,6 ± 1 ×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Hematocrito</b>	41,9 ± 8 %
<b>VCM</b>	63,2 ± 3 μm <sup>3</sup>
<b>HCM</b>	22,5 ± 1 pg
<b>CHCM</b>	35,8 ± 1 μm <sup>3</sup>
<b>Plaquetas</b>	258,4 ± 160 ×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Leucocitos</b>	8,3 ± 3 ×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Neutrófilos en cayado</b>	1,2 ± 1 % 0,12 ± 0,1 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Neutrófilos segmentados</b>	72,8 ± 10 % 6,3 ± 2 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Linfocitos</b>	19,6 ± 9 % 1,7 ± 1 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Eosinófilos</b>	4,6 ± 4 %
<b>Basófilos</b>	0 ± 0 %
<b>Monocitos</b>	1,8 ± 1 %

Tabla 23. Valores medios de las pruebas hematológicas. VCM= volumen corpuscular medio; HCM= hemoglobina corpuscular media; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media.

Los valores hematológicos medios se encuentran dentro de los límites de normalidad.

## V. Resultados

<b>Función hepática y renal. Proteínas y electrolitos</b>	<b>Valores medios en los perros del ensayo</b>
<b>AST</b>	38,9 ± 4 U/L
<b>ALT</b>	54,7 ± 13 U/L
<b>ALP</b>	76,8 ± 14 U/L
<b>Bilirrubina total</b>	0,60 ± 0,1 mg/dL
<b>B. directa</b>	0,41 ± 0,5 mg/dL
<b>Urea</b>	39,3 ± 15 mg/dL
<b>Creatinina</b>	0,8 ± 0,2 mg/dL
<b>Proteína total</b>	6,4 ± 1 mg/dL
<b>Albúmina</b>	3,2 ± 0,3 mg/dL
<b>Globulinas</b>	3,2 ± 1 mg/dL
<b>Calcio</b>	9,5 ± 0,5 mg/dL
<b>Fósforo</b>	5,3 ± 1 mg/dL

**Tabla 24.** Valores medios de los distintos parámetros relacionados con la función hepática, renal, proteínas y electrolitos. AST= aspartato aminotransferasa; ALT= alanina aminotransferasa; ALP= fosfatasa alcalina

Todos los valores medios se encuentran dentro de los límites de normalidad, excepto el valor de bilirrubina directa (0,41 mg/dL frente al límite, 0,3 mg/dL).

<b>Páncreas, glucosa y lípidos</b>	<b>Valores medios en los perros del ensayo</b>
<b>Amilasa</b>	564,1 ± 324 U/L
<b>Lipasa</b>	83,3 ± 59 U/L
<b>Glucosa</b>	88,4 ± 16 mg/dL
<b>Colesterol</b>	185,4 ± 50 mg/dL
<b>Triglicéridos</b>	37,1 ± 13 mg/dL

**Tabla 25.** Valores medios de los parámetros relacionados con la función pancreática, glucosa y lípidos.

Todos los valores medios se encuentran dentro de los límites de normalidad.

### 3.2.7. Asociaciones entre los distintos marcadores clínicos y de la enfermedad

#### 3.2.7.1. Puntuación clínica (PC) o clinical score

La PC está asociada a la carga parasitaria en médula ósea ( $p=0,0328$ ; coeficiente de correlación ( $r$ ) =0,519), al igual que a la carga parasitaria en ganglio ( $p= 0,0101$ ;  $r=0,686$ ) pero no a la carga parasitaria en sangre ( $p >0,1$ ). También mostró asociación con la carga parasitaria encontrada en el pelo ( $p =0,0329$ ,  $r =-0,601$ )

Mostró asociación con el título de IgG total ( $p=0,0007$ ;  $r=0,669$ ), con el título de IgG1 ( $p<0,0001$ ;  $r=0,795$ ) y con IgG2 ( $p=0,0004$ ;  $r=0,684$ ). De este modo, estableciendo un título umbral de 80, observamos que los perros con título de IgG1>80 van a tener unas puntuaciones clínicas mayores ( $p <0,001$ ), sucediendo lo mismo con IgG2 ( $p =0,02$ ) pero no con IgG<sub>total</sub> ( $p =0,06$ ). El cociente IgG2/IgG1 mostró asociación negativa con la puntuación clínica ( $p =0,033$ ;  $r =0,468$ ).

Los niveles de expresión de citoquinas no mostraron asociación con la puntuación clínica de los perros. Al intentar realizar un modelo matemático que explicase la puntuación clínica de los perros, no se obtuvo ninguno satisfactorio. Posteriormente se intentó encontrar los síntomas y signos clínicos relacionados con un peor cuadro clínico del animal en términos de PC, para lo cual se realizó un análisis ANOVA.

<b>Signo</b>	<b>p-valor</b>
<b>Linfocitopenia</b>	0,0050
<b>Proteínas elevadas</b>	0,0016
<b>Amilasa elevada</b>	0,0112
<b>Anemia arregenerativa</b>	0,0016
<b>Delgadez</b>	0,0025
<b>Animo bajo</b>	<0,0001
<b>Uveítis/Queratitis</b>	0,0036
<b>Onicogriposis</b>	0,0005
<b>Hiperqueratosis</b>	0,0003
<b>Hiperqueratosis general</b>	0,0153
<b>Alopecia</b>	0,0016
<b>Dermatitis exfoliativa seca</b>	0,0181
<b>Lesiones cutáneas</b>	0,0016
<b>Creatinina elevada</b>	0,0181
<b>Índice Alb/glob bajo</b>	<0,0001
<b>Caspa</b>	<0,0001

Tabla 26. Signos clínicos asociados con puntuaciones clínicas más elevadas y su nivel de significación

## V. Resultados

De los signos utilizados para el cálculo de la puntuación clínica, solo "Linfadenopatía" no mostró asociación con cuadros clínicos más graves.

### 3.2.7.2. Carga parasitaria en sangre

La parasitemia no mostró asociación con la carga parasitaria en ganglio ( $p > 0,1$ ) pero resultó correlacionada con la carga en médula ósea ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,999$ ). No mostró asociación con el título  $IgG_{total}$  ( $p = 0,084$ ) ni con  $IgG2$  ( $p > 0,1$ ) pero sí una fuerte relación con el de  $IgG1$  ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,943$ ). El cociente  $IgG2/IgG1$  también mostró asociación negativa con esta variable, disminuyendo la carga en sangre conforme aumenta este índice ( $p = 0,0043$ ;  $r = -0,584$ ). Comparando las cargas parasitarias en sangre entre perros con títulos mayores o iguales a 80, descubrimos que las cargas son mayores en perros con mayor título de  $IgG1$  ( $p = 0,036$ ) aunque esto no se aplica a  $IgG2$  o  $IgG_{total}$ . Con respecto a los niveles de citoquinas, la carga parasitaria en sangre mostró asociación negativa tanto con el nivel de expresión relativo de IFNG ( $p = 0,0121$ ,  $r = 0,529$ ) como con el cociente IFNG/IL4 ( $p < 0,0001$ ;  $r = -0,959$ ), pero no con el nivel de expresión de IL4.

Sin embargo, el único modelo posible que podría incluir más de una variable es el siguiente:

$$S = 0,0184404 + 0,000484099 \times MO - 0,00123848 \times IFNG/IL4$$

**Donde S es la carga parasitaria en sangre, MO la carga parasitaria en médula ósea (ambas en parásitos/ $\mu$ L) y IFNG/IL4 es el cociente entre la expresión relativa de IFNG y de IL4 con respecto al control.**

Este modelo es estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) y explica el 98,3% de la variabilidad de las cargas parasitarias en sangre de los perros con leishmaniosis canina adquirida de forma natural.

### 3.2.7.3. Carga parasitaria en ganglio poplíteo

No se encuentra asociación entre la carga parasitaria en ganglio y la de médula ósea ( $p > 0,1$ ) aunque sí asociación positiva con el título de  $IgG_{total}$  ( $p = 0,05$ ,  $r = 0,436$ ). Tampoco es posible establecer un modelo capaz de relacionarlas. Se encuentra una relación positiva entre el coeficiente IFNG/IL4 y la carga parasitaria en ganglio ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,806$ ).

### 3.2.7.4. Carga parasitaria en médula ósea (MO)

La carga parasitaria en médula ósea mostró asociación positiva con el título de IgG1 ( $p=0,0026$ ;  $r=0,780$ ), pero no con IgG<sub>total</sub> o IgG2, y una asociación negativa con el coeficiente IgG2/IgG1 ( $p=0,0054$ ;  $r=0,584$ ). En perros con IgG1 >80, las cargas en MO fueron mayores ( $p=0,0334$ ).

La carga parasitaria en médula ósea mostró una fuerte asociación con los niveles relativos de expresión de citoquinas: se observa una asociación negativa con el nivel de IFNG ( $p=0,0126$ ,  $r=0,566$ ) y una muy fuerte asociación positiva con el nivel de IL4 ( $p<0,0001$ ;  $r=0,990$ ). La asociación con el coeficiente IFNG/IL4 es muy fuerte también ( $p<0,0001$ ;  $r=0,994$ ).

### 3.2.7.5. Carga parasitaria en pelo

La carga parasitaria en el pelo de los animales mostró asociación positiva con la carga parasitaria en ganglio poplíteo ( $p<0,0001$ ,  $r=0,884$ ) y en sangre periférica ( $p=0,0144$ ,  $r=0,686$ ). También mostró asociación positiva con el título de anticuerpos IgG1 ( $p=0,0406$ ,  $r=0,480$ ) y con el nivel de expresión relativa de IL4 ( $p=0,0479$ ,  $r=0,605$ ) y negativa con el coeficiente IFNG/IL4 ( $p=0,0166$ ,  $r=-0,671$ ).

### 3.2.7.6. Títulos de anticuerpos y relación con los niveles relativos de expresión de citoquinas

El título de IgG<sub>total</sub> mostró asociación positiva con IgG1 ( $p<0,0001$ ;  $r=0,849$ ) e IgG2 ( $p<0,0001$ ;  $r=0,870$ ).

Con respecto al título de anticuerpos IgG<sub>total</sub>, éste mostró asociación negativa con el nivel de expresión relativo de IFNG ( $p=0,0486$ ,  $r=-0,436$ ). La misma situación se encuentra con el título de anticuerpos IgG1, mostrando asociación positiva con IL4 ( $p=0,0260$ ,  $r=0,469$ ) y negativa con IFNG ( $p=0,0243$ ,  $r=-0,48$ ).

No se encontró asociación entre el título de IgG2 con las citoquinas; sin embargo el coeficiente IgG2/IgG1 sí mostró asociación, negativa con IL4 ( $p=0,0322$ ,  $r=-0,447$ ) y positiva con el cociente IFNG/IL4 ( $p=0,0091$ ,  $r=0,548$ ).

Este cociente IFNG/IL4 además mostró asociación negativa con los títulos de IgG total ( $p=0,05$ ,  $r=-0,424$ ) e IgG1 ( $p=0,0285$ ,  $r=-0,469$ ).

### **3.2.7.7. Intradermorreacción de Montenegro**

La prueba de hipersensibilidad retardada o intradermorreacción de Montenegro (IDR) comprueba el nivel de inmunidad celular. Al comprobar el resultado de esta reacción (positivo o negativo) con otras variables estudiadas se observa que:

Existe asociación negativa entre el título IgG<sub>total</sub> y la positividad en la respuesta a este test ( $p=0,032$ ,  $r=-0,48$ ) así como con el título IgG1 ( $p=0,050$ ,  $r=-0,41$ ). No se observa asociación con el coeficiente IgG2/IgG1 ni con la expresión de citoquinas.

La positividad a la prueba IDR muestra asociación negativa con las cargas parasitarias en médula ósea ( $p=0,0445$ ,  $r=-0,39$ ) y en ganglio poplíteo ( $p=0,017$ ,  $r=-0,45$ ) pero no con otras.

### **3.2.7.8. Influencia de los distintos parámetros evaluados sobre los signos clínicos**

La presencia de signos clínicos generales (como delgadez y ánimo bajo) mostró asociación con mayores títulos de anticuerpos IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG2 ( $p < 0,05$ ) así como con la carga parasitaria en ganglio ( $p < 0,01$ ) y en médula ósea ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a los signos cutáneos, la presencia de alopecia, de hiperqueratosis (en trufa o plantillas) y de caspa se mostraron asociados a elevados títulos IgG<sub>total</sub> ( $p < 0,01$ ), IgG1 ( $p < 0,001$ ) e IgG2 ( $p < 0,05$ ) así como negativamente asociados al valor de coeficiente IgG2/IgG1 ( $p < 0,01$ ). La carga parasitaria en sangre también mostró asociación con estos signos ( $p < 0,05$ ). La carga parasitaria en ganglio mostró asociación positiva con la presencia de lesiones cutáneas ( $p < 0,05$ ) y caspa ( $p < 0,001$ ).

**Alteraciones hematológicas:** Destaca la asociación negativa de la carga parasitaria en médula ósea con el nivel de hemoglobina en sangre, número de eritrocitos y hematocrito ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,65$ ). Esta carga parasitaria también mostró asociación con alteraciones de los índices de los glóbulos rojos, relacionándose con menores valores de VCM, HCM y CHCM ( $p < 0,01$ ;  $r < -0,7$ ). También la carga parasitaria en sangre mostró asociación con esas mismas alteraciones: nivel de hemoglobina, recuento de eritrocitos y hematocrito ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,5$ ).

El nivel de expresión de IL4 mostró asociación negativa también con el nivel de hemoglobina, recuento de eritrocitos y hematocrito ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,45$ ), pero no así el nivel de interferón gamma; sin embargo el cociente IFNG/IL4 sí mostró asociación positiva con los valores hematológicos ( $p < 0,01$ ;  $r > 0,6$ ).

El título de IgG<sub>total</sub> mostró asociación negativa con el nivel de hemoglobina y de HCM ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,4$ ) pero el título de IgG1 fue el que mostró mayor asociación negativa con estas alteraciones: niveles de hemoglobina, eritrocitos y hematocrito ( $p < 0,001$ ;  $r < -0,8$ ), de VCM y HCM ( $p < 0,001$ ;  $r < -0,7$ ). Aunque el título de IgG2 no mostró asociación con estas variables, sí lo hizo el cociente IgG2/IgG1 mostró una relación positiva con el nivel de hemoglobina, eritrocitos y hematocrito ( $p < 0,01$ ,  $r > 0,6$ ) y con los índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración corpuscular media de hemoglobina), ( $p < 0,05$ ;  $r > 0,5$ ).

La presencia de anemia arregenerativa se asocia positivamente a la carga parasitaria en médula ósea, en sangre, a los títulos IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG ( $p < 0,05$ ) y negativamente al índice IgG2/IgG1 ( $p = 0,01$ ).

**Fórmula leucocitaria:** Se encontró asociación negativa entre la parasitación de la médula con el número de linfocitos en sangre ( $p < 0,01$ ;  $r < -0,7$ ). La parasitemia también mostró asociación negativa con esta variable ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,7$ ). El nivel de expresión de IL4 mostró asociación negativa con el número de leucocitos ( $p = 0,003$ ;  $r < -0,6$ ) y positiva con el número de neutrófilos segmentados ( $p = 0,05$ ;  $r = 0,4$ ). El nivel de IFNG no mostró asociación, pero sí el cociente IFNG/IL4, relacionándose positivamente con el número de linfocitos ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,7$ ).

Los títulos de anticuerpos mostraron asociación con el número de leucocitos. El título de IgG<sub>total</sub> mostró asociación negativa con el número de neutrófilos cayados, eosinófilos y linfocitos ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,5$ ) y positiva con el número de neutrófilos segmentados ( $p = 0,04$ ;  $r = 0,5$ ). El título de IgG1 mostró asociación positiva con el número de neutrófilos segmentados también ( $p = 0,004$ ;  $r = 0,6$ ) y negativa con el número de linfocitos ( $p < 0,001$ ,  $r = -0,8$ ). El título de IgG2 no mostró asociación con ninguna de estas variables, pero sí el coeficiente IgG2/IgG1 que mostró asociación negativa con el número total de leucocitos y de neutrófilos segmentados ( $p < 0,01$ ;  $r < -0,6$ ) y positiva con el número de linfocitos ( $p < 0,01$ ;  $r = 0,6$ ).

**Funciones renal, hepática y pancreática:** La carga parasitaria en médula ósea ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,97$ ), parasitemia ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,8$ ) y título de IgG1 ( $p < 0,1$ ;  $r = 0,6$ ) muestran asociación positiva con el nivel de fosfatasa alcalina mientras que el nivel

## V. Resultados

de expresión de IFNG ( $p = 0,05$ ;  $r = -0,4$ ) y los coeficientes IgG2/IgG1 e IFNG/IL4 muestran asociación negativa ( $p < 0,001$ ;  $r < -0,8$ ).

El título de IgG1 muestra asociación positiva con la uremia ( $p = 0,01$ ;  $r = 0,6$ ). El nivel de expresión de IFNG muestra asociación negativa con el nivel de creatinina ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,4$ ) EL cociente IgG2/IgG1 muestra asociación negativa con el nivel de urea ( $p = 0,02$ ;  $r = -0,6$ ) y el cociente IFNG/IL4 con el de creatinina ( $p < 0,01$ ;  $r = -0,6$ ).

La carga parasitaria en ganglio mostró asociación positiva con el valor de GPT ( $p = 0,02$ ;  $r = 0,5$ ) mientras que el nivel de IFNG mostró una asociación negativa ( $p = 0,01$ ;  $r = -0,5$ ). Los títulos de IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG2 mostraron asociación positiva con el nivel de GOT ( $p < 0,001$ ;  $r > 0,7$ ).

Se encontró relación positiva entre el título de IgG1 y los niveles de amilasa ( $p = 0,01$ ;  $r = 0,53$ ) y lipasa ( $p = 0,02$ ;  $r = 0,49$ ) pancreáticas. También los títulos de IgG<sub>total</sub> e IgG2 mostraron asociación positiva con la última ( $p < 0,01$ ;  $r > 0,5$ ).

Con respecto a los lípidos, se encontraron asociaciones positivas entre el colesterol en sangre y la carga parasitaria en médula ósea y el nivel de IL4 ( $p < 0,01$ ;  $r > 0,6$ ). El nivel de triglicéridos también se vio afectado positivamente por el nivel de IL4 y los títulos de IgG<sub>total</sub> e IgG1 ( $p < 0,01$ ,  $r > 0,5$ ) y negativamente por el coeficiente IgG2/IgG1 ( $p < 0,01$ ;  $r < -0,6$ ).

Las proteínas totales en sangre se vieron asociadas con la carga parasitaria en médula ósea, la parasitemia, el nivel de IL4 y los títulos de IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG2 ( $p < 0,01$ ;  $r > 0,6$ ) y negativamente por los coeficientes IFNG/IL4 e IgG2/IgG1 ( $p < 0,05$ ;  $r < -0,5$ ).

Por último, el coeficiente Albúmina/Globulinas mostró asociación negativa con la carga parasitaria en médula ósea ( $p < 0,001$ ;  $r < -0,8$ ), la parasitemia y el nivel de IL4 ( $p < 0,01$ ;  $r < -0,5$ ), y los títulos IgG<sub>total</sub> e IgG1 ( $p < 0,001$ ,  $r < -0,9$ ). Mostró asociación positiva con el título IgG2 y los coeficientes IFNG/IL4 e IgG2/IgG1 ( $p < 0,01$ ,  $r > 0,7$ ).

### 3.3. Evaluación del antimonio de meglumina (Glucantime®) en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural

#### 3.3.1. Evaluación de la eficacia del tratamiento

Como muestra la tabla 27, en el análisis previo al tratamiento (día 0), de los 6 perros tratados con Glucantime® a dosis habituales, tratamiento utilizado como referencia en el ensayo, se encontró el parásito en médula ósea en 4 de ellos, por lo que se les aplicó el criterio de eficacia 1 (reducción del 50% de la carga parasitaria en médula ósea), el cuál cumplieron dos perros en los que la carga parasitaria se redujo en un 91% y un 100% respectivamente tras la segunda serie de tratamiento (día 120) mientras que en los otros dos perros la carga parasitaria en médula ósea aumentó más de 5 veces.

A los dos perros sin carga parasitaria en médula ósea, se les aplicó el criterio de eficacia 2 (reducción del 50% de la carga parasitaria en sangre y ganglio poplíteo), el cual no cumplió ninguno de ellos: en ambos perros disminuyó la carga parasitaria en ganglio pero aumentó en sangre tras la segunda serie de tratamiento (día 120).

Perro nº	Glucantime Criterio/ Eficacia	Carga Parasitaria								Puntuación Clínica	
		MO		G		S		P		Inicio	Fin
		Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120		
3	1 / Si	2124	185,4	63,6	129	1,06	0,01	14,3	2,1	18	18
6	1 / Si	0,3	0	0	0	0,02	0,03	NR	NR	2	1
4	1 / No	0,004	0,02	0	7,1	0,01	0,004	NR	NR	2	2
5	1 / No	0,01	0,06	1,3	108,4	0,001	0,02	NR	NR	2	5
2	2 / No	0	0	172,0	0	0,002	0,26	0,2	0,4	2	2
1	2 / No	0	0	11,2	0	0,003	0,01	0,01	0,01	3	4

Tabla 27. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con antimonio de meglumina en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN, y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

## V. Resultados

Se puede observar que, aunque los perros 3 y 6 cumplen el criterio de eficacia 1, se produce un aumento de la carga parasitaria en ganglio o en sangre. Hay 4 perros en los que no se cumple ningún criterio de eficacia, en uno aumenta la carga parasitaria en médula ósea, ganglio y sangre, en otro animal el aumento de la carga parasitaria se produce en médula ósea y ganglio y en los dos restantes el aumento se produce sólo en sangre. La puntuación clínica no experimentó grandes cambios, sin influir si el tratamiento fue eficaz o no según los criterios establecidos.

Tomando los perros en conjunto, la carga parasitaria en médula ósea aumentó un 3,3% de media, la carga parasitaria en ganglio un 20,0% de media y la carga parasitaria en sangre un 31,8% de media tras el tratamiento (día 120).

La carga parasitaria en pelo disminuyó en el perro que cumplió el criterio de eficacia 1 (nº 3) mientras que aumenta o se mantiene en los otros dos perros (perros 2 y 1) en los que la parasitemia había aumentado y la carga parasitaria en ganglio disminuido.

Perro	Glucantime Criterio/ nº Eficacia	Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFNG		IL4	
		Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120
3	1 / Si	1280	1280	1280	1280	1280	1280	3,4	0,4	0,03	0,02
6	1 / Si	40	0	0	0	40	0	0,1	11,7	3,6	0,1
4	1 / No	80	160	0	0	160	20	0,3	0,04	0,1	0,7
5	1 / No	320	80	0	0	160	80	1,0	7,1	0,03	1,1
2	2 / No	40	80	0	0	20	0	5,7	3,2	3,6	1,3
1	2 / No	640	320	40	40	1280	1280	4,7	12,0	0,2	0,1

**Tabla 28.** Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con antimonio de meglumina en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

En lo que hace referencia a la respuesta inmune, los perros tratados con Glucantime® mostraron una evolución desigual de los títulos de anticuerpos IgG e IgG2 y los niveles de expresión IFNG e IL4 (tabla 28). Solo en dos de ellos parece haberse activado con el tratamiento la respuesta Th1, uno cumple los criterios de eficacia (perro 6) y otro no (perro 1). En el perro 4 el tratamiento habría activado la respuesta Th2 y en el 5 ambas. Los perros 3 y 2 parecen mostrar una reducción de ambos tipos de respuesta inmune.

La tabla 29 muestra la comparación entre los resultados antes del inicio del tratamiento (día 0) y tras el periodo de seguimiento (día 210). En los perros donde el tratamiento se consideró eficaz de acuerdo con los criterios previamente fijados no se produjeron recidivas (la recidiva se refiere al aumento en la carga parasitaria en el tejido que se utilizó para establecer el criterio de eficacia y se consideró parcial si supera al análisis en el día 120 sin superar el umbral del 50% de reducción, y total si superaba dicho umbral) y las cargas parasitarias disminuyeron en médula ósea y en sangre pero aumentaron en ganglio. El perro 2, en el que el tratamiento no se había considerado eficaz, negativizó las cargas parasitarias en las cuatro muestras analizadas en el día 210 (tabla 29) y parece presentar un claro predominio de respuesta Th1 (tabla 30).

Glucantime		Carga Parasitaria								Puntuación	
Perro		MO		G		S		P		Clínica	
nº	Criterio/ Recidiva	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 120
3	1 / No	2124	1,8	63,6	69,6	1,06	0	14,3	11,1	18	20
6	1 / No	0,3	0	0	0,04	0,02	0,003	NR	NR	2	4
4	1	0,004	0,13	0	5,8	0,01	0	NR	NR	2	2
5	1	0,01	0,09	1,3	26,7	0,001	0,01	NR	NR	2	5
2	2	0	0	172,0	0	0,002	0	0,2	0	2	1
1	2	0	0	11,2	17,8	0,003	0	0,01	0	3	1

Tabla 29. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con antimonio de meglumina en los días 0 (Inicio, antes del tratamiento) y 210 (Seg: seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (sí o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

## V. Resultados

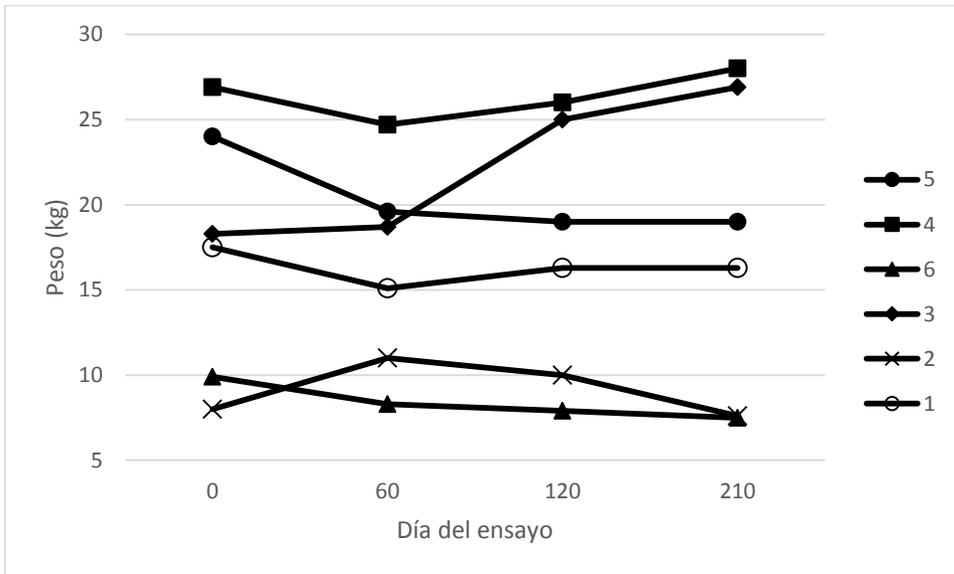
nº	Glucantime Perro Criterio/ Recidiva	Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFN		IL4	
		Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg
		0	210	0	210	0	210	0	210	0	210
3	1 / No	1280	1280	1280	1280	1280	1280	3,4	0,1	0,03	0,03
6	1 / No	40	20	0	0	40	40	0,1	3,1	3,6	0,1
4	1	80	320	0	80	160	640	0,3	0,1	0,1	0,2
5	1	320	40	0	0	160	80	1,0	0,1	0,03	32,7
2	2	40	40	0	0	20	0	5,7	10,6	3,6	0,1
1	2	640	320	40	80	1280	640	4,7	0,3	0,2	0,03

**Tabla 30.** Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con antimonio de meglumina en los días 0 (Inicio: antes del tratamiento) y 210 (Seg: seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La columna nº hace referencia al perro. El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (sí o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

En la tabla 30 se observa como los títulos de anticuerpos no variaron en los perros en los que el tratamiento fue eficaz con respecto al día 120, aunque sí disminuyeron los niveles de expresión IFNG y aumentaron los de IL4. En el resto de perros donde el tratamiento no fue eficaz en el día 120, las cargas parasitarias aumentaron de forma evidente en ganglio poplíteo al final del periodo de seguimiento. De ellos, el perro 5, experimentó un incremento general en las cargas parasitarias y empeoramiento del estado clínico, acompañado de un aumento en los niveles de expresión de IL4 y un descenso en los de IFNG que evidenciaron un predominio de respuesta Th2.

### 3.3.2. Evaluación de la seguridad del tratamiento

#### Peso y aspecto general



**Gráfico 30.** Evolución del peso en kilogramos de los seis animales durante el tratamiento con antimonio de meglumina. Las flechas indican las series de tratamiento

Cuatro de los perros tratados con antimonio de meglumina sufrieron una pérdida de peso superior al 5% tras la primera serie de tratamiento, de los cuales solo uno volvió a los valores iniciales. Al final del ensayo cuatro perros tenían un peso al menos un 5% inferior al peso con el que empezaron el ensayo: perros número 1, 2, 5 y 6.

#### Alteraciones gastrointestinales

El tratamiento con Glucantime® sólo provocó un episodio de diarreas de varios días de duración en uno de los perros (perro 3) tratados durante la primera serie de tratamiento que se resolvió espontáneamente.

## Alteraciones bioquímicas y hematológicas

Parámetro/Día	0	60	120	210
Hemoglobina (g/dL)	14,8 ± 3 (1)	16,6 ± 3 (1)	15,7 ± 2 (1)	15,5 ± 2
Eritrocitos (millón/ $\mu$ L)	6,4 ± 1 (1)	7,4 ± 1	7,0 ± 1	6,9 ± 1 (1)
Hematocrito (%)	40,5 ± 8 (1)	46,3 ± 6 (1)	44,8 ± 6 (1)	44,2 ± 5 (1)
Leucocitos (mil/ $\mu$ L)	7,1 ± 2 (1)	8,1 ± 3 (1)	8,8 ± 2	9,9 ± 2
Neutrófilos cayados (%)	1,5 ± 1	1,2 ± 2 (1)	1,3 ± 1	0,8 ± 1
Neutrófilos cayados	0,11 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,12 ± 0,1	0,08 ± 0,1
Neutrófilos segmentados	75,1 ± 10 (1)	66,2 ± 13 (2)	55,8 ± 11* (4)	67,3 ± 11 (1)
N. segmentados (mil/ $\mu$ L)	5,3 ± 1	5,2 ± 1	4,8 ± 1	6,6 ± 1
Eosinófilos (%)	3,5 ± 3 (2)	4,5 ± 3 (2)	2,7 ± 2 (2)	3,5 ± 3 (2)
Basófilos (%)	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
Linfocitos (%)	18,1 ± 11 (2)	26,8 ± 12	36,7 ± 12	27,2 ± 9
Linfocitos (mil/ $\mu$ L)	1,4 ± 1 (3)	2,4 ± 2 (1)	3,4 ± 2	2,7 ± 1
Monocitos (%)	1,7 ± 1	1,3 ± 1	1,8 ± 1	1,2 ± 0
Plaquetas (mil/ $\mu$ L)	259,3 ± 85	248,2 ± 70	176,8 ± 47 (1)	199,0 ± 35 (1)
VCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	63,0 ± 4 (2)	63,0 ± 2	65,0 ± 3	64,2 ± 3 (1)
HCM (pg)	22,7 ± 2 (1)	22,5 ± 1	22,7 ± 2	22,5 ± 2 (1)
CHCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	36,3 ± 1	35,8 ± 2	35,0 ± 2	35,2 ± 2
Colesterol (mg/dL)	188,0 ± 84 (2)	202,0 ± 66	222,3 ± 67 (2)	204,0 ± 80 (1)
Triglicéridos (mg/dL)	33,2 ± 14 (3)*	45,8 ± 12 (2)	47,5 ± 11 (2)	51,5 ± 17 (2)
Creatinina (mg/dL)	0,80 ± 0,1	0,90 ± 0,3	1,08 ± 0,2 (1)	1,13 ± 0,5 (1)
Urea (mg/dL)	37,3 ± 5 (1)	36,0 ± 8 (1)	39,0 ± 7 (1)	35,8 ± 11 (1)
Amilasa (U/L)	487,8 ± 178	891,7 ± 482	852,8 ± 573	512,0 ± 265
GOT (U/L)	36,5 ± 12	41,8 ± 6	52,8 ± 12	58,7 ± 20
GPT (U/L)	89,2 ± 99 (1)*	65,2 ± 29 (1)	70,8 ± 30 (1)	64,0 ± 18
Proteínas (g/dL)	6,5 ± 1 (1)	6,8 ± 1 (1)	6,7 ± 1 (1)	7,4 ± 1 (2)
Albúmina (g/dL)	3,2 ± 1	3,3 ± 0	3,3 ± 0	3,5 ± 0
Globulinas (g/dL)	3,3 ± 2	3,5 ± 1	3,4 ± 1	3,9 ± 1
Albúmina/Globulinas	1,1 ± 1 (3)	1,0 ± 0 (2)	1,1 ± 0 (2)	0,9 ± 0 (2)
Calcio (mg/dL)	9,56 ± 1	9,3 ± 0	9,2 ± 1	9,3 ± 1
Fósforo (mg/dL)	5,4 ± 1 (3)	5,0 ± 1 (1)	4,3 ± 1	4,1 ± 1
Fosfatasa alcalina (U/L)	94,3 ± 109 (1)	77,5 ± 52 (1)	82,0 ± 25 (1)	57,5 ± 29 (1)
Glucosa (mg/dL)	92,7 ± 21	81,3 ± 11	58,2 ± 20	81,2 ± 16
Lipasa (U/L)	70,7 ± 23	78,5 ± 28	83,2 ± 44	160,0 ± 135
Bilirrubina total (mg/dL)	0,66 ± 0,5	0,74 ± 0,4	0,61 ± 0,2	0,65 ± 0,1
Bilirrubina directa	0,44 ± 0,3	0,49 ± 0,3	0,34 ± 0,1	0,41 ± 0,3

Tabla 31. Valores hematológicos y bioquímicos medios con su correspondiente desviación estándar de los perros durante el ensayo de tratamiento con Glucantime®. Entre paréntesis se indica el número de perros con dicho valor alterado con respecto al valor de referencia, excepto en el caso de albúmina y globulinas. El símbolo asterisco (\*) denota un valor medio alterado con respecto al valor de referencia.

En los perros tratados con el medicamento de referencia no se observan alteraciones hematológicas durante el tratamiento (días 60 y 120) o el seguimiento (día 210) aunque sí se observa una progresiva disminución en los valores relativos de neutrófilos segmentados y de plaquetas desde el día 0 hasta el 120, que mejora tras el seguimiento (día 210).

En los valores bioquímicos y enzimáticos se aprecia aumento de la enzima amilasa en uno de los perros por encima del límite (aunque el valor medio no superó el límite) en el día 120. Los valores medios de bilirrubina total y directa siempre se encontraron por encima del límite, pero el número de perros con este valor elevado aumentó durante el tratamiento (hasta el día 120) y disminuyó en su ausencia (día 210).

A la hora de analizar los resultados, es importante tener en cuenta el empeoramiento clínico de varios de los perros de este grupo, dado que algunas alteraciones hematológicas, bioquímicas o del estado general de los animales tendrían su causa en el empeoramiento de la enfermedad y no en el propio tratamiento.

**3.4. Evaluación del MTC-305 vehiculizado en nanopartículas de oro en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural**

**3.4.1. Evaluación de la eficacia del tratamiento**

Se encontró el parásito en médula ósea en 5 de los perros tratados con el compuesto MTC-305 en el análisis previo al tratamiento (tabla 32), por lo que se les pudo aplicar el criterio de eficacia 1, que todos ellos cumplieron al disminuir la carga parasitaria en médula ósea en más de un 50% en cada uno de ellos en el análisis después del tratamiento (día 120). En conjunto, la carga parasitaria en médula ósea disminuyó en un 86% en estos perros. Al perro restante se le aplicó el criterio de eficacia 2, el cuál cumplió al desaparecer la carga parasitaria en ganglio poplíteo y sangre en el análisis tras el tratamiento (día 120). En conjunto, en los 5 perros en los que se cuantificó el parásito en ganglio poplíteo, la carga parasitaria disminuyó en todos, con una media del 96%. En sangre, la parasitemia disminuyó en cinco de los seis perros, con una disminución media del 53%. La puntuación clínica disminuyó en 5 de los perros, en algunos de forma marcada. En pelo, la carga parasitaria disminuyó en dos perros mientras que en el restante, aumentó coincidiendo con el aumento en la parasitemia.

MTC-305	Criterio/ Eficacia	Carga Parasitaria								Puntuación Clínica	
		MO		G		S		P		Inicio	Fin
		Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin		
nº	0	120	0	120	0	120	0	120	0	120	
7	2 / Si	0	0	1,0	0	0,01	0	3,2	0	3	2
8	1 / Si	62,0	6,1	270,9	2,6	0,004	0,01	0,7	8,8	10	13
9	1 / Si	0,1	0	0	0	0,01	0	12,9	0	7	1
10	1 / Si	0,01	0,003	0,8	0	0,1	0,02	NR	NR	2	1
11	1 / Si	10,7	1,7	302,3	0,03	0,05	0,03	NR	NR	14	4
12	1 / Si	0,05	0	2,8	0,5	0,01	0,003	NR	NR	14	6

Tabla 32. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con MTC-305 en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

Aunque el compuesto fue eficaz, los títulos de anticuerpos IgG solo disminuyeron en dos de los perros en el análisis del día 120, aumentó en un perro (el único en el que la puntuación clínica aumentó) y permaneció igual en los demás. El título IgG1 se incrementó en dos de los animales (perros 10 y 11, en los que también aumentó el título IgG2 y disminuyó la expresión IFNG). El nivel de expresión de IFNG aumentó en dos de ellos pero disminuyó en los demás, mientras que el de IL4, muy bajo antes del tratamiento, disminuyó en cinco. En el perro 9 aumentaron los niveles de expresión de IFNG e IL4.

nº	MTC-305 Criterio/ Eficacia	Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFNG		IL4	
		Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120
7	2 / Si	40	40	0	0	0	80	27,9	1,2	0,4	0,03
8	1 / Si	640	1280	0	0	1280	1280	7,8	21,6	0,03	0,03
9	1 / Si	1280	1280	80	80	1280	1280	0,6	13,5	0,03	2,2
10	1 / Si	40	40	0	20	40	80	47,8	0,8	0,2	0,03
11	1 / Si	80	40	0	80	80	320	18,9	9,1	0,03	0,03
12	1 / Si	160	80	40	40	320	80	30,1	1,9	1,5	0,5

Tabla 33. Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con MTC-305 en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

## V. Resultados

En el análisis de seguimiento realizado 4 meses tras terminar el tratamiento (día 210), tres de los perros en los que el tratamiento fue eficaz de acuerdo al criterio de eficacia 1 sufrieron una recidiva (tabla 34), dos de ellos parcial y uno de ellos total. En todos ellos la carga parasitaria en ganglio también aumentó con respecto al análisis del día 120 y en dos de ellos la parasitemia también se elevó. El perro en el que el tratamiento fue eficaz de acuerdo al criterio 2 también sufrió una recidiva total al aumentar la carga parasitaria en ganglio poplíteo por encima del nivel inicial. La puntuación clínica aumentó ligeramente en los perros con respecto al análisis del día 120. El perro 8 sufrió un marcado empeoramiento de su condición clínica que coincidió con un aumento en las cargas parasitarias en médula ósea, ganglio poplíteo y sangre. En este perro el título IgG1 y los niveles de expresión IL4 e IFNG aumentaron también (tabla 35).

nº	MTC-305 Criterio/ Recidiva	Carga Parasitaria								Puntuación Clínica	
		MO		G		S		P		0	210
		0	210	0	210	0	210	0	210		
7	2 / T	0	0	1,0	1,5	0,01	0	3,2	0,3	3	2
8	1 / P	62,0	16,5	270,9	44,7	0,004	0,005	0,7	3,9	10	20
9	1 / No	0,1	0	0	0	0,01	0	12,9	0,2	7	2
10	1 / T	0,01	0,01	0,8	0,26	0,1	0	NR	NR	2	1
11	1 / No	10,7	0,1	302,3	0,1	0,05	0	NR	NR	14	4
12	1 / P	0,05	0,01	2,8	5,3	0,01	0,016	NR	NR	14	8

Tabla 34. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con MTC-305 en los días 0 (Inicio, antes del tratamiento) y 210 (Seg: seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (Parcial, P; Total, T; o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

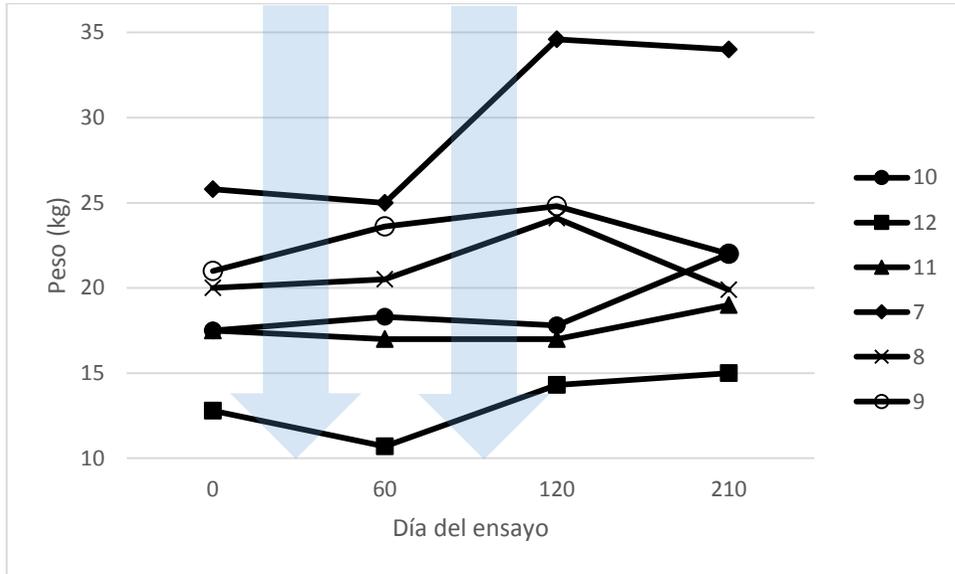
En los perros que no sufrieron recidiva (perros 9 y 11), los títulos IgG<sub>total</sub> e IgG2 aumentaron mientras que el título IgG1 aumentó o disminuyó, disminuyendo o aumentando la expresión de IFNG respectivamente; la expresión de IL4 aumentó ligeramente en ambos. En los dos animales se produjo así un incremento de ambos tipos de respuesta, Th1 y Th2. En los perros en los que se produjeron recidivas, o bien la respuesta inmunitaria se inclinó hacia Th2 (perro 7), o hacia Th1 (perro 10) o claramente mixta, con activación de ambos tipos de respuesta (perros 8, 9 y 11). En el caso del perro 12, se observa una inhibición de ambas respuestas.

MTC-305	Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas				
	Criterio/ nº Recidiva	IgG		IgG1		IgG2		IFNG		IL4	
		Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210	Inicio 0	Seg 210
<b>7</b>	2 / T	40	40	0	0	0	40	27,9	0,1	0,4	1,8
<b>8</b>	1 / P	640	1280	0	40	1280	1280	7,8	17,8	0,03	0,3
<b>9</b>	1 / No	1280	1280	80	40	1280	1280	0,6	3,9	0,03	1,5
<b>10</b>	1 / T	40	40	0	0	40	40	47,8	78,2	0,2	0,2
<b>11</b>	1 / No	80	1280	0	80	80	1280	18,9	9,9	0,03	0,1
<b>12</b>	1 / P	160	160	40	0	320	320	30,1	1,8	1,5	0,03

**Tabla 35.** Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con MTC-305 en los días 0 (Inicio, antes del tratamiento) y 210 (Seg: seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La columna nº hace referencia al perro. El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (Parcial, P; Total, T; o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

### 3.4.2. Evaluación de la seguridad del tratamiento

#### Peso y aspecto general



**Gráfico 31. Evolución del peso en kilogramos de los seis animales durante el tratamiento con MTC-305. Las flechas indican las series de tratamiento**

Como se observa en el gráfico 31, los perros tratados con MTC-305 apenas pierden peso durante el ensayo. Solo uno de los perros (perro 12) registró una pérdida de peso superior al 5% tras la primera serie de tratamiento (día 60), peso que recuperó en el análisis del día 120. Las mayores pérdidas de peso se dan en el análisis de seguimiento (día 210) en los perros 7, 8 y 9.

Estos datos indican que el tratamiento con MTC-305 no fue perjudicial al menos en lo que se refiere a masa corporal y estado general.

#### Alteraciones gastrointestinales

El tratamiento con MTC-305 no provocó alteraciones como vómitos o diarrea. Sólo uno de los perros vomitó (perro 10) un día de forma aislada durante el periodo de descanso entre tratamientos.

## Alteraciones hematológicas y bioquímicas

Parámetro	Día 0	Día 60	Día 120	Día 210
Hemoglobina (g/dL)	14,7 ± 2	14,8 ± 3 (1)	15,0 ± 2 (1)	16,1 ± 3 (1)
Eritrocitos (millón/μL)	6,5 ± 1	6,6 ± 1 (1)	6,7 ± 1 (1)	7,1 ± 1
Hematocrito (%)	41,7 ± 7 (1)	41,8 ± 8 (1)	43,3 ± 6 (1)	44,8 ± 9 (1)
Leucocitos (mil/μL)	7,9 ± 3 (1)	8,2 ± 5 (2)	10,3 ± 4	11,4 ± 4
Neutrófilos cayados (%)	1,0 ± 1	1,2 ± 1	1,2 ± 1	0,3 ± 1
Neutrófilos cayados	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,0 ± 0
Neutrófilos segmentados	72,7 ± 10 (2)	65,0 ± 9 (2)	56,5 ± 22 (3)	64,0 ± 10 (2)
N. segmentados (mil/μL)	5,9 ± 3 (1)	5,1 ± 3 (1)	5,4 ± 2	7,2 ± 3
Eosinófilos (%)	5,5 ± 3 (1)	3,4 ± 2 (1)	4,5 ± 4 (1)	5,0 ± 5 (1)
Basófilos (%)	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
Linfocitos (%)	18,8 ± 9 (2)	28,6 ± 10	36,5 ± 22 (1)	29,2 ± 8
Linfocitos (mil/μL)	1,3 ± 1 (3)	2,6 ± 2 (1)	4,3 ± 4 (1)	3,4 ± 2 (1)
Monocitos (%)	2,0 ± 1	1,8 ± 1	1,3 ± 1	1,5 ± 1
Plaquetas (mil/μL)	144,2 ± 69 (3)	235,4 ± 82	244,8 ± 96 (1)	248,5 ± 61
VCM (μm <sup>3</sup> )	64,2 ± 1	63,8 ± 2	64,2 ± 3 (1)	63,0 ± 4 (1)
HCM (pg)	22,5 ± 1	22,4 ± 1	22,5 ± 2	24,5 ± 3
CHCM (μm <sup>3</sup> )	35,2 ± 1	35,4 ± 1	34,7 ± 1	36,0 ± 1
Colesterol (mg/dL)	181,7 ± 38	228,8 ± 81	256,0 ± 128	231,5 ± 74 (1)
Triglicéridos (mg/dL)	43,7 ± 18 (2)	58,8 ± 21	74,0 ± 27	82,5 ± 31
Creatinina (mg/dL)	0,68 ± 0,2	1,06 ± 0,3	1,17 ± 0,4	1,10 ± 0,4
Urea (mg/dL)	33,3 ± 7 (1)	42,0 ± 11 (2)	45,2 ± 16 (2) *	40,2 ± 9 (2)
Amilasa (U/L)	530,0 ± 98	919,8 ± 201	948,5 ± 234	514,2 ± 91
GOT (U/L)	35,5 ± 11	54,2 ± 28 (1)	60,7 ± 24 (1)	54,7 ± 22 (1)
GPT (U/L)	42,3 ± 13	48,2 ± 16	61,7 ± 30 (1)	60,8 ± 24
Proteínas (g/dL)	6,2 ± 0	6,6 ± 1	7,0 ± 1 (1)	7,2 ± 1
Albúmina (g/dL)	3,0 ± 0	3,0 ± 0	3,1 ± 1	3,2 ± 1
Globulinas (g/dL)	3,2 ± 1	3,6 ± 1	3,9 ± 1	4,0 ± 1
Albúmina/Globulinas	0,98 ± 0,2 (2)	0,92 ± 0,4 (2)	0,86 ± 0,4 (3)	0,86 ± 0,3 (3)
Calcio (mg/dL)	9,6 ± 0	8,8 ± 0	9,5 ± 1	9,4 ± 1
Fósforo (mg/dL)	5,7 ± 1 (2)	4,8 ± 1 (1)	5,0 ± 1 (1)	4,3 ± 1
Fosfatasa alcalina (U/L)	78,0 ± 65 (1)	90,8 ± 36 (1)	127,8 ± 57 (2)	82,3 ± 72 (1)
Glucosa (mg/dL)	91,0 ± 15	83,5 ± 11	58,0 ± 21	83,0 ± 13
Lipasa (U/L)	89,2 ± 52	81,0 ± 47	162,3 ± 231	79,3 ± 31
Bilirrubina total (mg/dL)	0,62 ± 0,3 (4)	0,35 ± 0,1	0,59 ± 0,3 (1)	0,70 ± 0,4 (2)
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,44 ± 0,2 (4)	0,20 ± 0,1 (1)	0,29 ± 0,2 (2)	0,44 ± 0,3 (2)

Tabla 36. Valores hematológicos y bioquímicos medios con su correspondiente desviación estándar de los perros durante el ensayo de tratamiento con MTC-305. Entre paréntesis se indica el número de perros con dicho valor alterado con respecto al valor de referencia, excepto en el caso de albúmina y globulinas. El símbolo asterisco (\*) denota un valor medio alterado con respecto al valor de referencia.

## V. Resultados

Como en el caso del antimonio de meglumina, los perros sufrieron un descenso en el valor relativo de neutrófilos segmentados, disminuyendo por debajo del límite tras el tratamiento (día 120) y recuperándose después del seguimiento (día 210). Ésta fue la única alteración hematológica en los perros tratados con el compuesto.

También el valor de amilasa pancreática aumentó aunque en ningún perro superó el límite; sin embargo uno de los perros sí mostró un nivel de lipasa superior al límite. En el caso de la urea, su valor sí superó el límite de la normalidad durante el tratamiento (día 120) en dos perros, aumentando el valor medio de todos los perros ligeramente por encima del límite. El valor de fosfatasa alcalina medio también aumentó sobre el límite por su alteración en dos de los animales, de los cuales uno volvió a valores normales y el otro no, aunque este último ya mostraba dicha alteración antes de iniciar el tratamiento. Por otro lado, el nivel de bilirrubina total y directa disminuyó durante el tratamiento.

### 3.5. Evaluación del tratamiento con una combinación de antimonio de meglumina (Glucantime®) y MTC-305 en la leishmaniosis canina adquirida de forma natural

#### 3.5.1. Evaluación de la eficacia del tratamiento

En el análisis previo al tratamiento (día 0), de los 6 perros tratados con la combinación de MTC-305 y Glucantime® (perros 13-18), se encontró al parásito en médula ósea en 4 de ellos (tabla 37), aplicándoseles el criterio de eficacia 1, que cumplieron los cuatro perros al disminuir la carga parasitaria en médula ósea en más de un 99% en todos ellos en el análisis del día 120. En estos perros la carga parasitaria en ganglio, pelo y sangre también se redujo tras el tratamiento (día 120).

A los dos perros restantes se les aplicó el criterio de eficacia 2, criterio que cumplió un perro al disminuir la carga parasitaria en ganglio y sangre en un 99% y 90% respectivamente. También disminuyó la carga parasitaria en pelo. El perro en el que el tratamiento no fue eficaz (perro 14), las cargas parasitarias en ganglio y sangre aumentaron y se detectó el parásito en pelo. En contraste, su estado clínico mejoró ligeramente. En los perros en los que el tratamiento se consideró eficaz, las cargas parasitarias en médula ósea y ganglio se redujeron en casi un 100%, la parasitemia disminuyó en más de un 80% y la carga parasitaria en pelo disminuyó asimismo. La puntuación clínica disminuyó moderadamente en todos los animales y marcadamente en uno de ellos.

Combinación Perro nº	Criterio/ Eficacia	Carga Parasitaria						Puntuación Clínica			
		MO		G		S		P		Clínica	
		Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120
13	1 / Si	172,1	0	409,1	0	0,004	0	71,7	0	23	4
14	2 / No	0	0	0	0,18	0,001	0,001	0	0,1	4	2
15	2 / Si	0	0	10,0	0,2	0,003	0,002	10,4	5,2	4	3
16	1 / Si	0,001	0	2,0	0,02	0,1	0,01	NR	NR	2	1
17	1 / Si	0,02	0,003	4,2	0	0,05	0	NR	NR	4	0
18	1 / Si	0,02	0	0	0	0,07	0,02	NR	NR	2	0

Tabla 37. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con una combinación de MTC-305 y antimonio de meglumina en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

## V. Resultados

Entre los perros en los que se consideró el tratamiento eficaz, solo se observa una marcada tendencia hacia una respuesta Th1 en el perro 13 (tabla 38), en el que disminuye el título IgG1 y aumenta la expresión de IFNG marcadamente. En este perro, las cargas parasitarias eran muy elevadas el día 0 y desaparecieron completamente el día 120 (tabla 37). En el perro 16, la reducción de la expresión de IFNG es muy marcada. En los demás la evolución es más diversa, con ligeros aumentos o descensos de los títulos IgG1, IgG2 y de la expresión de IFNG e IL4. En el perro 18, ambas respuestas Th1 y Th2 parecen inhibidas el día 120.

En el perro donde el tratamiento no fue eficaz (perro 14), aumentó el título IgG1 y disminuyó el de IgG2 a la vez que aumentó la producción de IFNG y disminuyó la de IL4.

Combinación Perro		Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFN		IL4	
nº	Criterio/ Eficacia	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin
		0	120	0	120	0	120	0	120	0	120
13	1 / Si	1280	1280	640	80	1280	1280	0,7	7,6	0,3	0,5
14	2 / No	160	80	20	40	320	80	0,9	1,3	1,3	0,03
15	2 / Si	80	0	0	0	20	0	0,6	1,2	0,03	0,03
16	1 / Si	160	40	0	0	80	40	59,7	1,7	0,4	0,4
17	1 / Si	160	80	20	40	320	40	0,1	1,7	1,1	0,2
18	1 / Si	160	20	20	0	40	0	2,0	1,8	1,4	0,03

Tabla 38. Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con una combinación de MTC-305 y antimonioato de meglumina en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

De los perros donde se consideró el tratamiento como eficaz según el primer criterio, se produjeron recurrencias en la carga parasitaria en médula ósea en tres de ellos en el análisis realizado 4 meses tras el final del tratamiento (día 210), como muestra la tabla 39, una de ellas parcial (acompañada de un aumento en la carga parasitaria en ganglio) y las otras total (perros 16 y 18), en la que la carga parasitaria en ganglio aumentó en uno de los perros. El perro 15, en el que el tratamiento fue eficaz de acuerdo al segundo criterio no sufrió recidiva en ninguno de los tejidos con respecto al análisis del día 120.

Combinación	Perro	Carga Parasitaria								Puntuación	
		MO		G		S		P		Clínica	
		Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg
nº	Criterio/ Recidiva	0	210	0	210	0	210	0	210	0	120
13	1 / P	172,1	0,1	409,1	16,9	0,004	0	71,7	0,1	23	5
14	2	0	0	0	0,6	0,001	0	0	0	4	2
15	2 / No	0	0	10,0	0,02	0,003	0	10,4	0	4	3
16	1 / T	0,001	0,007	2,0	5,1	0,1	0,1	NR	NR	2	1
17	1 / No	0,02	0,002	4,2	0	0,05	0,01	NR	NR	4	1
18	1 / T	0,02	0,06	0	0	0,07	0,01	NR	NR	2	0

**Tabla 39.** Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con una combinación de MTC-305 y antimonio de meglumina en los días 0 (antes del tratamiento) y 210 (Seg: seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (Parcial, P; Total, T; o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

## V. Resultados

Como muestra la tabla 40, en los perros que sufrieron una recidiva en el análisis del día 210, las respuestas inmunológicas fueron dispares: en el perro 13 la respuesta Th1 y Th2 están aumentadas, especialmente la primera; sin embargo, el perro 18 muestra una disminución de ambos tipos de respuesta. En el perro 16 se produce una activación de la respuesta Th2 y reducción de la Th1.

En los perros en los que no se produce recidiva (15 y 17), no hay un incremento de la respuesta Th1 ni de la Th2.

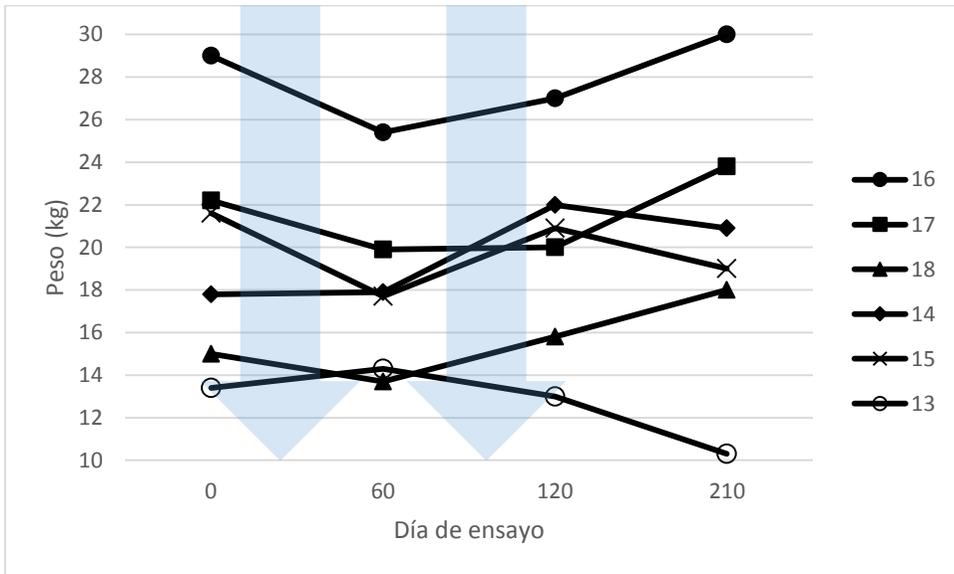
Por último, en el perro en el que el tratamiento no se consideró eficaz (perro 14) en el día 120, la carga parasitaria en ganglio aumentó nuevamente en el día 210, sin embargo en este último análisis la respuesta inmunológica parece inclinarse hacia Th1, con aumento considerable de la expresión de IFNG, conservación del título IgG2 y bajos niveles de IL4 e IgG1.

Combinación Perro	Criterio/ Recidiva	Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFN		IL4	
		Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg
nº		0	210	0	210	0	210	0	210	0	210
13	1 / P	1280	1280	640	320	1280	1280	0,7	4,7	0,3	0,7
14	2	160	80	20	40	320	320	0,9	5,3	1,3	0,03
15	2 / No	80	0	0	0	20	0	0,6	0,1	0,03	0,03
16	1 / T	160	80	0	0	80	80	59,7	19,7	0,4	1,8
17	1 / No	160	40	20	0	320	80	0,1	0,1	1,1	0,1
18	1 / T	160	20	20	0	40	0	2,0	0,3	1,4	0,03

Tabla 40. Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con una combinación de MTC-305 y antimonioato de meglumina en los días 0 (antes del tratamiento) y 210 (Seg: seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La columna nº hace referencia al perro. El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (Parcial, P; Total, T; o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

### 3.5.2. Evaluación de la seguridad del tratamiento

#### Peso y aspecto general



**Gráfico 32. Evolución del peso en kilogramos de los seis animales durante el tratamiento con una combinación de MTC-305 y Glucantime®. Las flechas indican las series de tratamiento**

Como se observa en el gráfico 32, cuatro de los perros tratados con la combinación sufrieron un descenso de la masa corporal de más del 5% tras la primera serie de tratamiento, pero tres de ellos se recuperaron. En el análisis al final del seguimiento dos de los perros superaban el umbral de pérdida de peso (5%), aunque en el caso de uno se debía al empeoramiento de la enfermedad, mientras que los otros cuatro tenían mayor peso que al inicio del ensayo.

Estos datos indican que el tratamiento con MTC-305 y Glucantime® fue más agresivo que el MTC-305 en monoterapia a pesar de que la dosis era inferior, especialmente al principio.

#### Alteraciones gastrointestinales

Ninguno de los perros tratados con la combinación tuvo episodios de vómitos a diarrea.

**Alteraciones hematológicas y bioquímicas**

Parámetro	Día 0	Día 60	Día 120	Día 210
Hemoglobina (g/dL)	14,9 ± 2	15,9 ± 2	15,5 ± 2	15,8 ± 2
Eritrocitos (millón/ $\mu$ L)	6,6 ± 1 (1)	7,1 ± 1	6,8 ± 1	7,0 ± 1
Hematocrito (%)	41,7 ± 5 (1)	45,2 ± 6	43,7 ± 6	45,0 ± 6
Leucocitos (mil/ $\mu$ L)	9,5 ± 4	9,3 ± 2	9,4 ± 2	10,2 ± 2
Neutrófilos cayados (%)	0,8 ± 0	0,5 ± 1	1,5 ± 1	0,7 ± 1
Neutrófilos cayados (mil/ $\mu$ L)	0,1 ± 0	0,0 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0
Neutrófilos segmentados	71,3 ± 10	80,3 ± 6	61,8 ± 6 (1)	66,5 ± 13 (2)
N. segmentados (mil/ $\mu$ L)	6,6 ± 2	7,5 ± 2	5,9 ± 2	6,6 ± 1
Eosinófilos (%)	4,0 ± 3 (2)	3,2 ± 3 (2)	3,5 ± 2 (2)	3,2 ± 2 (2)
Basófilos (%)	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
Linfocitos (%)	22,2 ± 9 (1)	14,3 ± 7 (2)	32,3 ± 9	27,8 ± 13
Linfocitos (mil/ $\mu$ L)	2,3 ± 2 (2)	1,3 ± 1 (3)	3,0 ± 1	3,0 ± 2
Monocitos (%)	1,7 ± 1	1,7 ± 1	1,2 ± 0	1,8 ± 1
Plaquetas (mil/ $\mu$ L)	255,7 ± 53 (1)	285,5 ± 76	202,7 ± 105	237,0 ± 123
VCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	63,0 ± 3	63,5 ± 4	64,8 ± 3	64,3 ± 4
HCM (pg)	22,5 ± 2	22,2 ± 2	23,3 ± 2	22,5 ± 2
CHCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	35,8 ± 1	35,2 ± 1	35,5 ± 2	35,2 ± 1
Colesterol (mg/dL)	188,8 ± 27	214,8 ± 33	245,7 ± 64	233,8 ± 50
Triglicéridos (mg/dL)	35,8 ± 8 (5)	49,3 ± 11 (1)	54,0 ± 14	70,0 ± 12
Creatinina (mg/dL)	0,95 ± 0,3	1,00 ± 0,5	1,20 ± 0,3	1,12 ± 0,5
Urea (mg/dL)	47,7 ± 26 (3) *	44,5 ± 26 (1)	48,8 ± 22 (2) *	46,5 ± 14 (2) *
Amilasa (U/L)	528,8 ± 259	1.137,8 ± 916	828,0 ± 334	476,8 ± 205
GOT (U/L)	35,8 ± 22	55,3 ± 8	46,3 ± 21	53,5 ± 23
GPT (U/L)	33,2 ± 7	48,7 ± 10	42,2 ± 14	50,8 ± 9
Proteínas (g/dL)	6,1 ± 1	6,2 ± 0	6,2 ± 1	7,1 ± 1
Albúmina (g/dL)	3,3 ± 0	3,1 ± 0	3,1 ± 0	3,4 ± 1
Globulinas (g/dL)	2,9 ± 1	3,1 ± 0	3,1 ± 1	3,6 ± 1
Albúmina/Globulinas	1,29 ± 0,5 (1)	1,00 ± 0,1	1,18 ± 0,4	0,97 ± 0,2 (1)
Calcio (mg/dL)	9,5 ± 0	9,3 ± 1	9,3 ± 1	9,1 ± 0
Fósforo (mg/dL)	5,0 ± 1 (1)	4,4 ± 1	3,6 ± 0	3,8 ± 1
Fosfatasa alcalina (U/L)	67,5 ± 23	83,2 ± 24	79,5 ± 30 (1)	51,0 ± 30
Glucosa (mg/dL)	82,5 ± 15	67,2 ± 13 (2)	54,3 ± 16 (4)	78,7 ± 11
Lipasa (U/L)	92,7 ± 105	85,3 ± 86	75,7 ± 61	86,7 ± 70
Bilirrubina total (mg/dL)	0,50 ± 0,2 (1)	0,80 ± 0,6 (2)	0,47 ± 0,2 (2)	1,04 ± 1,0 (3)
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,37 ± 0,2 (3)	0,50 ± 0,4 (3)	0,32 ± 0,2 (2)	0,82 ± 1,0 (3)

Tabla 41. Valores hematológicos y bioquímicos medios con su correspondiente desviación estándar de los perros durante el ensayo de tratamiento con una combinación de MTC-305 y Glucantime®. Entre paréntesis se indica el número de perros con dicho valor alterado con respecto al valor de referencia, excepto en el caso de albúmina y globulinas. El símbolo asterisco (\*) denota un valor medio alterado con respecto al valor de referencia.

El uso combinado de ambos compuestos no causó alteraciones hematológicas durante el tratamiento. Se produjo un aumento en los niveles séricos de urea, que ya estaban elevados antes del tratamiento, y también aumentó el nivel de amilasa pero sin superar los valores normales. Con respecto a la bilirrubina, aumentaron temporalmente los niveles de bilirrubina total y directa.

### 3.6. Evaluación del (-)- $\alpha$ -bisabolol administrado por vía oral en el tratamiento de la leishmaniosis canina adquirida de forma natural

#### 3.6.1. Evaluación de la eficacia del tratamiento

Cuatro perros (perros 19-22) fueron tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol. En el análisis previo al tratamiento (día 0), en tres de los cuatro perros tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol se encontró el parásito en médula ósea, por lo que se les aplicó el criterio de eficacia 1, como muestra la tabla 42. El tratamiento fue considerado eficaz en dos de ellos al disminuir la carga parasitaria en médula ósea en un 73% y un 100% respectivamente, descendiendo también en sangre y ganglio; mientras que en el otro perro las cargas parasitarias en médula y ganglio poplíteo aumentaron en el análisis del día 120. En el perro en el que no se encontró el parásito en médula ósea, se aplicó el criterio 2 que cumplió al desaparecer el parásito de ganglio poplíteo y sangre en el análisis realizado un mes después de terminar el tratamiento. El estado clínico mejoró en todos los perros, especialmente en los que el tratamiento fue eficaz.

(-)- $\alpha$ -bisabolol		Carga Parasitaria								Puntuación	
Perro		MO		G		S		P		Clínica	
nº	Criterio/ Eficacia	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin	Inicio	Fin
		0	120	0	120	0	120	0	120	0	120
19	1 / No	4,8	4,8	14,9	109	0,001	0	0	0	9	8
20	1 / Si	6,3	1,7	113,9	36,1	0,002	0	7,8	3,7	25	20
21	1 / Si	1,5	0	47,1	37,5	0,002	0,001	0,1	0	11	8
22	1 / Si	0	0	85,2	0	0,1	0	0,5	0	6	2

Tabla 42. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

Como muestra la tabla 43, los títulos de anticuerpos apenas variaron entre los dos análisis. El perro en el que el tratamiento no fue considerado eficaz (perro 19), se elevó el título de IgG1 mientras que el nivel de expresión IFNG aumentó considerablemente.

En el perro 20, en el que el tratamiento fue eficaz, se da la situación contraria y se produce una reducción de ambas respuestas inmunes Th1 y Th2, disminuyendo el título IgG1 y disminuyendo la expresión IFNG y de IL4. En los otros dos perros en los que el tratamiento se consideró eficaz, los títulos de anticuerpos no variaron, pero si aumentaron los niveles de expresión IFNG e IL4, mostrando así una activación de ambos tipos de respuesta inmune Th1 y Th2.

(-)- $\alpha$ -bisabolol		Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFN		IL4	
Perro	Criterio/ Eficacia	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120	Inicio 0	Fin 120
19	1 / No	1280	1280	80	160	1280	1280	0,9	21,9	0,02	0,02
20	1 / Si	1280	1280	640	320	1280	1280	21,4	1,1	0,5	0,03
21	1 / Si	160	320	0	0	640	640	2,3	4,6	0,31	1,66
22	2 / Si	40	40	0	0	40	40	0,4	1,2	0,003	0,1

Tabla 43. Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol en los días 0 (antes del tratamiento) y 120 (un mes después del final del tratamiento). El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Eficacia hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a su cumplimiento o no.

## V. Resultados

En la siguiente tabla se muestra la comparación entre el análisis inicial (día 0) y el análisis al final del periodo de seguimiento (día 210). En el perro donde el tratamiento no fue eficaz las cargas parasitarias aumentaron en todos los tejidos mientras que en los demás perros disminuyeron, por lo que no se consideró ninguna recidiva (tabla 44). No se pudo realizar el análisis de seguimiento del perro 20 debido a que fue retirado del estudio por causas ajenas al mismo. El perro 22 siguió siendo negativo en médula ósea, ganglio y sangre y sólo se detectó ADN de *L. infantum* en pelo.

(-)- $\alpha$ -bisabolol		Carga Parasitaria								Puntuación	
		MO		G		S		P		Clínica	
		Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg
nº	Criterio/Recidiva	0	210	0	210	0	210	0	210	0	210
19	1	4,8	97,9	14,9	60,0	0,001	0,01	0	2,1	9	8
21	1 / No	1,5	0	47,1	2,2	0,002	0,001	0,1	2,8	11	6
22	2 / No	0	0	85,2	0	0,1	0	0,5	0,2	6	3

Tabla 44. Cargas parasitarias y puntuación clínica de los perros tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol en los días 0 (antes del tratamiento) y 210 (seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La tabla muestra las cargas parasitarias en médula ósea (MO) y sangre periférica (S) en Parásitos/ $\mu$ L, ganglio poplíteo (G) en Parásitos/ $\mu$ g de ADN y pelo (P) en Parásitos/pelo. La columna nº hace referencia al perro. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (Parcial, P; Total, T; o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210. Los resultados del perro 20 en el análisis del día 210 no se realizaron.

Como se observa en la tabla 45, los títulos de anticuerpos apenas variaron durante el periodo de seguimiento. En el perro 19, disminuyó la expresión de IFNG y aumentó IL4, mostrando por tanto una tendencia hacia una respuesta Th2.

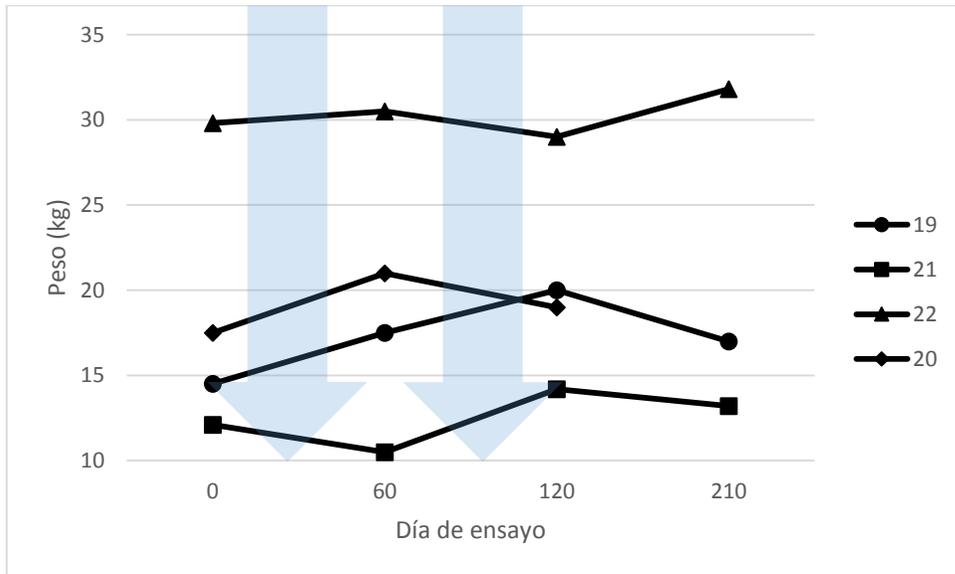
En los otros dos perros, aumentó marcadamente la expresión de IFNG (respuesta Th1) y disminuyó (perro 21) o aumentó (perro 22) la de IL4. Así, el perro 22 parece tener activadas ambos tipos de respuesta inmune.

(-)- $\alpha$ -bisabolol		Título de Anticuerpos						Expresión de citoquinas			
		IgG		IgG1		IgG2		IFN		IL4	
nº	Criterio/ Recidiva	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg	Inicio	Seg
		0	210	0	210	0	210	0	210	0	210
19	1	1280	1280	80	160	1280	1280	0,9	0,1	0,02	0,03
21	1	160	160	0	0	640	640	2,3	12,9	0,31	0,16
22	2	40	40	0	0	40	40	0,4	29,7	0,03	0,9

Tabla 45. Títulos de anticuerpos y niveles de expresión relativos de interferón- $\gamma$  (IFNG) e interleuquina 4 (IL4) en los perros tratados con (-)- $\alpha$ -bisabolol en los días 0 (antes del tratamiento) y 210 (seguimiento, cuatro meses tras el final del tratamiento). La columna nº hace referencia al perro. El título de anticuerpos de valor "0" se refiere a un título menor a 20. La columna Criterio/Recidiva hace referencia al criterio de eficacia utilizado (1 ó 2) y a la aparición de recidivas en este análisis (Parcial, P; Total, T; o no) en el caso de que el tratamiento fuese eficaz en ese perro en el día 210.

### 3.6.2. Evaluación de la seguridad del tratamiento

#### Peso y aspecto general



**Gráfico 33. Evolución del peso de los animales durante el ensayo de tratamiento con (-)-α-bisabolol**

Como se observa en el gráfico 33, los perros tratados con (-)-α-bisabolol apenas pierden peso durante el ensayo, un solo perro sufrió un descenso de peso superior al 5% tras la primera serie de tratamiento que recuperó inmediatamente.

#### Alteraciones gastrointestinales

El tratamiento con (-)-α-bisabolol tampoco resultó tóxico en este sentido y ningún perro sufrió alteraciones gastrointestinales de ningún tipo.

**Alteraciones hematológicas y bioquímicas**

Parámetro	Día 0	Día 60	Día 120	Día 210
Hemoglobina (g/dL)	15,9 ± 5 (1)	15,4 ± 4 (1)	15,2 ± 4 (1)	16,8 ± 1
Eritrocitos (millón/ $\mu$ L)	7,2 ± 2 (1)	7,2 ± 2 (1)	7,2 ± 2 (1)	7,6 ± 0
Hematocrito (%)	44,8 ± 13 (1)	44,5 ± 13 (1)	43,8 ± 13 (1)	48,0 ± 2
Leucocitos (mil/ $\mu$ L)	10,9 ± 4	8,3 ± 3	9,5 ± 2	11,1 ± 2
Neutrófilos cayados (%)	1,8 ± 1	0,8 ± 1	1,3 ± 1	0,7 ± 1
Neutrófilos cayados	0,2 ± 0 (1)	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Neutrófilos segmentados	71,8 ± 11 (1)	72,5 ± 3	67,5 ± 3	61,3 ± 4 (1)
N. segmentados (mil/ $\mu$ L)	7,7 ± 3	6,0 ± 2	6,4 ± 1	6,8 ± 1
Eosinófilos (%)	5,8 ± 8 (3)	5,8 ± 3 (1)	3,8 ± 4 (1)	7,3 ± 3
Basófilos (%)	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0	0,0 ± 0
Linfocitos (%)	19,0 ± 11 (2)	19,3 ± 6	25,5 ± 6 (1)	28,7 ± 3 (1)
Linfocitos (mil/ $\mu$ L)	1,9 ± 1 (1)	1,7 ± 1 (1)	2,4 ± 1	3,1 ± 0
Monocitos (%)	1,8 ± 1	1,8 ± 1	2,0 ± 0	2,0 ± 1
Plaquetas (mil/ $\mu$ L)	432,3 ± 285	252,8 ± 106	218,0 ± 84	212,7 ± 21
VCM ( $\mu$ m3)	62,3 ± 3 (1)	61,8 ± 3 (1)	60,5 ± 5 (1)	63,3 ± 1
HCM (pg)	22,0 ± 1	21,3 ± 1	21,3 ± 2	22,3 ± 1
CHCM ( $\mu$ m3)	35,8 ± 1	34,5 ± 1	35,0 ± 1	34,7 ± 1
Colesterol (mg/dL)	181,8 ± 50 (1)	214,8 ± 59	238,5 ± 59 (1)	201,7 ± 55
Triglicéridos (mg/dL)	35,0 ± 10 (3)	53,5 ± 12	67,3 ± 21	51,0 ± 14 (1)
Creatinina (mg/dL)	0,88 ± 0,2	1,13 ± 0,5	1,45 ± 0,6 (1)	1,47 ± 0,4
Urea (mg/dL)	38,5 ± 10 (1)	47,8 ± 15 (1)	52,3 ± 23 (3)	52,7 ± 20 (2)
Amilasa (U/L)	782,8 ± 689	1.419,5 ± 227	1.043,5 ± 373	460,0 ± 143
GOT (U/L)	52,5 ± 19	65,8 ± 19 (1)	75,0 ± 9	83,7 ± 13 (1)
GPT (U/L)	53,8 ± 21	61,8 ± 28	71,8 ± 33 (1)	67,7 ± 32 (1)
Proteínas (g/dL)	6,9 ± 1 (1)	7,9 ± 1 (1) *	8,4 ± 1 (1) *	7,8 ± 1 (1) *
Albúmina (g/dL)	3,3 ± 0	3,3 ± 0	3,2 ± 1	3,2 ± 0
Globulinas (g/dL)	3,7 ± 2	4,6 ± 1	5,1 ± 2	4,6 ± 1
Albúmina/Globulinas	1,01 ± 0,4 (1)	0,76 ± 0,2 (1)	0,70 ± 0,3 (2)	0,70 ± 0,1 (1)
Calcio (mg/dL)	9,3 ± 0	9,4 ± 0	9,2 ± 0	9,8 ± 0
Fósforo (mg/dL)	4,4 ± 1	4,3 ± 0	3,9 ± 1	2,9 ± 1
Fosfatasa alcalina (U/L)	62,5 ± 27	84,3 ± 32	128,5 ± 80 (1)	60,3 ± 41
Glucosa (mg/dL)	85,0 ± 10	58,0 ± 38 (2)	44,8 ± 31 (3)	71,0 ± 2
Lipasa (U/L)	79,3 ± 13	83,3 ± 23	85,3 ± 24	95,0 ± 26
Bilirrubina total (mg/dL)	0,63 ± 0,2 (1)	0,61 ± 0,3 (2)	0,61 ± 0,6 (1)	0,30 ± 0,0
Bilirrubina directa	0,36 ± 0,1 (1)	0,32 ± 0,2 (2)	0,34 ± 0,4 (4)	0,10 ± 0,0

Tabla 46. Valores hematológicos y bioquímicos medios con su correspondiente desviación estándar de los perros durante el ensayo de tratamiento con (-)- $\alpha$ -bisabolol. Entre paréntesis se indica el número de perros con dicho valor alterado con respecto al valor de referencia, excepto en el caso de albúmina y globulinas. El símbolo asterisco (\*) denota un valor medio alterado con respecto al valor de referencia.

## V. Resultados

El tratamiento con este producto natural no alteró ningún valor hematológico. Con respecto a los análisis bioquímicos, los perros sufrieron un aumento de urea en sangre ligeramente por encima del límite considerado normal, evidenciando tanto en los días 60 como 120, y la amilasa aumentó especialmente tras la primera serie, rozando el límite de la normalidad. El valor medio de fosfatasa alcalina también superó el límite ligeramente, volviendo a la normalidad tras el seguimiento. Sin embargo, los valores de bilirrubina total y directa no aumentaron durante el tratamiento.

#### 4. Estudio de las enzimas histona desacetilasa de *L. mexicana*

Este estudio se orientó al análisis bioinformático de los genes codificantes para las proteínas histona desacetilasa, tanto NAD<sup>+</sup> dependientes (sirtuinas o Sir2 RP, related protein)) como zinc dependientes (DAC). Una vez realizado, se estudió la localización subcelular de dichas enzimas mediante creación de proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente, consiguiendo resultados para dos de las proteínas.

##### 4.1. Análisis Bioinformático

Se encontraron proteínas ortólogas en *L. mexicana* para cada una de las proteínas buscadas, cuyas características se muestran en la tabla 47. En todos los casos el valor E fue inferior a 10<sup>-20</sup> lo que es indicativo de analogía. Dos de los genes no mostraron sintenia (co-localización preservada del gen en el mismo cromosoma de diversas especies) con respecto a los genes originales de *T. brucei*.

Proteína	Nº acceso TriTrypDB	Homología (E-valor)	Sintenia	Peso molecular
<b>DAC 1</b>	LmxM.21.0680	0	Sí	49,7
<b>DAC 2</b>	LmxM.24.1370	10 <sup>-25</sup>	No	58,6
<b>DAC 3</b>	LmxM.21.1870	10 <sup>-157</sup>	No	66,7
<b>DAC 4</b>	LmxM.08.1090	10 <sup>-191</sup>	Sí	65,5
<b>Sir2 RP1</b>	LmxM.26.0210	0	Sí	40,5
<b>Sir2 RP2</b>	LmxM.23.1210	10 <sup>-111</sup>	Sí	35,0
<b>Sir2 RP3</b>	LmxM.33.2140	10 <sup>-100</sup>	Sí	26,9

Tabla 47. Genes ortólogos en *L. mexicana* para las proteínas buscadas.

##### 4.2. Localización subcelular

Se consiguieron líneas mutantes de *L. mexicana* con una proteína de fusión fluorescente para las siguientes proteínas:

- DAC3 (Estrategia PCR-Fusión, Método clásico)
- Sir2 RP1 (Estrategia plasmídica, Método clásico)

Se puede observar la fluorescencia de las cepas mutantes de DAC3 y Sir2 RP1, confirmando la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). En las siguientes imágenes se puede observar la presencia de fluorescencia correspondiente a la proteína de fusión GFP en ambas cepas:

## V. Resultados

A continuación se muestra el **control negativo** en el que no se observa fluorescencia verde debida a la proteína GFP, pero sí fluorescencia debida al colorante DAPI en núcleo y kinetoplasto.

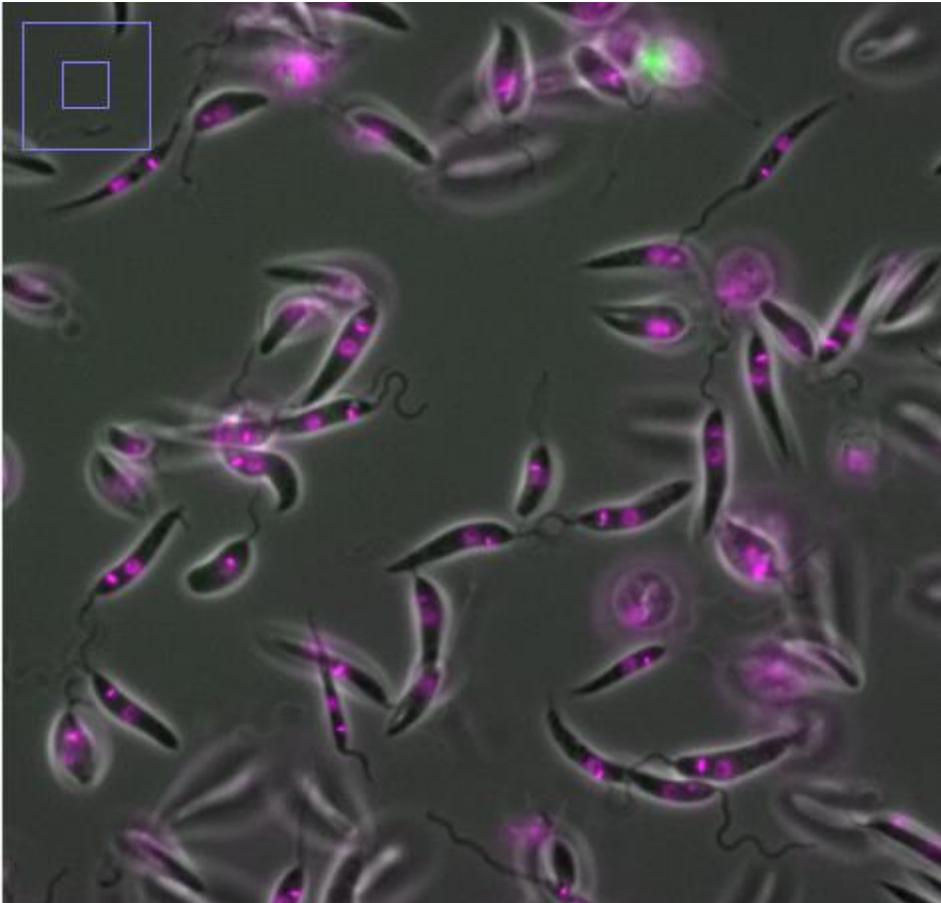


Figura 17. Localización de las proteínas. Control negativo. En rosa se observa la tinción DAPI (ADN) y en verde la fluorescencia debida a la proteína.

En el caso de *L. mexicana* Sir2 RP1-GFP se observa fluorescencia en todo el citoplasma de forma homogénea. Esto es indicativo de que esta proteína tiene una localización citoplasmática. También se observa la fluorescencia debida a DAPI.

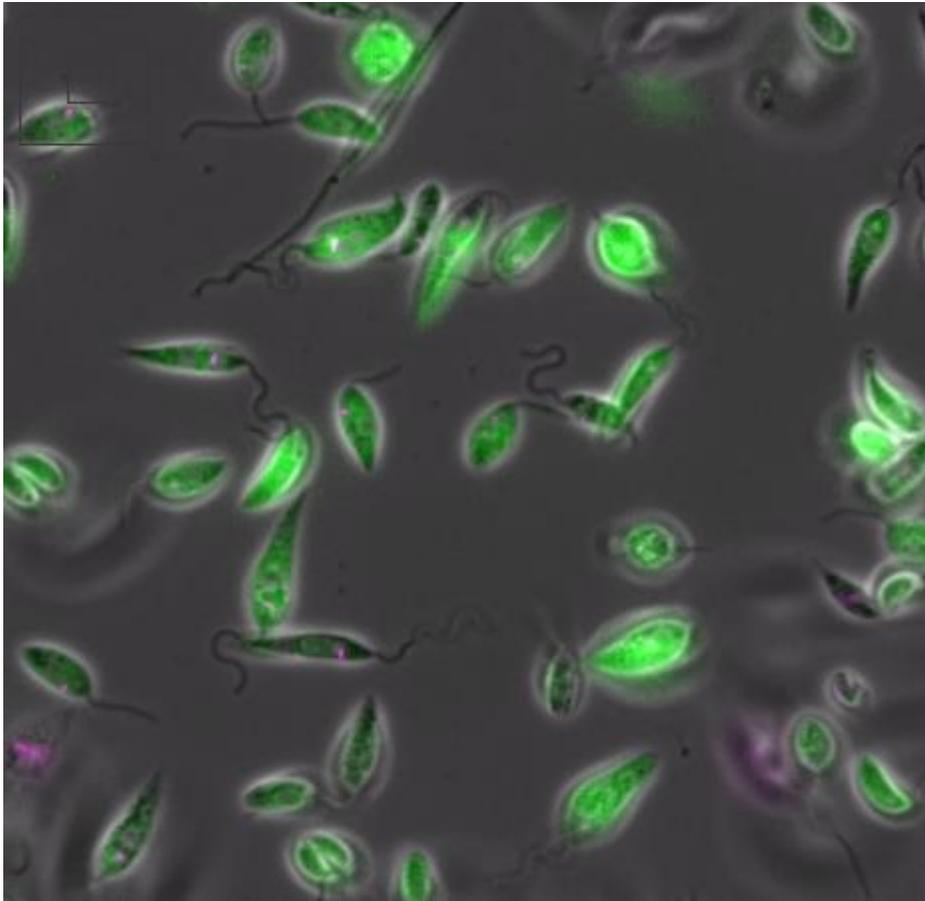
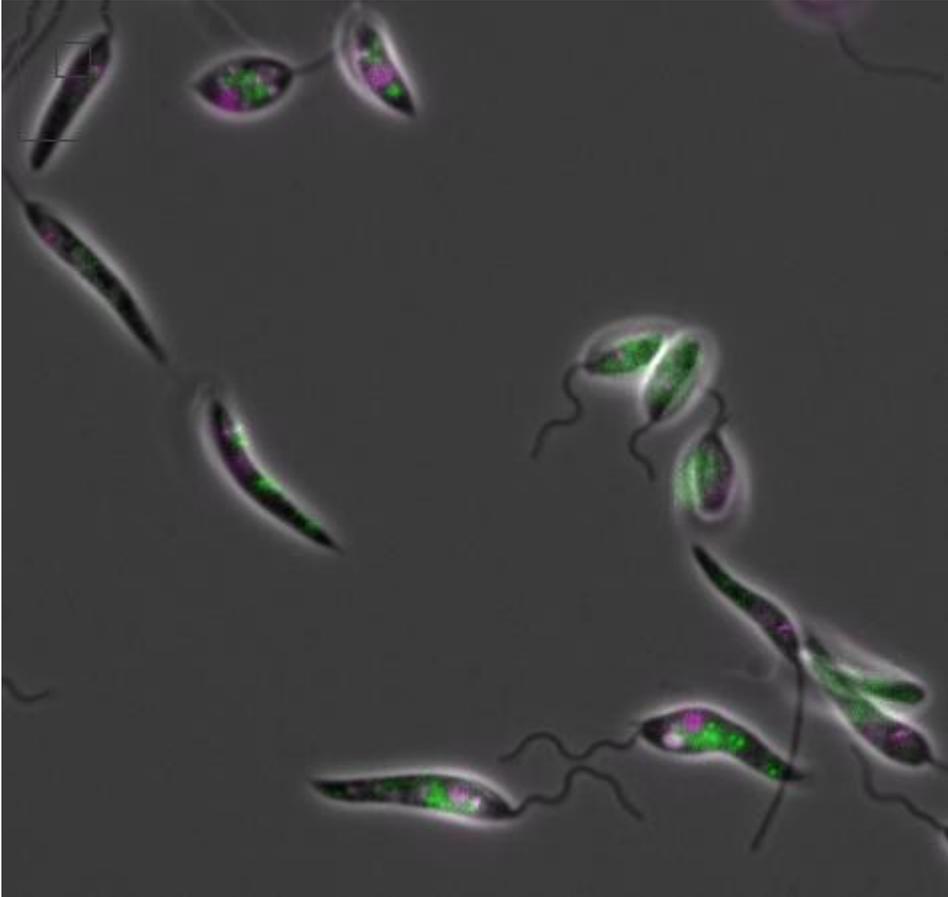


Figura 18. Localización de las proteínas. Sir2 RP1-GFP. En rosa se observa la tinción DAPI (ADN) y en verde la fluorescencia debida a la proteína.

## V. Resultados

Por otro lado, *L. mexicana* DAC3-GFP muestra fluorescencia verde localizada en ciertas zonas del citoplasma (no homogénea) que podría corresponder con una localización mitocondrial de la proteína.



**Figura 19. Promastigotes de *L. mexicana* expresando la proteína de fusión DAC3-GFP. En rosa se observa la tinción DAPI (ADN) y en verde la fluorescencia debida a la proteína.**

El análisis por Western Blot confirmó que la fluorescencia era debida a proteínas de fusión. Como se puede observar en la figura 20, se detectaron en sendos mutantes proteínas con tamaños correspondientes a la suma del peso de la proteína original y del peso de la GFP. Así, se detectó:

- Una proteína entre 90 kDa que coincide con la hipotética proteína de fusión entre Sir2 RP1 (68 kDa) y GFP (17 kDa).
- Una proteína de aproximadamente 100 kDa que coincide con la hipotética proteína de fusión entre DAC3 (98 kDa) y GFP (17 kDa).

- Control positivo (+): Se trata de un control que sobreexpresa una proteína de fusión de GFP y una proteína control con un tamaño de aproximadamente 50 kDa.

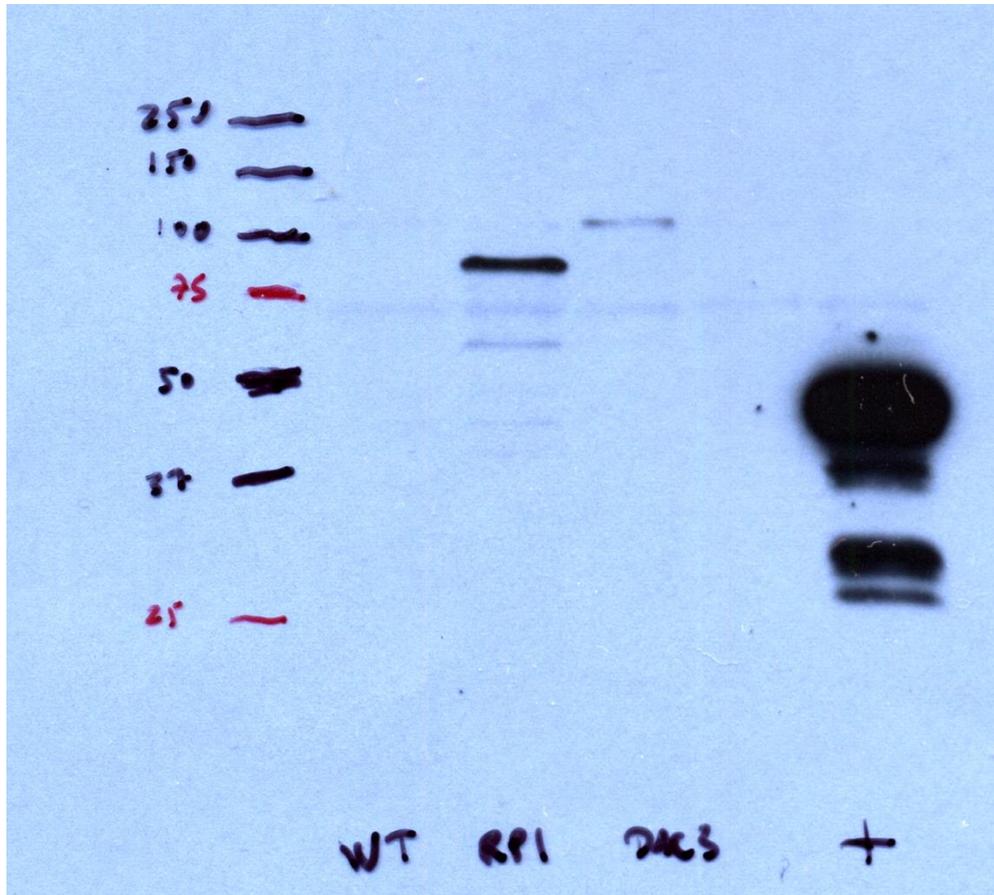


Figura 20. SDS-PAGE del lisado de proteínas detectando anticuerpos anti-GFP. Tamaño (kDa) de cada proteína detectada. WT es el control negativo, RP1 corresponde a los mutantes transfectados con la proteína RP1-GFP, DAC3 corresponde a los mutantes transfectados con la proteína DAC3-GFP y “+” corresponde al control positivo, que sobreexpresa una proteína de fusión de GFP y una proteína control con un tamaño de aproximadamente 50 kDa.

## **VI. Discusión**



## **Evaluación *in vitro* y cribado de compuestos**

### **Modelo *in vitro***

La **elección** de macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón (BMMΦ) como modelo de infección fue motivada por los prometedores resultados de infectividad sobre éstos obtenidos desde un primer momento con *L. infantum*. Anteriormente ya se había demostrado que el uso de este modelo resulta muy útil para la evaluación de compuestos *in vitro* dada su permisividad a la infección por *Leishmania* spp. (Maia et al., 2007). Este modelo tiene la desventaja de la necesidad de mantener animales vivos y de que su obtención es más difícil, pero presenta la ventaja de que, una vez diferenciados en macrófagos, estas células no se dividen, facilitando y aumentando la precisión de la evaluación *in vitro*.

La **puesta a punto**, establecimiento del modelo de infección y los experimentos de actividad *in vitro*, especialmente con MTC-305 y (-)- $\alpha$ -bisabolol, pusieron de manifiesto un hecho anteriormente citado: la influencia del nivel de infección de los macrófagos sobre la actividad de los compuestos. Este hecho se ha constatado sobre dos tipos de compuestos muy diferentes en lo que se refiere tanto a estructura como a mecanismo de acción.

Estos resultados concuerdan con lo observado por Neal y Croft en 1984, que resaltaron que el elevado nivel de infección de los macrófagos podría resultar en un descenso de la actividad del estibogluconato sódico en un modelo *in vitro*, estableciendo un aumento de la IC<sub>50</sub> de este compuesto al aumentar el número de amastigotes por macrófago. Posteriormente este hecho fue también observado por Seifert et al. en 2010.

En este trabajo, este hecho no solo ha sido demostrado, sino que para estos compuestos se ha elaborado un modelo de regresión que incorpora como variable independiente el nivel de infección de los macrófagos, con el fin de predecir la IC<sub>50</sub> del compuesto dependiendo del nivel de infección de los macrófagos. A la hora de calcular ese valor, se ha utilizado la IC<sub>50</sub> correspondiente a un nivel de infección del 50%.

Aunque eficientes, **los ensayos sobre promastigotes** no son ideales (Fumarola et al., 2004) al no tratarse de la fase del parásito presente en el hospedador vertebrado. Tampoco los ensayos sobre amastigotes axénicos suponen una alternativa a éstos, dadas sus diferencias en distintas funciones celulares

relacionadas con su metabolismo y respuesta al estrés oxidativo con los amastigotes intracelulares (Rochette et al., 2009).

En este trabajo, el ensayo sobre promastigotes fue relegado a una función complementaria de los ensayos sobre amastigotes intracelulares debido a que el compuesto MTC-305 no se mostró activo sobre aquéllos. No se trata sin embargo del primer compuesto encontrado con actividad frente a amastigotes intracelulares pero no activo frente a promastigotes (De Muylder et al., 2011), hecho esperable dadas las diferencias existentes en la expresión de genes dependiente del estadio del parásito (Alcolea et al., 2014).

Curiosamente, otro de los compuestos encontrados con este tipo de selectividad es un inhibidor de la proteína Sir2 (LmSIR2), el sirtinol (Vergnes et al., 2005). Este compuesto es un conocido inhibidor de las sirtuinas. En ese trabajo, se comprobó su inactividad frente a promastigotes de *L. infantum* en contraste con su actividad frente a amastigotes axénicos. Sin embargo, según los autores, esta observación no se basa en las mencionadas diferencias en su expresión, ya que se expresa igualmente en promastigotes y amastigotes, sino que podría deberse a diferencias en su actividad entre las dos fases del parásito.

### **Actividad del SAHA**

El primer compuesto que hemos evaluado fue el SAHA, inhibidor global de las enzimas histona desacetilasa dependientes de zinc. Aunque mostró actividad sobre amastigotes intracelulares de *L. infantum*, también mostró una elevada citotoxicidad frente a los BMMΦ usados como modelo a 20 µM, luego no se podría decir de forma inequívoca que es un compuesto activo frente al parásito dado que el efecto observado bien podría deberse a su citotoxicidad inespecífica.

Entre los distintos autores se encuentran discrepancias en la actividad y citotoxicidad de este fármaco: Sodji et al. en 2013 estiman su IC<sub>50</sub> frente a promastigotes de *L. donovani* en 25,7 µg/mL (97,1 µM) mientras que resulta inócuo frente a amastigotes axénicos (40 µg /mL ó 151,4 µM), muy activo frente a amastigotes intracelulares (0,5 µg/mL ó 1,9 µM) y poco citotóxico (CC<sub>50</sub>>10 ug/mL ó 37,8 µM frente a THP-1); Mwakwari et al. en 2010 y Guerrant et al. en 2010 sin embargo estiman su IC<sub>50</sub> en 21,5 µg/mL (81,3 µM) frente a promastigotes de *L. donovani* y su citotoxicidad muy elevada (CC<sub>50</sub> 1,4 µg/mL ó 5,4 µM en células Vero). Patil et al. en 2010 citan su actividad en 29,7 µg/mL (112,4 µM) sobre promastigotes de *L. donovani* y su citotoxicidad en 1,2 µg/mL (4,5 µM) sobre células Vero. Mai et al. en 2004 también encuentran esos mismos valores.

## VI. Discusión

Estos resultados contrastan con los obtenidos en nuestro estudio, pues el SAHA mostró actividad no específica (índice de selectividad inferior a 4) frente a amastigotes pero ningún tipo de actividad frente a promastigotes a concentraciones de hasta 10  $\mu\text{M}$ . Este resultado ya apunta a la diferencia existente entre las enzimas HDAC del parásito y las de mamíferos.

Los compuestos derivados del SAHA evaluados fueron MAR71 (derivado del SAHA con actividad hipotética anticancerosa muy elevada), SPF251 (derivado del SAHA sin hipotética actividad anticancerosa) y SPF581A (derivado del SAHA con actividad similar a éste). Estos compuestos, aunque no mostraron toxicidad frente a BMM $\Phi$ , mostraron una baja actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*.

### **Actividad del MTC-305 y derivados hidroxámicos de síntesis**

Junto con el SAHA, se evaluó MTC-305, compuesto que por su modificación estructural está desprovisto de su capacidad inhibitoria sobre histona desacetilasas humanas. La puesta de manifiesto de la actividad frente a *L. infantum* de este tipo de estructuras constituye un importante hallazgo en la química médica, ya que supone un cambio estructural que dota a la molécula de selectividad sobre el parásito.

La modificación en el hidroxilo del grupo hidroxámico es una modificación inédita y da lugar a la pérdida de actividad inhibitoria en las isoformas humanas de histona desacetilasa, por lo que tampoco es citotóxico frente a líneas celulares mamíferas, transformadas o no.

Su elevada actividad antiparasitaria ha puesto de manifiesto la utilidad de un tipo de estructura, los O-alkil hidroxamatos, estructuras sin actividad anticancerosa ni inhibitoria de las enzimas histona desacetilasa humanas. La síntesis y evaluación de los demás compuestos tuvieron como objetivo mejorar características del MTC-305, como su solubilidad y su actividad antiparasitaria, además de profundizar en el conocimiento de las relaciones estructura-actividad.

Durante la última década, se han evaluado diversos compuestos de síntesis con actividad inhibitoria de histona desacetilasa, ya sean zinc o NADH dependientes (Sodji et al., 2014; Mwakwari et al., 2010; Guerrant et al., 2010; Tavares et al., 2010; Mai et al., 2004). Estos compuestos han mostrado actividad antiparasitaria en diversos grados, pero tienen en común que también son compuestos con actividad sobre HDAC humanas, en mayor o menor grado.

El compuesto MTC-305 no solo no es activo frente a las isoformas de HDAC humanas, sino que no es tóxico a 100  $\mu\text{M}$  frente a BMM $\Phi$ . Unido a su actividad, le confiere un índice de selectividad (SI) de al menos 31 dependiendo de la especie de *Leishmania*. Éste constituye un importante hallazgo puesto que aunque no existe ningún tipo de convenio en cuanto al valor idóneo de SI, (Schmidt et al., 2012) se suele asumir que un compuesto prometedor debe tener un valor de al menos 10 (Don y Ioset, 2014). Por tanto este compuesto cumplió ampliamente los criterios necesarios para ser evaluado en ensayos *in vivo*.

Los compuestos YSL y MDG mejoraron en varias veces la actividad del MTC-305, sin mostrar citotoxicidad y alcanzando índices de selectividad alrededor de 100. Sirvieron además para demostrar ciertas características estructura-actividad de este tipo de estructuras.

Los compuestos SPF-841 y ECL también mostraron una elevada actividad frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum*, sin embargo y dado a su complicado perfil de síntesis y baja solubilidad, no se continuó su evaluación.

Tanto MTC-305 como MDG mostraron actividad frente a otras especies de *Leishmania*, ya fuesen visceró o dermatrópicas. Es de destacar que las especies dermatrópicas (*L. tropica* y *L. major*) se mostraron especialmente sensibles al MTC-305 (con IC<sub>50</sub> inferiores a 1  $\mu\text{M}$ ) con respecto a la especie viscerotrópicas (*L. infantum* y *L. donovani*, con IC<sub>50</sub> alrededor de 3  $\mu\text{M}$ ). Es conocido el hecho de que existen diferencias, tanto inter como intra-especies en la sensibilidad *in vitro* a fármacos, tanto de uso habitual como experimentales (Escobar et al., 2002; Neal et al., 1995). Los resultados de actividad anti-*Leishmania*, citotoxicidad e índice de selectividad encajaron perfectamente con las recomendaciones de Don y Ioset (2014) a la hora de desarrollar nuevos compuestos frente a la leishmaniosis.

Ambos mostraron también actividad frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi* con valores de IC<sub>50</sub> similares a los de *Leishmania* spp. Sorprendentemente no se ha encontrado ningún compuesto relacionado con iHDAC que haya sido evaluado frente a *T. cruzi*. Este hecho contrasta con los compuestos que han sido evaluados frente a los agentes causales de la leishmaniosis, la enfermedad del sueño y especialmente la malaria. Los resultados también cumplirían con las recomendaciones anteriormente mencionadas (Don y Ioset, 2014).

Hasta el momento, solo algunos trabajos habían citado compuestos inhibidores de histona desacetilasa con actividad frente a *Leishmania* spp.: Mai et al. en 2004 sintetizaron una serie de compuestos derivados de hidroxiamidas con elevada

## VI. Discusión

actividad frente a promastigotes de *L. donovani*, siendo dichos compuestos inhibidores moderados de HDAC humanas en el rango submicromolar, aunque estos autores destacaron que no fueron los más activos frente a las HDAC humanas los que mostraron mayor actividad frente al parásito y su citotoxicidad fue la más baja. Estas observaciones, salvando las diferencias, concuerdan con nuestros resultados, siendo los compuestos menos activos en mamífero los más potentes frente a *Leishmania*.

En 2010, Patil et al. evalúan una serie de compuestos aril-triazol hidroxamatos frente a promastigotes de *L. donovani*, encontrando actividades moderadas frente al parásito, hasta 2-4 veces más potentes que el SAHA; sin embargo los propios autores reconocen que, al igual que en el caso del SAHA, la actividad de la mayoría de los compuestos que encuentran activos se debe a su citotoxicidad general y no a una actividad específica frente al parásito. Luego, el mismo grupo de investigación (Guerrant et al., 2010) evalúa HDACi macrocíclicos frente a promastigotes de *L. donovani*, esta vez encontrando compuestos entre 7-10 veces más potentes que el SAHA y exentos de toxicidad. Curiosamente, estos compuestos son los menos activos frente a HDAC de mamífero de toda la serie. Sin embargo, al evaluarlos frente a amastigotes axénicos, encuentran que solo uno de los tres compuestos es activo también. Estos resultados deben ser tratados con cautela al haber evaluado la actividad de los compuestos frente a promastigotes y amastigotes axénicos y no frente a amastigotes intracelulares,

Mwakwari et al. en 2010 también evalúan HDACi macrocíclicos derivados de ketólidos tricíclicos frente a promastigotes de *L. donovani*. Encuentran un compuesto con actividad moderada (4 veces más potentes que el SAHA), dos con actividad similar al SAHA y dos inactivos frente al parásito. De nuevo se pone de manifiesto lo observado anteriormente: el compuesto con mayor actividad frente al parásito es el compuesto menos activo frente a *P. falciparum*, frente a células transformadas y frente a las isoenzimas HDAC6 y HDAC8 de mamífero. Este grupo de investigación, en otros trabajos donde evalúan compuestos frente a líneas cancerosas, isoenzimas de HDAC y frente a los parásitos *P. falciparum* y *L. donovani* (Guerrant et al., 2010; Patil et al., 2010), encuentran los mismos resultados: mientras que la actividad frente al agente causal de la malaria es paralela a la actividad anticancerosa, la actividad antileishmania es contraria a esa corriente y en general, a mayor actividad frente a *L. donovani*, menor actividad frente a *P. falciparum* o células de mamífero. Luego estos trabajos ya adelantaron lo que encontramos

nosotros, que los compuestos más activos carecen de actividad en células de mamífero.

En 2013, Pavlik et al. aíslan un iHDAC de una cianobacteria, el santacruzamato. Al evaluarlo concluyen que tiene gran actividad frente a células transformadas y *P. falciparum*, pero no frente a amastigotes axénicos de *L. donovani* ni frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. De este modo, se cumple el hecho anteriormente observado del paralelismo entre actividades anticancerosas y antimaláricas y la inactividad de los compuestos más eficaces frente a *Leishmania* y en este caso frente a otro tripanosomátido, *T. cruzi*. Según nuestros datos, éste es el único artículo que evalúa un supuesto iHDAC frente al agente causal de Chagas y la falta de actividad encontrada concuerda con nuestros resultados, ya que nuestros compuestos resultaron tan activos frente a *Leishmania* spp. como frente a *T. cruzi* *in vitro*.

Por último, Sodji et al. en 2014 sintetizan una serie de compuestos iHDAC derivados de 3-hidroxipiridina con actividad selectiva frente a HDAC6 y HDAC8 y los evalúan frente a promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Estos autores destacan la falta de concordancia entre actividades anti-HDAC1 (y en general frente a HDAC de clase I) y actividad frente a *Leishmania*, en contraste con la actividad antimalárica (como antes se mencionó) y lo atribuyen a diferencias importantes en los aminoácidos del centro activo de las HDAC de *Leishmania*. Por ello evalúan unos compuestos sin actividad frente a HDAC1 pero con actividad frente a HDAC6 (clase IIb) y HDAC8 (clase I). Encuentran compuestos activos frente a amastigotes intracelulares de *L. donovani* y demuestran que tubastatin (inhibidor selectivo de HDAC6) es muy activo mientras que otro compuesto con actividad selectiva frente a HDAC8 no lo es. Sin embargo, no llegan a ninguna conclusión en cuanto a qué actividad frente a HDAC humana podría estar mejor relacionada con la actividad frente a *Leishmania*, dado que los compuestos más activos muestran una actividad muy variable frente a HDAC6 y HDAC8, habiendo compuestos muy activos o simplemente inactivos frente a una, otra o ambas enzimas.

La bibliografía existente, aunque limitada, confirma nuestros resultados: todos los compuestos evaluados anteriormente poseen actividad frente a HDAC de mamífero. Aunque una estrategia para la búsqueda de compuestos frente a enfermedades parasitarias consiste en el uso de compuestos con actividad anticancerosa, esta estrategia ha demostrado ser infructuosa en esta diana terapéutica en concreto dadas las diferencias entre las HDAC del parásito,

## VI. Discusión

diferencias inesperadas dados los prometedores resultados que esta estrategia da frente a otros parásitos, como *Plasmodium*.

### **Evaluación del (-)- $\alpha$ -bisabolol**

La actividad del (-)- $\alpha$ -bisabolol frente a promastigotes de *Leishmania* ya ha sido evaluada con anterioridad. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Morales-Yuste et al., 2010), se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 49  $\mu$ M, lo que concuerda con este estudio. Hay que tener en cuenta que aunque los tests de citotoxicidad celular basados en la reducción enzimática son más eficientes a la hora de evaluar la viabilidad celular, éstos se ven afectados por compuestos que dañan la mitocondria, como parece ser el caso de este sesquiterpeno; por esta razón estos tests podrían no ser los más idóneos en estos casos y sus resultados podrían estar ligeramente alterados, mostrando menor producción de resazurina.

Los resultados que hemos obtenido con (-)- $\alpha$ -bisabolol demuestran que este producto tiene actividad sobre los amastigotes intracelulares de *L. infantum*. La IC<sub>50</sub> ha resultado ser de 56,93  $\mu$ M para un nivel de infección del 50%, manteniéndose en el rango micromolar.

Esta actividad se mantiene o incluso se mejora en otras especies como *L. donovani*, las especies causantes de leishmaniosis cutánea *L. tropica* y *L. major* o el agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi*. Aunque la actividad se mantiene en el mismo rango, las especies dermatópicas parecen ligeramente más sensibles al tratamiento.

Esta concentración inhibitoria es muy parecida a la de 49  $\mu$ M obtenida por Morales-Yuste et al. en 2010 sobre promastigotes de *L. infantum*, lo cual indica que la actividad del producto es independiente del estadio del parásito.

También indica que el (-)- $\alpha$ -bisabolol ha llegado a atravesar las membranas del macrófago sin ningún problema llegando al parásito, solo siendo limitada su actividad por el porcentaje de infección inicial. El producto, una vez atraviesa la membrana del macrófago, debe penetrar en la vacuola parasitófora y una vez allí, ataca o penetra las membranas del parásito. En cualquier caso, cuando hay tantos amastigotes, parece ser que su actividad decrece y no hay suficiente cantidad de producto para todos. Aunque parece un inconveniente, hay que tener en cuenta que en el tratamiento de ésta y otras enfermedades la dosis se repite durante varios días, manteniendo la concentración de fármaco y eliminando al patógeno

progresivamente. Por ello, este inconveniente no debería ser tal para su aplicación práctica.

Este estudio ha verificado por tanto la actividad de este sesquiterpeno y su perfil de toxicidad en un modelo macrófago-amastigote. Pocas publicaciones evalúan este compuesto frente a *Leishmania* spp. y ninguno frente a otros tripanosomátidos agentes causales de la enfermedad de Chagas o de la enfermedad del sueño, hecho sorprendente dada su utilización frente a otros parásitos o bacterias. Recientemente, Colares et al. (2013) evaluaron su actividad frente amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* en un modelo de macrófagos peritoneales. Este valor es similar al obtenido por nosotros para *L. infantum* e inferior al obtenido para *L. major* y *L. tropica*, obteniendo una IC<sub>50</sub> de 48,0 µM.

Con respecto a su mecanismo de acción, el (-)-α-bisabolol, como muchos otros constituyentes de aceites esenciales puede afectar a la membrana plasmática del parásito. Este efecto puede deberse a una acción directa como la inhibición de la glucosilación o a la disminución en su estabilidad, o a un efecto indirecto mediante la inhibición de la síntesis de los ácidos grasos o de otros constituyentes de la membrana del parásito como el ergosterol. También se ha propuesto la afectación de la membrana mitocondrial que podría llevar a la muerte del parásito, mecanismo ya propuesto en el caso de su actividad anticancerosa. En 2015, Rottini et al. encontraron despolarización en la membrana mitocondrial de promastigotes de *L. amazonensis* que habían sido previamente tratados con este compuesto

Los resultados obtenidos muestran ausencia de toxicidad in vitro, resultando la CC<sub>50</sub> > 1000 µM, un valor muy elevado y consistente con el encontrado por Piochon et al. en 2009, que no encontró citotoxicidad a 150 µM y con Colares et al. (2013) donde la CC<sub>50</sub> obtenida fue de 452 µM. Estas diferencias se pueden deber a los modelos utilizados y la metodología empleada.

Los índices de selectividad encontrados para las especies viscerotrópicas, *L. infantum* y *L. donovani* resultaron de 17 y 25 respectivamente, mientras que en la especie dermatrópicas este valor llegó a 40. Estos resultados son muy prometedores al tener un valor mayor de 10. Estos valores resultaron muy superiores a los de los compuestos de referencia utilizados, el antimoniato de meglumina y el isetionato de pentamidina.

Ninguno de los índices anteriormente mencionados deben considerarse de forma individual a la hora de decidir llevar a cabo estudios en animales, sino en conjunto.

## VI. Discusión

Además, dadas las ventajosas propiedades de este compuesto natural, los ensayos en animales quedaban completamente justificados.

### **Mecanismo de acción del (-)- $\alpha$ -bisabolol**

En este trabajo se proponen dos posibles mecanismos de acción de este producto natural:

El primero de ellos resulta novedoso, consistente en la inmunomodulación de la generación de óxido nítrico por el macrófago. En este estudio se ha confirmado, como se refleja en otros trabajos (Kim et al., 2011), la actividad antiinflamatoria de este compuesto al tratar macrófagos no infectados: se produce una disminución en la síntesis de óxido nítrico dosis-dependiente. Sin embargo, al tratar macrófagos infectados, el efecto se invierte y aumenta la generación de este radical libre, compensando la disminución en la generación de NO\* que produce la infección por el parásito (Balestieri et al., 2002). Este efecto de la estimulación de la síntesis de NO\* ya ha sido observado en otros compuestos naturales (Dayakar et al., 2015) y para confirmarlo sería interesante recurrir a estudios de expresión de ARNm de las enzimas implicadas con el fin de averiguar el mecanismo de acción exacto.

El segundo mecanismo de acción está relacionado con el daño a nivel mitocondrial que ya se ha observado anteriormente. Nuestro estudio aporta además la confirmación de que el compuesto llega a los amastigotes y se localiza preferentemente en ellos. También se ha comprobado que el compuesto inhibe la actividad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales al realizar el ensayo en bajo tiempo de exposición, como ya se ha descrito para otros compuestos (Boiani et al., 2009; Maarouf et al., 1997; Varela et al., 2014) y también se relaciona este daño mitocondrial con la incapacidad de resistir el efecto del NO, posiblemente debido a que muchas de las enzimas responsables de resistir el estrés oxidativo son mitocondriales (Kathuria et al., 2014; Menna-Barreto y de Castro, 2014).

## **Evaluación *in vivo***

### **Elección y puesta a punto del modelo experimental animal**

Se eligió el ratón Balb/c como modelo animal por su versatilidad, bajo precio y disponibilidad. El ratón Balb/c se ha usado anteriormente como modelo de leishmaniosis visceral por *L. infantum*

La infección se realizó mediante inoculación intraperitoneal de diez millones de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria de crecimiento. Se trata de un modelo común para el establecimiento de infecciones experimentales (Calvo-Álvarez et al., 2015; de Moraes et al., 2014; Rodrigues et al., 2012; Serna et al., 2015; Tavares et al., 2012). De hecho, Rolão et al. en 2004 evaluó la diferencia entre la inoculación intraperitoneal e intravenosa de promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* a distintas dosis infectivas, concluyendo que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las cargas parasitarias en bazo halladas entre ambas vías de infección y que los resultados en la infección por vía intraperitoneal mostraban menor variabilidad, siendo éstos adecuados para la evaluación de fármacos.

En nuestro caso, éste demostró ser un modelo capaz de establecer infecciones estables en ratones que se mantuvieron durante al menos dos meses, alcanzando el parásito los principales órganos diana: bazo, hígado y médula ósea; y logrando cargas parasitarias elevadas (hasta 2500 Parásitos/mg en bazo).

No se evaluaron las cargas parasitarias en médula ósea por ser un procedimiento más largo, aunque sí se comprobó la presencia del parásito en este tejido mediante su cultivo. Tampoco se trata de un tejido cuya carga parasitaria se evalúe con asiduidad en los experimentos de evaluación de nuevos compuestos, teniendo más protagonismo bazo e hígado.

Las cargas parasitarias obtenidas en este modelo fueron mayores en bazo que en hígado. Este hecho coincide con lo observado por otros autores (Gangneux et al., 1999; Honoré et al., 1998), que indican que en las infecciones de ratones Balb/c con *L. infantum*, la carga parasitaria al principio es igual o mayor en el hígado, descendiendo progresivamente tras unos 20 días de infección, mientras que la carga parasitaria en bazo aumenta a partir de ese día, invirtiéndose la relación entre éstas. Dado el modelo de infección utilizado, finalizando el ensayo en el día 43, parece coherente encontrar cargas parasitarias más elevadas en el bazo que en el hígado.

### **El método de cuantificación de la carga parasitaria**

Los métodos clásicos de cuantificación de la carga parasitaria, como el establecimiento de la LDU (Leishman Donovan Units), basado en el recuento de amastigotes en improntas de órgano son los más aceptados para ese fin. Sin embargo, tienen más inconvenientes que ventajas: consumen mucho tiempo, tienen baja sensibilidad, requieren personal especializado y son muy subjetivos (dos microscopistas distintos pueden dar resultados muy diferentes). Además, al realizar improntas de órganos, los amastigotes no se distribuyen de forma uniforme entre las improntas ni en la misma impronta, dando lugar a resultados erróneos y baja precisión (Bretagne et al., 2001).

Posteriormente, se diseñaron ensayos basados en la dilución limitante (LDA, Limiting Dilution Assay) del cultivo de órgano (Titus et al., 1985). Este tipo de ensayos, aunque más sensible y reproducible, también requieren de mucho esfuerzo (Nicolas et al., 2002).

En la última década, se han desarrollado varias técnicas de qPCR (Bretagne et al., 2001; Nicolas et al., 2002; Rolão et al., 2004) capaces de cuantificar de forma fiable, precisa y reproducible la carga parasitaria en tejidos de roedor, mostrando el efecto de fármacos habituales frente a la leishmaniosis o evaluando nuevos compuestos (Reimão et al., 2011; Srivastava et al., 2013). Estas técnicas han sido evaluadas paralelamente a otros basados en microtitulación de cultivo o microscopía (Moreira et al., 2012), mostrando su mayor precisión, sensibilidad, fiabilidad y su poco tiempo de procesamiento en comparación con las otras. Por estas razones es sorprendente que, aunque en la evaluación de fármacos en modelos caninos sean técnicas muy aceptadas como muestra la bibliografía, solo unos pocos artículos las usen para la evaluación de fármacos en modelos de laboratorio.

### **Evaluación del antimonio de meglumina en el modelo murino de leishmaniosis visceral**

Los animales fueron tratados con una dosis diaria elevada de antimonio de meglumina (104 mg Sb<sup>V</sup>/kg) durante 14 días. Es considerada una dosis de elevada actividad en modelos animales (Croft et al., 1999). El tratamiento redujo la carga parasitaria en hígado de forma significativa en todos los experimentos realizados pero su actividad fue muy limitada a la hora de reducir la carga parasitaria en el bazo. Estos resultados son similares a los observados por otros autores (Gangneux et al., 1999; Borborema et al. en 2013), en los que tras el tratamiento se reduce la

carga parasitaria en hígado pero la de bazo permanece intacta. Dichos autores dan como causa probable la rápida eliminación del antimonio en el bazo, además de las grandes diferencias de acumulación de antimonio entre ratones sanos e infectados (debidas posiblemente al daño hepático por la infección). Carter et al. en 1989 indican que estas diferencias podrían deberse al alto nivel de perfusión sanguínea del hígado. Collins en 1992 observó una alta supresión del parásito en hígado a pesar de mantener elevados niveles de parasitación en bazo y médula ósea. Por último Nieto et al. en 2003 observan una reducción de la carga parasitaria en hígado sin afectar a bazo o médula ósea utilizando una única dosis de 222 mg Sb<sup>v</sup>/kg. Una explicación más simple puede darla el hecho de que las cargas parasitarias encontradas en bazo fueron superiores a las encontradas en hígado.

### **Evaluación *in vivo* del compuesto MTC-305**

La administración del compuesto MTC-305 a 500 mg/kg en una única dosis no causó la muerte de ningún ratón. Tampoco el SAHA, compuesto del que deriva, causó la muerte a ningún ratón o rata a una dosis de 2000 mg/kg de acuerdo con Merck (2013), aunque las modificaciones estructurales del primero podrían haber llevado a un resultado distinto.

Los ensayos de toxicidad subaguda en ratones sanos (14 días) tampoco mostraron efectos tóxicos en los ratones a la máxima dosis (200 mg/kg). Sin embargo, el SAHA sí mostró efectos adversos como anorexia en un ensayo crónico (26 semanas, 160 mg/kg/d de dosis máxima) en ratas.

Los resultados concuerdan con la naturaleza del compuesto: el MTC-305 no tiene actividad frente a HDAC de mamíferos y su citotoxicidad es más de diez veces más baja que la del SAHA, compuesto considerado inhibidor global de las enzimas HDAC de clase I y II. Esta selectividad frente al parásito proporciona un mayor margen de maniobra a la hora de escoger una dosis.

A pesar de ello se eligió una dosis relativamente baja en los primeros ensayos en animales infectados, dada la afectación hepática durante la infección que podría incrementar los posibles efectos adversos.

En los ratones se realizó una exploración bioquímica y enzimática buscando alteraciones órgano-específicas, especialmente alteraciones hepáticas (AST y ALT), del riñón (Creatinina y urea) y generales/pancreática (fosfatasa alcalina), dado que la toxicidad pancreáticas es un parámetro también importante. El perfil bioquímico y enzimático en los ratones no se vio alterado en los ensayos de toxicidad ni en

## VI. Discusión

los de actividad. El análisis de los cortes histológicos tampoco reveló daño en hígado o riñón. Tampoco perdieron peso. Don y loset (2014) recomiendan que el compuesto no muestre toxicidad evidente a la dosis activa.

En la Fundación Medina se realizaron ensayos de toxicidad *in vitro* obteniendo resultados muy prometedores: el compuesto no mostró potencial mutagénico (test de Ames) ni mostró actividad sobre células Hek\_293-hERG, por lo que el compuesto no posee actividad cardiotoxica. Se recomienda realizar estos tests en etapas tempranas del desarrollo de nuevos fármacos y antes de realizar ensayos clínicos ya que se ha demostrado que la interacción con los canales de potasio hERG está relacionada con el incremento del intervalo QT y por tanto de la aparición de arritmias fatales, especialmente torsades, un tipo de taquicardia ventricular que puede conducir a muerte súbita (Recanatini et al., 2005). Estos estudios deberán ser complementados con la evaluación de la cardiotoxicidad *in vivo* mediante otras técnicas.

El MTC-305 sin vehiculizar mostró cierta eficacia frente a *L. infantum* cuando se administró por vía intraperitoneal. La aparición de depósitos del compuesto en el peritoneo de los animales llevó a la vehiculización de éste en dos tipos de nanopartículas: PLGA y oro.

Las nanopartículas pueden ser muy útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el macrófago dado que estos, además de fagocitar al parásito, también eliminan partículas del cuerpo. Por tanto, la capacidad de estas células en el reconocimiento de dichas partículas se puede aprovechar para su tratamiento (Chellat et al., 2005). El desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos, como este caso, es recomendado por la OMS (Das et al., 2013).

Las nanopartículas biodegradables, como PLGA, son frecuentemente utilizadas en la vehiculización de fármacos por su valor terapéutico a la hora de reducir el riesgo de toxicidad de algunos compuestos, mejorando su biodisponibilidad y solubilidad (Kumari et al., 2010). En la bibliografía se encuentran varios ejemplos, como la vehiculización en nanopartículas de PLGA de anfotericina B para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en modelo murino (de Carvalho et al., 2013).

En el caso de las nanopartículas de oro, es conocida la capacidad de fagocitarlas por parte de los macrófagos (Arnida et al., 2011) y se han evaluado frente a la leishmaniosis *in vitro* (Das et al., 2011) y frente a la malaria, pudiendo incluso utilizarse por vía oral (Khalil et al., 2013).

La formulación de MTC-305 vehiculizado en nanopartículas fue realizada y caracterizada en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UGR por los doctores J. López-Viota y M. López-Viota. Se obtuvieron nanopartículas de un tamaño inferior a 180 nm para la máxima concentración de compuesto adsorbido en la superficie. La formulación consistió en una dispersión de nanopartículas que sedimenta con el tiempo pero que resulta fácilmente redispersable mediante agitación. La liberación del compuesto *in vitro* se produce en dos fases: una lenta de 30h de duración (se libera hasta el 52% del compuesto) mientras que el resto se libera en los siguientes días, llegando al 80% a los 72h. Estas características pueden ayudar a mejorar las propiedades farmacocinéticas del compuesto que sufre de un elevado aclaramiento, evitando su liberación hasta llegar a las células diana, los macrófagos, y prolongando su presencia en sangre hasta varios días.

La vehiculización del compuesto tanto en nanopartículas de PLGA como de oro consiguió evitar los problemas de escasa solubilidad del compuesto libre. Ambos tipos de formulaciones fueron eficaces en el modelo murino de leishmaniosis visceral, siendo la mejor la vehiculizada en nanopartículas de oro a una dosis de 25 mg/kg, que redujo en un 71% la carga parasitaria en hígado y en un 96% la carga parasitaria en bazo, el órgano más parasitado. Las recomendaciones de Don y loiset (2014) incluyen que un compuesto prometedor debe reducir en un 70% la carga parasitaria en hígado, aunque muchos autores consideran tanto hígado como bazo (Moreira et al., 2012) y algunos incluso incluyen la médula ósea (Fortin et al., 2012). Al no haber consenso en la bibliografía, en ese estudio se consideró evaluar la carga parasitaria en hígado y bazo.

Las características farmacocinéticas del MTC-305 se evaluaron *in vitro* en la Fundación Medina con resultados prometedores: no mostró inhibición fuerte sobre ninguna de las isoformas del citocromo P-450 y no mostró metabolización por enzimas no dependientes de NADPH; sin embargo el compuesto mostró un elevado aclaramiento por microsoma hepático humano (113  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína) y una semivida de eliminación de 8,88 minutos. Este aclaramiento se clasifica como elevado ( $>48 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) (Chiba et al., 2009).

Los positivos resultados en la evaluación *in vitro* e *in vivo* del MTC-305, tanto en términos de eficacia como de seguridad, impulsaron la solicitud de patente por parte de la Universidad de Granada (Panadero Fajardo et al., 2011).

## VI. Discusión

El MTC-305 vehiculizado con nanopartículas de oro mostró una mayor eficacia en bazo que en hígado (al contrario que el antimonio de meglumina, que sólo fue eficaz en el hígado) a pesar de que las cargas parasitarias encontradas en bazo resultaron superiores a las del hígado. La diferente "polaridad" en la eficacia de ambos tratamientos, MTC-305 y antimonio de meglumina, evidenció la posibilidad de una combinación que actuara en ambos órganos. El MTC-305 mostró una gran capacidad para ser administrado con otros compuestos, al presentar una baja actividad sobre las isoformas del citocromo P-450. En este caso se combinó con antimonio de meglumina, produciéndose una sinergia que eliminaría hasta el 100% de la carga parasitaria en hígado y más del 90% en bazo. Este tratamiento combinado no había sido evaluado *in vitro*, pero mostró excelentes resultados de eficacia y seguridad, ya que los ratones tampoco mostraron signos de toxicidad ni alteraciones bioquímicas o enzimáticas.

En este trabajo se han revisado las ventajas del uso de combinaciones de fármacos, subrayando algunos de los últimos ensayos clínicos en los que se utilizan éstas frente a la leishmaniosis. La combinación de estos dos compuestos es un claro ejemplo de sinergia en el que utilizando una dosis inferior de MTC-305 (10 mg/kg) unida al tratamiento habitual antimonial, se consigue superar a ambos compuestos por separado.

### **Evaluación *in vivo* del compuesto MDG**

Este compuesto, vehiculizado en nanopartículas de oro y administrado a la dosis de 25 mg/kg, mostró tanta eficacia en el bazo como el MTC-305, reduciendo un 90% la carga parasitaria. La ventaja de este compuesto con respecto a su predecesor se encuentra en su mayor eficacia en el hígado, hasta un 99% a esa dosis. MDG muestra una mayor eficacia para eliminar el parásito (la actividad *in vitro* es casi 5 veces mejor) y superior solubilidad que la del MTC-305. Ambos compuestos se vehicularon en las mismas nanopartículas. Por tanto es un caso en el que su mejor eficacia *in vivo* es un reflejo de su mayor actividad *in vitro*. Esta elevada eficacia se consiguió en un tratamiento de menor duración que el del MTC-305 (10 días frente a 14). Por otro lado, este compuesto presenta la ventaja de que, a diferencia del MTC-305, puede resistir el medio ácido, por lo que en teoría sería susceptible de administrarse por vía oral. Esta característica mejora aún más el potencial del MDG.

La combinación de este compuesto con el Glucantime® no resultó eficaz en el bazo ni mejoró el resultado en el hígado.

**Evaluación *in vivo* del (-)- $\alpha$ -bisabolol**

Este alcohol sesquiterpénico también resultó eficaz en el modelo de leishmaniosis visceral por *L. infantum*, reduciendo la carga parasitaria en bazo e hígado en un 72 y un 89% respectivamente a una dosis de 200 mg/kg sin mostrar toxicidad. Por tanto, cumple las recomendaciones de Don y loiset (2014). Resultó más eficaz que el antimonio de meglumina en el bazo y al menos tan eficaz como éste en el hígado. Sin embargo, al combinar este producto natural con el antimonio de meglumina se obtuvieron resultados decepcionantes: la combinación fue muy eficaz en el hígado pero no mostró actividad en el bazo. Esta falta de actividad no se ha podido explicar de forma satisfactoria. Se ha encontrado que el compuesto antimonial es capaz de causar estrés oxidativo en órganos como el bazo (Bento et al., 2013), lo que podría interferir con la acción del (-)- $\alpha$ -bisabolol.

Dicha acción antagónica se ha visto también en el caso del MDG, pero no se observó en el caso del MTC-305.

Nuestro estudio ha demostrado la eficacia del (-)- $\alpha$ -bisabolol administrado por vía oral, tratándose de una gran ventaja de este compuesto dado que actualmente las opciones terapéuticas en el tratamiento de la leishmaniosis se basan en la administración parenteral exceptuando el caso de la miltefosina. La búsqueda de un tratamiento o una combinación de tratamientos por vía oral es una de las prioridades de la DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative), que se encuentra evaluando distintos regímenes de tratamiento orales en este momento. Sus ventajosas propiedades dieron lugar a la publicación de un artículo en una revista de alto impacto (Corpas-López et al., 2015).

### **Ensayo clínico en perros con leishmaniosis adquirida de forma natural**

La elección de los sujetos del ensayo y su diseño estuvieron condicionados por las características del mismo: se trata de un ensayo clínico piloto cuyo objetivo fue el de evaluar la seguridad de los compuestos MTC-305 y (-)- $\alpha$ -bisabolol en perros enfermos de leishmaniosis y comprobar su eficacia antiparasitaria frente a un control tratado con el compuesto de referencia, aún de elección en monoterapia en Europa (Bourdeau et al., 2014). El objetivo final de un ensayo clínico piloto es el de averiguar si es factible la realización de un ensayo clínico mayor, evaluando de forma preliminar la tolerabilidad del tratamiento, proporcionando datos exploratorios sobre la evaluación de nuevos compuestos y consiguiendo la suficiente información para el diseño y planificación de ensayos mayores (Leon et al., 2011; Thabane et al., 2010). Aunque se ha denominado ensayo clínico piloto, este estudio encajaría perfectamente en la filosofía del llamado "proof of concept", consistente en un ensayo clínico pequeño con características de ensayo clínico de fase I y fase II mezcladas con una muestra pequeña.

Los criterios de inclusión, aunque laxos en términos de título de anticuerpos (solo se exigía un título igual o mayor a 40, mientras que un título positivo se considera a partir de 80) y de cuadro clínico (solo se exigían dos signos clínicos compatibles), sí exigían la presencia de cantidades detectables de parásito en sangre por qPCR ya que el método preferente para la evaluación del resultado sería precisamente éste. Los mencionados criterios ya han sido utilizados en otro estudio (Manna et al., 2008).

De esta forma, se incluyeron en el ensayo desde animales infectados, con enfermedad poco aparente, hasta perros enfermos con cuadros clínicos graves. Es decir, perros oligosintomáticos y polisintomáticos, o de acuerdo con Solano-Gállego et al. (2009), perros en fases I a III de la enfermedad (ningún perro en fase IV, correspondiente a una enfermedad grave con afectación renal fue incluido).

Otros de los objetivos del ensayo fue la evaluación de una posible asociación terapéutica entre el MTC-305 y el antimonio de meglumina, dados los buenos resultados de su combinación en ratones.

El número de perros por grupo, aunque bajo debido a limitaciones económicas, resultó adecuado para encontrar diferencias entre los distintos tratamientos.

La duración del tratamiento se ajustó al régimen más habitual de tratamiento con Glucantime® para poder compararlos adecuadamente y también porque se eligió

una dosis baja del compuesto. Esta dosis se adaptó de la dosis más eficaz en ratones (25 mg/kg) y se ajustó para perros siguiendo las normas del escalado o extrapolación de dosis entre especies (Sharma y McNeill, 2009) en las que se usa la superficie corporal de los animales como reflejo de su metabolismo, que es considerado el método más adecuado a la hora de ajustar dosis entre especies animales. La forma ideal hubiese sido la realización de un ensayo farmacocinético y toxicológico previo en animales sanos a la hora de elegir una dosis y una pauta de dosificación adecuada.

Se administraron dos series de tratamiento: esta práctica es habitual a la hora de tratar la leishmaniosis canina (Moritz et al., 1999) especialmente en casos de recidivas o de falta de eficacia. En nuestro caso fue la falta de información farmacocinética y de toxicidad *in vivo* lo que nos indujo a realizar dos series de tratamiento, cada serie con una duración de 10 días de tratamiento, 10 días de descanso y otros 10 días de tratamiento, a una dosis reducida de 3,75 mg/kg de MTC-305. Las pausas intraserie fueron establecidas para observar la posible toxicidad del tratamiento. Entre las dos series se dejó un mes de descanso.

La duración del seguimiento fue de 4 meses desde el final de la última serie de tratamiento, lo cual es un seguimiento corto en el caso de la leishmaniosis canina a la hora de detectar posibles recidivas. Algunos autores consideran que un seguimiento adecuado debe ser de 6 meses como mínimo (Athanasiou et al., 2013; Hernández et al., 2014; Manna et al., 2009b) o incluso de 12-15 meses (Manna et al., 2015; Rougier et al., 2012) ya que se pueden producir recidivas en los meses siguientes. Periodos de seguimiento más largos también permiten observar descensos en los títulos de anticuerpos, que no se producen en al menos 3 meses (Hernández et al., 2014).

Se realizaron 4 tomas de muestras, la primera el día antes de empezar el tratamiento (día 0), la segunda un mes después de acabar la primera serie de tratamiento (día 60), la tercera un mes después de acabar la segunda serie de tratamiento (día 120) y la última tres meses después de la tercera toma de muestras (día 210). De esta forma la carga parasitaria se cuantifica de forma más adecuada dado que se eliminan de los tejidos el ADN de los parásitos muertos.

La qPCR se ha mostrado muy útil en la última década para la monitorización del tratamiento (Francino et al., 2006) incluso en periodos cortos de seguimiento y en los últimos años se está utilizando de forma rutinaria en ensayos clínicos (Hernández et al., 2014; Hernández et al. 2015; Santiago et al. 2013; Rougier et al.,

## VI. Discusión

2012). Escoger un tejido en el que cuantificar el parásito también es importante debido al tropismo de algunas cepas y a la inmunidad órgano-específica (Francino et al., 2006; Reis et al., 2009). La sangre suele ser el tejido de elección ya que es una muestra menos invasiva y habitualmente refleja el efecto del tratamiento, aunque la médula ósea suele presentar mayor parasitación (Martínez et al., 2011).

Los marcadores que hemos utilizado para la evaluación de la eficacia de los distintos tratamientos fueron los siguientes:

- Carga parasitaria en sangre, aspirado de ganglio, aspirado de médula ósea y pelo
- Puntuación clínica
- Títulos de anticuerpos IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG2
- Expresión relativa de interferón- $\gamma$  e interleuquina 4

La puntuación clínica es una forma de cuantificar el estado clínico del animal que ha sido utilizado en diferentes ensayos clínicos para evaluar la eficacia del tratamiento dado que muestra correlación con la carga parasitaria (Manna et al., 2009) y con el título de anticuerpos (Proverbio et al., 2014).

Los dos últimos buscaban también evaluar si los compuestos inducían una respuesta Th1 en los perros tras el tratamiento, aunque dado el poco tiempo de seguimiento, la eficacia del tratamiento no reflejaría grandes cambios en los títulos de anticuerpos a corto o medio plazo.

La elección de criterios de eficacia es una práctica habitual a la hora de evaluar la efectividad de un tratamiento frente a la leishmaniosis canina dado que la curación de la enfermedad no es asequible en la práctica (Rougier et al., 2012, 2008) aunque en un caso sí se utilizó un test de cura a la hora de valorar la eficacia del tratamiento (Da Silva et al., 2012) que incluía: ausencia de parásitos en cultivo de aspirado de ganglio, resultado negativo en qPCR de médula ósea, bazo, hígado y piel; y resultado negativo en un test de xenodiagnóstico. En nuestro caso hemos utilizado como criterio principal de eficacia la reducción de la carga parasitaria en médula ósea, estableciendo un umbral del 50%.

La médula ósea es un órgano densamente parasitado en la mayoría de los perros con leishmaniosis canina. Al principio, la hematopoyesis es normal pero la parasitación lleva a cambios en este tejido, como hiperplasia histiocítica y hipoplasia eritrocítica, acabando en aplasia medular, traducándose en cambios hematológicos y alteraciones de la coagulación. Todas estas alteraciones son

reforzadas por la hemolisis y se relaciona con la esplenomegalia también (Foglia Manzillo et al., 2006).

En 2014, Momo et al. realizaron un análisis de la médula ósea de perros infectados por *L. infantum*. Encontraron elevadas cargas parasitarias en los tres grupos de perros que analizaron, asintomáticos, polisintomáticos y oligosintomáticos. Observaron que las alteraciones hematológicas estaban más presentes en animales con más parasitación en la médula ósea. Las mayores alteraciones consistieron en granulomas e infiltración de macrófagos en el tejido, cambiando la estructura del tejido y reduciendo el número de células hematopoyéticas

La carga parasitaria en médula ósea ha sido identificada como el mejor biomarcador del estado clínico del perro y como un importante reservorio del parásito, así como el que mejor está relacionado con los títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2 (Reis et al., 2006). Estos autores también encontraron mayores cargas parasitarias en perros sintomáticos en la médula ósea. Por último indicaron que las cargas parasitaria en médula ósea y bazo eran las mejores a la hora de evaluar el estado clínico del animal, mientras que la carga parasitaria en ganglio poplíteo, hígado y piel no se correspondía tanto con el nivel de gravedad de la enfermedad, siendo más elevadas en perros asintomáticos.

En perros donde no existía o no era detectable el parásito en médula ósea, como criterio secundario hemos elegido la reducción de la carga parasitaria en ganglio poplíteo y sangre, estableciendo como umbral un 50% en ambas.

En el caso de la carga parasitaria en aspirado de ganglio poplíteo, no se relaciona con el estado clínico del animal y de hecho se ha demostrado que la carga parasitaria en este tejido es similar en perros asintomáticos y oligo o polisintomáticos (Reis et al., 2006) mientras que otros autores (Moreira et al., 2010, Manna et al., 2009) encontraron mayores cargas parasitarias en perros polisintomáticos, pero sin hallar diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y el de perros oligosintomáticos. La mayoría de los perros infectados o enfermos muestran linfadenomegalia, pero el grado de hipertrofia o hiperplasia de este tejido no muestra correlación con el grado de parasitismo (Reis et al., 2009). La carga parasitaria en ganglio suele ser elevada, sin embargo pocos autores la consideran como único parámetro para la monitorización de un tratamiento (Manna et al., 2015). Por estas razones la carga parasitaria en el aspirado de ganglio poplíteo se tuvo en cuenta pero de una forma secundaria.

## VI. Discusión

La sangre es una muestra poco invasiva y con la que se puede evaluar la evolución de la enfermedad y predecir recidivas en los animales (Francino et al., 2006; Manna et al., 2006); además la parasitemia muestra cierta correlación con la carga parasitaria en médula ósea (Martínez et al., 2011). Se ha utilizado para evaluar el tratamiento con miltefosina (Manna et al., 2008a), con miltefosina y alopurinol (Manna et al., 2009b) en combinación con la carga parasitaria en ganglio y el tratamiento con Glucantime® y alopurinol (Manna et al., 2008b), siendo uno de los parámetros cuantitativos más evaluados (Hernández et al., 2014). Su papel ha sido definido no como tejido reservorio del parásito en el perro aunque sí se le ha asignado un papel de transporte de éste (Quaresma et al., 2009) y se le ha relacionado con la infectividad a flebotomos (Hernández et al., 2014).

La muestra menos invasiva que se evaluó fue la de pelo: las muestras no invasivas en general y el pelo en particular son muestras que han ganado una gran popularidad en los últimos años dada la sensibilidad de las técnicas moleculares y por la facilidad de su toma (Hernández et al., 2015). El ADN del parásito se ha llegado a detectar en pelo de ratones Balb/c experimentalmente infectados por *L. major* (Iniesta et al., 2013), en perros con leishmaniosis canina adquirida de forma natural (Belinchón-Lorenzo et al., 2013) y en cánidos salvajes como zorros y lobos (Muñoz-Madrid et al., 2013). Estos autores explican la presencia de ADN de parásito en pelo por tratarse éste de un órgano anejo que acumula sustancias extrañas al organismo, entre ellas ADN ajeno, excretadas por la piel. Al detectar el ADN del parásito en pelo mediante qPCR, obtienen una sensibilidad similar a la que obtienen usando sangre y lo encuentran tanto en perros infectados sanos como sintomáticos, en los folículos pilosos y en los extremos del pelo. También encuentran elevadas cargas parasitarias en piel de los animales. En ese trabajo defienden que la presencia del ADN del parásito en el pelo puede tener un origen local, pero también sistémico. Por tanto el pelo se presenta como una muestra versátil para el diagnóstico de la leishmaniosis al ser lo suficientemente sensible, no invasiva y fácil de obtener y almacenar.

### **Estado de los perros antes del tratamiento**

Dados los criterios de inclusión, los perros seleccionados constituyeron un grupo heterogéneo de animales, con títulos de anticuerpos y cuadros clínicos dispares pero que compartían la existencia de la enfermedad y de cantidades detectables de parásito en sangre con el fin de poder utilizar la técnica qPCR en la evaluación del tratamiento.

La puntuación clínica (PC) máxima encontrada fue de 24 y una media de 6,9, una puntuación relativamente baja frente al máximo alcanzable (67) aunque encontrar mayores PC hubiera significado encontrar perros con afectación renal, algo no deseable. En 2014, Proverbio et al., utilizando una clasificación de PC muy similar a la nuestra, encontraron un máximo de 30 y una media de 5,10 en perros con título de anticuerpos 1280. Los signos clínicos más frecuentes que hemos encontrado fueron: linfadenomegalia, monocitopenia, lesiones cutáneas, onicogriphosis, triglicéridos bajos y delgadez, presentes todos ellos en al menos el 50% de los perros. Aunque en todos los perros se encontraron alteraciones hematológicas y bioquímicas, al considerar las medias de éstos, el único parámetro alterado fue la concentración de bilirrubina directa.

En médula ósea encontramos las cargas parasitarias más elevadas mientras que en sangre encontramos las más bajas, datos similares a los de otros autores. En ganglio poplíteo estimamos cargas parasitarias inferiores a las de médula ósea pero superiores a las de pelo. Por tanto, los valores de cargas parasitarias en nuestro estudio se encontrarían de la siguiente manera: Médula ósea > Ganglio poplíteo > Pelo > Sangre. Por su parte, Belinchón-Lorenzo et al. en 2013 encontraron cargas parasitarias similares en pelo y sangre, ambas inferiores a las de ganglio.

Los títulos de anticuerpos de la clase IgG oscilaron entre 40 y 1280 como se ha indicado. Los títulos de IgG2 encontrados fueron superiores a los de IgG1, tanto en general como al analizarlos perro a perro, excepto en dos casos que mostraron títulos IgG1 e IgG2 iguales (0 ó 1280). Luego en nuestro estudio, el título IgG2 fue más elevado que el del IgG1, independientemente del estado clínico del animal. Este hecho ya fue observado por Reis et al. en 2006, en cuyo estudio todos los perros mostraron títulos de IgG2 superiores, al igual que otros muchos estudios (Bourdoiseau et al., 1997; Iniesta et al., 2005; Neto et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2001) sin importar si se trata de perros asintomáticos, oligosintomáticos o polisintomáticos. Otros autores asocian mayores títulos de alguno de los isotipos con el estado asintomático o sintomático (Boceta et al., 2000; Cardoso et al., 2007; Cavaliero et al., 1999).

En nuestro estudio, los niveles de IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IgG2 mostraron correlación positiva con la puntuación clínica, es decir, el estado clínico de los animales, especialmente el de IgG1 que mostró la mayor significación y coeficiente de correlación; este último dato está de acuerdo con Iniesta et al. (2005) que encuentra títulos mayores de IgG1 en perros sintomáticos en los que prevalecería la respuesta inmune tipo Th2. El índice IgG2/IgG1 mostró también asociación, pero

## VI. Discusión

negativa, con la puntuación clínica de los animales pero de forma más moderada, estando también de acuerdo con lo apuntado anteriormente.

La mayoría de los perros mostró una expresión relativa de IFN superior a la de IL4, siendo en más de la mitad de los casos de entre 10 y 100 veces mayor, lo cual concuerda con los datos de isotipos de IgG dado que ambos muestran una inclinación en estos perros hacia la respuesta de tipo Th1. En general se observó una relación entre las citoquinas IFNG e IL4 y el ratio de éstas con los títulos IgG<sub>total</sub>, IgG1 y el ratio IgG2/IgG1 respectivamente pero no con IgG2. Las relaciones se establecieron de forma dicotómica (Gupta et al., 2012; Kawano et al., 1994), observándose en muchos casos dos tipos de respuesta: por un lado elevados títulos de IgG1 unidos a elevada expresión de IL4 (respuesta tipo Th2), mientras que en otros casos se observa una elevada expresión de IFNG junto con elevados coeficientes IgG2/IgG1 e IFNG/IL4 (respuesta Th1). En contraste, Boggiatto et al. en 2010 encontraron que conforme aumentabas los síntomas clínicos de los animales, IgG1 e IgG2 aumentaban, pero IFN disminuía. Estos datos restan importancia al título IgG2, cuya relevancia sería relativa y dependiente del título IgG1 a través del coeficiente IgG2/IgG1. En 2010, Carson et al. encontraron coeficientes IgG2/IgG1 similares en perros asintomáticos y sintomáticos con elevaciones de ambos subtipos de IgG; sin embargo Oliveira et al., 2009 encontraron una respuesta elevada de IgG1 en asintomáticos mientras que la IgG2 solo aparecía en perros sintomáticos acompañada de un descenso en IgG1. Estas diferencias en las distintas reactividades las atribuyen al uso de anticuerpos monoclonales o policlonales frente a los distintos subtipos de IgG. Estos mismos autores encontraron que la aplicación de una vacuna en perros aumentaba la expresión de IFNG y de IgG2 simultáneamente (Carson et al., 2009), indicando su estrecha relación, relación que en este trabajo se ha encontrado a través del índice IgG2/IgG1 con IFNG. La importancia de IgG1 es similar a la que se le atribuye en un estudio en humanos que pretendía desarrollar un test diagnóstico para predecir recaídas basado precisamente en IgG1, cuyos niveles se han demostrado muy útiles en la identificación de recaídas tanto en leishmaniosis visceral como en PKDL (Bhattacharyya et al., 2014).

Sin embargo, estos datos no se ven reflejados en la respuesta a la intradermorreacción de Montenegro, que fue positiva en solo 8 de los 22 perros, datos que concuerdan con otros estudios que citan la positividad a esta prueba en zonas endémicas en un 22,5% (Silveira et al., 2012). Esta prueba de inmunidad celular solo mostró en nuestro estudio una relación inversa con el título IgG<sub>total</sub> lo

que concuerda con lo observado antes (Miles et al., 2005) y estaría de acuerdo con su consideración de respuesta Th1.

Hay que tener en cuenta que en el presente estudio sólo se evaluaron dos citoquinas, por lo que la influencia de otros mediadores importantes, tanto Th1 como Th2, no se ve reflejada. En 2006, Manna et al. encuentran en la sangre de perros enfermos niveles de IFNG bajos en comparación con los de IL4, resultados que confirman posteriormente (Manna et al., 2008) mientras que Quinnell et al., en 2001 encuentran que tanto IFNG como IL4 aumentan conforme avanza la infección y describen correlación entre IFNG e IgG1. Un estudio longitudinal con animales infectados experimentalmente reveló que la expresión de citoquinas Th1 y Th2 de forma temprana induce la progresión de la enfermedad (Sanchez-Robert et al., 2008). En general, IL4 se considera una citoquina relacionada con la progresión de la enfermedad (Quinnell et al., 2001; Strauss-Ayali et al. 2007) mientras que IFN se considera protectora (Carrillo et al., 2007) y cuyo nivel es bajo en animales sintomáticos mientras que otros autores encuentran mayores niveles en perros sintomáticos (Costa et al., 2013). Otro estudio demostró que el nivel de IL4 en bazo es determinante para el desarrollo de la enfermedad, sin importar el nivel de IFNG (Strauss-Ayali et al., 2007) y es que IFNG por sí sola no es capaz de contener la infección (Reis et al., 2010). Panaro et al. en 2009 concluyeron que en perros infectados naturalmente se produce una expresión mixta Th1/Th2 con una mayor expresión general de citoquinas en los perros sintomáticos, aunque sí destacan el valor protector de IFNG y la asociación con la enfermedad de IL4 al igual que Barbosa et al. que en 2011 encuentran niveles más elevados de ambas citoquinas en perros sintomáticos. Lo que está claro es que el paradigma Th1/Th2 no es ni mucho menos evidente en perros (Strauss-Ayali et al., 2007).

Las cargas parasitarias en médula ósea, ganglio y pelo sí que mostraron una gran correlación con la PC, aunque no las de sangre, resultados parcialmente de acuerdo con otros estudios en los que la carga parasitaria en ganglio y la de sangre aumentan con la sintomatología (Manna et al. 2009).

Sin embargo, aunque no mostraron relación con la PC, los niveles de citoquinas sí mostraron asociación con las cargas parasitarias evaluadas en los distintos tejidos, especialmente en sangre y médula ósea, dos tejidos cuyas cargas parasitarias se relacionan estrechamente y cuya carga parasitaria era más elevada cuando mayores eran los niveles de IgG<sub>total</sub>, IgG1 e IL4 y disminuía al aumentar IFNG o los ratios IFNG/IL4 o IgG2/IgG1; de nuevo, el nivel de IgG2 quedaba en un segundo lugar. Manna et al en 2006 encontraron que elevadas cargas en ganglio y sangre

## VI. Discusión

se asocian con bajos niveles de IFNG y elevados niveles de IL4 mientras que Sanchez-Robert et al., en 2008 asocian elevadas cargas parasitarias con elevados niveles de IFNG en etapas tardías de la enfermedad y también relacionan elevados niveles de IL4 con parasitemia elevada. La bibliografía por tanto aporta datos confusos, que se pueden deber en parte a diferencias entre etapas iniciales o avanzadas de la enfermedad, especialmente con respecto a IFNG, a la que le atribuye un valor protector relativo e influenciado por otras citoquinas. En este trabajo también se propone un modelo que explica la carga parasitaria en sangre, en el que se subraya la importancia de la carga parasitaria en médula ósea y la influencia del coeficiente IFNG/IL4, factores que sobresalen entre los demás evaluados.

Por último, la carga parasitaria en pelo mostró una fuerte correlación positiva con las cargas parasitarias en ganglio y sangre, más débil con los niveles de IgG1 e IL4 y negativa con el coeficiente IFNG/IL4. Su asociación con las cargas parasitarias en ganglio y sangre podría ser interesante para su potencial diagnóstico como se ha comentado anteriormente.

### **Eficacia de los tratamientos evaluados**

Los antimoniales son la terapia de elección en el tratamiento de la leishmaniosis canina, siendo utilizados siempre por el 56% de los veterinarios y de forma frecuente por el 48% según una encuesta reciente (Bourdeau et al., 2014). Aunque se recomienda su combinación con alopurinol, hasta un 17,5% de los veterinarios en la Europa Mediterránea lo utiliza en monoterapia de acuerdo con los datos de ese mismo sondeo.

Noli y Auxilia en 2005 realizaron una revisión en la que recogieron 20 publicaciones en las que se describían ensayos clínicos utilizando antimoniales (antimoniato de meglumina en 18). De los 19 ensayos donde los autores aportaban datos claros sobre la remisión clínica, en 11 de ellos ésta fue completa en más de un 70%, en dos entre 50-70%, en 4 la remisión fue parcial en más de un 50% y en los 2 restantes la remisión parcial o completa fue inferior al 50%, considerando un fracaso terapéutico elevado.

Dada la eficacia del Glucantime® y su consideración como tratamiento de elección de la leishmaniosis canina, decidimos usar éste como control del ensayo.

Ikeda-García et al. en 2007 concluyeron que el tratamiento con Glucantime® era eficaz disminuyendo la sintomatología, pero el parásito seguía en los tejidos

evaluados lo que llevaba a recaídas en menos de 6 meses. Mateo et al. en 2009 observaron una reducción de hasta el 64% de la PC, similar a un tratamiento paralelo con miltefosina, observando una reducción parasitológica en la médula ósea.

En nuestro ensayo y a diferencia de otros, este antimonial mostró unos resultados de eficacia muy pobres, en los que de acuerdo a los criterios establecidos, el tratamiento fue eficaz en sólo dos de los seis perros tratados. De acuerdo con Alvar et al., en 1994 y con Ikeda-García en 2007, en los que los perros sintomáticos suelen responder al tratamiento, uno de los perros en el que el tratamiento fue eficaz tenía una elevada puntuación clínica (polisintomático).

En humanos se ha visto que al principio de la terapia se alcanzan picos de ADN de parásito en sangre que coincide con parásito residual eliminado por el tratamiento (Sudarshan et al., 2011). Esta hipótesis está descartada en nuestro caso.

De los tres perros tratados con Glucantime® en los que se evaluó el pelo, la carga parasitaria disminuyó en el perro donde el tratamiento fue exitoso, al igual que lo había hecho la carga parasitaria en médula ósea, y aumentó en dos perros, al par que la parasitemia.

Manna et al. en 2009 comprueban que tras el tratamiento con miltefosina y alopurinol, el descenso en las cargas parasitaria va acompañado de un aumento en IFNG, superando a IL4 que disminuye más adelante mientras que en los perros donde se producen recidivas, los niveles de IFNG vuelven a caer.

En conclusión, el tratamiento con Glucantime® resultó poco eficaz. Aunque no se esperaba que promoviera una desaparición de las cargas parasitarias, sí se esperaba una disminución considerable acompañada de una remisión de los síntomas clínicos durante la duración del ensayo. Sin embargo solo fue eficaz en dos de los perros y los demás empeoraron, tendiendo sus respuestas inmunes hacia Th1 en dos de los perros y hacia Th2 o mixta en los demás.

En los países donde *L. infantum* es una especie endémica, un alto porcentaje de los perros pueden estar infectados (aunque una alta proporción asintomáticos) dependiendo del área, un ejemplo es nuestro país, donde la seroprevalencia varía desde el 3,7% en Orense (Amusatogui et al., 2004), en el norte de España hasta el 34,6% de la Axarquía malagueña, en el sur (Morillas et al., 1996). Las cifras de prevalencia están muy influidas por la técnica utilizada (Martín-Sánchez et al., 2009; Morales-Yuste et al., 2012).

## VI. Discusión

En la Europa mediterránea, muchos perros son alojados en refugios animales, en la mayoría de los casos en ambientes periurbanos o rurales. Dada su aglomeración en estos lugares sin adecuada protección, están a merced de las picaduras de los flebotomos, suponiendo focos de infección (Otranto y Dantas-Torres, 2013). Recientemente se ha descrito la elevada prevalencia en perreras en la provincia de Orense (Miró et al., 2012), de más del 30%, suponiendo un enorme incremento con respecto a la prevalencia en una muestra aleatoria de perros de esta provincia.

En América del Sur, particularmente en Brasil, la leishmaniosis visceral en humanos es un grave problema de salud pública, con 4.800-6.500 casos anuales y una mortalidad de entre el 7-10% (Travi, 2014), lo que ha llegado a sus autoridades a adoptar polémicas e ineficaces medidas, como la prohibición de tratar a los perros seropositivos con medicamentos de uso humano, medida basada en la posibilidad de generación de cepas resistentes del parásito, y el sacrificio de estos animales, medida que ha resultado ineficaz en el control de la enfermedad (Baneth, 2013; Romero y Boelaert, 2010). Las medidas de control no tuvieron en cuenta que un adecuado tratamiento de la leishmaniosis canina reduce de forma eficaz la infectividad de los perros a los flebotomos, como se ha demostrado (Miró et al., 2011; Ribeiro et al., 2008) lo que junto a medidas preventivas como el uso de repelentes llevaría a mejores resultados. En Italia por el contrario, se financia públicamente el tratamiento de la leishmaniosis canina, llevando a los perros callejeros infectados con leishmaniosis a perreras públicas y ser tratados, estando el sacrificio prohibido (Otranto y Dantas-Torres, 2013). En España se han empezado a implementar medidas con respecto a esta enfermedad: en la Comunidad Autónoma de Andalucía, la leishmaniosis canina se ha incluido en la lista de enfermedades de obligado tratamiento, obligando a los dueños a tratar a sus mascotas y realizarles las pruebas diagnósticas necesarias (Junta de Andalucía, 2010). En Castilla-La Mancha se ha implantado un programa zoonosológico que incluye la notificación de los casos de leishmaniosis canina al colegio de veterinarios, la obligatoriedad de realizar pruebas diagnósticas en centros autorizados y de prescribir repelentes en primavera y otoño (JCCM, 2014).

La resistencia a fármacos es uno de los principales problemas en la quimioterapia frente a la leishmaniosis (Croft et al., 2006). En numerosos ensayos clínicos en perros se ha descrito el fracaso terapéutico de diversos compuestos de uso en humanos, desde los antimoniales (Noli y Auxilia, 2005) hasta la miltefosina más reciente (Proverbio et al., 2014b). En el caso de los antimoniales, se han descrito distintos mecanismos de resistencia, entre ellos la baja acumulación de antimonio

debido a una baja entrada de éste o a su expulsión de la célula, destacando las aquagliceroporinas en el primero (Gourbal et al., 2004) y los transportadores tipo ABC en el segundo (Manzano et al., 2013; Pérez-Victoria et al., 2001)

Se ha comprobado la generación de resistencia a antimoniales en casos de leishmaniosis canina (Carrió y Portús, 2002; Gramiccia et al., 1992) aunque en estos casos no se ha caracterizado el origen de esa resistencia, limitándose a describir el fracaso terapéutico y la sensibilidad *in vitro* de los parásitos aislados antes y después del tratamiento.

En nuestro estudio se evidenció la falta de correlación entre la carga parasitaria en médula ósea y ganglio poplíteo en el análisis previo al tratamiento, es decir, en los perros con leishmaniosis canina adquirida de forma natural sin tratamiento. En el grupo de perros tratados con Glucantime®, en el perro 3 se observa un gran descenso en la carga parasitaria en médula ósea que no viene acompañado con una disminución de la carga parasitaria en ganglio poplíteo, tanto tras el tratamiento como en el análisis de seguimiento.

La cepa del parásito fue aislada de ganglio poplíteo de este perro por nuestro grupo de investigación en los cuatro momentos de análisis (días 0, 60, 120 y 210) y cedidas al Dr. Francisco Gamarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada) que realizó ensayos de susceptibilidad a antimonio, observando un incremento en la resistencia a antimonio a partir de la segunda serie de tratamiento, lo que podría explicar el fracaso terapéutico del Glucantime® en este animal. Este aumento en la resistencia se ha atribuido a niveles de expresión inferiores en la proteína aquagliceroporina-1, responsable del transporte de antimonio al interior del parásito (Gómez-Pérez et al., 2015).

Sumados a nuestros resultados, la bibliografía existente demuestra que el tratamiento con Glucantime® en monoterapia no conduce a la eliminación del parásito, ni a la mejora clínica sustancial de los animales (Noli y Auxilia, 2005), ni reduce la infectividad en los flebotomos a largo plazo (Alvar et al., 1994), llevando al desarrollo de resistencia en los animales tratados, con las consecuencias en términos de salud pública que acarrearía este desenlace.

Entre las medidas preventivas, en los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo en la búsqueda de antígenos de *Leishmania* como candidatos para su uso en vacunas, así como en la selección de adyuvantes adecuados. El desarrollo de una vacuna eficaz frente a la leishmaniosis canina sería muy deseable desde el punto de vista veterinario y de salud pública. La primera vacuna en ser aprobada para su

## VI. Discusión

uso en perros consistió en un ligando fucosa-manosa (una mezcla de glicoproteínas donde la gp36 es la más inmunogénica) purificado de *L. donovani* usando saponina QuilA como adyuvante. Esta vacuna obtuvo una eficacia del 80% en un estudio de campo y está comercializada en Brasil desde 2004 como Leishmune® (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

En Europa, se encuentra comercializada la vacuna Canileish®, que consiste en proteínas purificadas de excreción-secreción de *L. infantum* usando saponina QA-21 como adyuvante, con una eficacia del 57% en ensayos clínicos tras infectar experimentalmente perros vacunados y un 68% de eficacia clínica en estudios de campo (Gradoni, 2015).

Ninguna de ellas parece una vacuna ideal, aunque es posible que disminuyan el riesgo de infección y/o desarrollo de la enfermedad, especialmente en combinación con otras medidas preventivas. Es de esperar que en un futuro no muy lejano otros candidatos a vacuna que se están experimentando en la actualidad puedan demostrar su eficacia y ser comercializados (Carcelén et al., 2009).

El desarrollo de nuevas perspectivas en el tratamiento de la leishmaniosis y su aplicación en perros infectados para reducir la infectividad, sumado a medidas preventivas, parece el mejor camino a seguir para reducir la carga de la enfermedad en las zonas endémicas de leishmaniosis debida a *L. infantum*. El uso de medicamentos de uso humano en la leishmaniosis canina encuentra su justificación cuando este tratamiento se hace de forma correcta, recurriendo a combinaciones medicamentosas y añadiendo medidas preventivas.

### **Eficacia del MTC-305 en monoterapia y en combinación**

En esta tesis doctoral se ha demostrado la eficacia del MTC-305 en el tratamiento de la leishmaniosis canina. Tras el tratamiento con este compuesto, en todos los animales las cargas parasitarias de médula ósea, ganglio, sangre y pelo habían disminuido en el análisis realizado un mes tras acabar el tratamiento. Tras el periodo de seguimiento, cuatro meses tras acabar el tratamiento, solo se produjo un leve repunte de las cargas parasitarias.

La eficacia de este tratamiento no parece estar relacionada con una predisposición en los animales antes del tratamiento, ya que los perros tratados con MTC-305 mostraron el mismo patrón inmunológico que el grupo tratado con Glucantime®, con niveles IgG2 superiores a IgG1 y dominancia de IFN sobre IL4

En el grupo tratado con una combinación de MTC-305 (a dosis más bajas que cuando se utilizó en monoterapia) y Glucantime®, el tratamiento fue eficaz en todos los animales excepto en uno. Antes del tratamiento, las cargas parasitarias eran elevadas en médula ósea y ganglio poplíteo, con niveles de parasitación similares a los demás perros y títulos de IgG2 superiores a los de IgG1. Sin embargo, al contrario que en los anteriores grupos, los niveles de expresión relativos de IFNG e IL4 se encontraban muy igualados antes de empezar el tratamiento (con una mayor expresión de IL4 en el perro donde el tratamiento no se consideró eficaz), lo que pudo influir en la eficacia del tratamiento.

### **Eficacia del (-)- $\alpha$ -bisabolol**

Los perros del grupo que recibió como tratamiento (-)- $\alpha$ -bisabolol mostraban unos títulos de anticuerpos IgG<sub>total</sub> e IgG2 muy elevados e IgG1 bajos y niveles de IFNG más elevados que los de IL4, mostrándose ambos bajos en el análisis previo al tratamiento. El tratamiento fue eficaz en tres de los cuatro perros, en los que las cargas parasitarias disminuyeron tanto un mes después del tratamiento como en el análisis de seguimiento. De hecho, fue en el análisis de seguimiento en el que los perros donde el tratamiento fue eficaz mostraron mejores resultados, aumentando en ellos la expresión de IFNG.

El (-)- $\alpha$ -bisabolol es conocido por su actividad antiinflamatoria (Kim et al., 2011) y recientemente se ha descrito su efecto antiinflamatorio en células dendríticas, inhibiendo la secreción de distintas citoquinas relacionados con la respuesta Th1 como IL-12 (Marongiu et al., 2014) pero este efecto solo se encuentra al encapsular el compuesto con nanopartículas de PLGA. También recientemente se ha visto que este sesquiterpeno induce una cierta inmunosupresión en la piel (Frikeche et al., 2015) despertando un debate sobre su actividad anticancerosa y la falta de evidencia con respecto a su posible implicación en el sistema inmune (Chirumbolo, 2015).

La hipótesis de que este sesquiterpeno ejerce como un inmunoregulador, como se ha observado en nuestro estudio en los resultados en macrófagos, podría encontrar sentido con estos resultados donde la expresión de IFNG aumenta en perros que, a priori, mostraban niveles de esta citoquina muy bajos con respecto a otros perros del estudio. Por tanto parece imperativo realizar estudios sobre el mecanismo de acción de este compuesto natural en tanto a su naturaleza inmunomoduladora y comprobar si ese aumento en la expresión de IFNG se

## VI. Discusión

traduce en un aumento en la expresión de otras citoquinas o sustancias efectoras tipo Th1, como el óxido nítrico, en modelos animales.

### **Seguridad de los tratamientos**

El tratamiento fue bien tolerado por todos los grupos de perros: La seguridad del Glucantime® ha sido evaluada en muchos estudios (Borborema et al., 2013; Ikeda-García et al., 2007). En nuestro ensayo sólo provocó un episodio de diarreas en uno de los animales. No se observaron hepatotoxicidad ni toxicidad renal o pancreática debida al tratamiento en los análisis de los días 60 ó 120, aunque 4 de los perros perdieron más de un 5% del peso en el análisis del día 120, que no recuperaron.

En los perros tratados con MTC-305, desde el punto de vista del estado general de los perros solo uno de los perros sufrió una pérdida de peso superior al 5% tras la primera serie de tratamiento, que recuperó tras la segunda serie. El compuesto no provocó alteraciones gastrointestinales asociados al tratamiento.

No se observaron alteraciones en los marcadores asociados a la función renal ya que en solo un perro se incrementó ligeramente el nivel de urea en sangre en día 120, alteración que desapareció durante el seguimiento y en ninguno se incrementó el nivel de creatinina, principal parámetro utilizado para la clasificación de acuerdo con IRIS (International Renal Interest Society), (Cobrin et al., 2013). La clasificación propuesta por IRIS divide a los animales en distintos estadios de daño renal agudo atendiendo a la concentración en sangre de creatinina. Hubiera sido recomendable realizar un urianálisis para evaluar otros factores relacionados con la enfermedad renal como la proteinuria.

Con respecto a la función hepática, solo un perro mostró una ligera elevación del valor de GPT (ALT) en el día 120. Ese mismo perro mostró también en ese análisis una ligera elevación de los valores de fosfatasa alcalina pero sin mostrar anormalidades en los valores de bilirrubina total y bilirrubina directa. De hecho los valores de bilirrubina se normalizaron tras el tratamiento en la mayoría de los perros de este grupo, que mostraban valores anormalmente elevados en el análisis anterior al tratamiento.

En ensayos clínicos la elevación de entre 2-4 veces del valor de GPT (ALT) con respecto al límite superior de la normalidad puede ser motivo de preocupación, aunque este no fue nuestro caso. No hay valor concreto para la fosfatasa alcalina y la elevación de este parámetro en solitario es difícil de interpretar debido a la

contribución extrahepática a la enzima y a la posible inducción por parte del compuesto sin implicar daño hepático.

Para la identificación de daño hepático en ensayos clínicos se deben considerar al menos dos de los siguientes parámetros: GPT (ALT), GOT (AST), así como al menos dos de entre ALP (fosfatasa alcalina), GGT (gamma glutamil transpeptidasa) y BD (bilirrubina directa) o BI (bilirrubina indirecta) para el daño hepatobiliar. También se recomiendan otros como proteína total y albúmina. Se consideran indicativos de daño hepatocelular el incremento sobre 2 veces del límite superior del rango considerado normal y un incremento por encima de 3 veces el límite superior; sumado a un incremento de dos veces el límite superior de la bilirrubina total son indicativos de daño hepático severo, poniendo en peligro la vida (Boone et al., 2005).

Con respecto al páncreas, la amilasa pancreática aumentó sin superar el límite en ninguno de los animales en el análisis del día 120; sin embargo estas elevaciones no son indicativas si se considera solo este parámetro (Aste et al., 2005; Mansfield, 2012). Un único perro mostró un ligero aumento de lipasa pancreática que remitió en el periodo de seguimiento. Ninguno de estos dos parámetros es capaz de identificar daño pancreático ya que muchos animales con pancreatitis aguda no muestran elevaciones séricas en estas enzimas (Mansfield et al. 2012) aunque ningún animal mostró signos de esta afectación como vómitos o anorexia.

El Vorinostat o SAHA, producto del que deriva el MTC-305 es un compuesto poco o nada tóxico cuya seguridad ha sido evaluado en distintos modelos preclínicos. En el perro solo mostró alteraciones gastrointestinales y se estableció una dosis en la que no se observan efectos adversos de 60 mg/kg y no mostró alteraciones cardíaca, incluyendo las del intervalo QTc. En pruebas de toxicidad *in vitro*, el SAHA ha mostrado mutagenicidad débil en el test de Ames y no ha mostrado efectos sobre los canales de potasio hERG (Kerr et al., 2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos por la Fundación Medina (Granada), el MTC-305 es un compuesto sin potencial mutagénico (test de Ames) ni actividad sobre los canales de potasio hERG, suponiendo unos resultados prometedores a la hora de la evaluación de su seguridad.

En los perros tratados con la combinación de MTC-305 y Glucantime®, la seguridad tampoco se vio comprometida, aunque cuatro perros perdieron peso tras la primera serie de tratamiento más de un 5% de peso en el día 120, recuperándolo luego tres de ellos en el seguimiento. Es lógico pensar que el

## VI. Discusión

tratamiento combinado de estos dos compuestos sea más agresivo que individualmente. Sin embargo, ninguno de los perros sufrió alteraciones gastrointestinales.

La función renal no mostró alteraciones con respecto al análisis previo al tratamiento, manteniéndose los niveles de creatinina normales en todos los perros y sin aparecer alteraciones en el nivel de urea.

Con respecto a la función hepática, ningún perro mostró elevaciones de las transaminasas. Uno de los perros sí mostró un ligero daño hepatobiliar, con elevaciones de la bilirrubina total, bilirrubina directa y fosfatasa alcalina, aunque este perro fue el único donde el tratamiento no fue eficaz en el día 120. Estas alteraciones desaparecieron durante el periodo de seguimiento.

Con respecto al páncreas, solo un animal mostró un valor alterado tras la primera serie de tratamiento, que remitió en la segunda (día 120). Los valores de lipasa pancreática no aumentaron de media ni individualmente a lo largo del ensayo.

En cuanto a la seguridad del tratamiento con (-)- $\alpha$ -bisabolol por vía oral, el aspecto general de los perros mejoró y sólo uno mostró una pérdida de peso superior al 5% en el día 120 que recuperó en el siguiente análisis. No se produjeron alteraciones gastrointestinales en los animales.

La función renal no pareció verse afectada por el tratamiento: uno de los perros mostró niveles de creatinina ligeramente superiores al límite máximo en el análisis del día 120, aunque se trataba del perro en el que el tratamiento no fue eficaz y cuyo estado empeoró, acompañándose de un nivel elevado de urea en sangre. Hubo elevaciones puntuales de urea durante el tratamiento también (día 120), que remitieron tras el periodo de seguimiento.

Con respecto a la función hepática uno de los perros mostró elevación en el nivel de GPT (ALT) de un 30% sobre el límite máximo tras el tratamiento (día 120) y durante el periodo de seguimiento (día 210) sin estar acompañada de otros valores, por lo que carece de una interpretación clara. La función hepatobiliar solo se vio alterada en el perro donde el tratamiento no fue eficaz, con elevación de los niveles de bilirrubina total y bilirrubina directa dos veces sobre el límite máximo en el análisis del día 120, que podría ser consecuencia de la función renal alterada causada por la enfermedad. Estas alteraciones no se acompañaron de alteración en la fosfatasa alcalina.

En el caso del páncreas solo se encontró una ligera elevación de amilasa pancreática que fue puntual mientras que los niveles de lipasa fueron normales en los análisis de los días 60 y 120.

En definitiva, este compuesto natural administrado por vía oral no mostró evidencia de toxicidad sobre las distintas funciones vitales de los animales; sólo un perro presentó un patrón de toxicidad clara que debe ser atribuido al progreso y empeoramiento de la enfermedad más que al tratamiento con este sesquiterpeno.

### **Las enzimas histona desacetilasa de *Leishmania***

Con respecto al estudio de las enzimas Histona Desacetilasa en *L. mexicana*, se encontraron mediante análisis bioinformático las mismas enzimas que en *T. brucei*, como ya se había descrito anteriormente (Alonso y Serra, 2012). En este trabajo de tesis doctoral se ha conseguido localizar dos de las enzimas estudiadas. La primera se trata de Sir2 RP1 que es la sirtuina más estudiada en *Leishmania*. Encontramos que es una enzima citoplasmática, resultado que coincide con los obtenidos por otros autores (Fessel et al., 2011) por lo que su función podría estar relacionada con la acetilación de proteínas plasmáticas, en particular de la  $\alpha$ -tubulina, presente en el citoesqueleto del parásito.

Además y por primera vez, hemos logrado localizar una enzima HDAC en *Leishmania*. Se trata de la enzima DAC3 y su localización parece estar asociada a la mitocondria del parásito ya que no se reparte de forma homogénea por el citoplasma, sino que se acumula en distintos sitios. Sin embargo, este hecho debería ser confirmado utilizando marcadores mitocondriales fluorescentes que determinen la co-localización de la enzima y la mitocondria. Su posible función podría estar relacionada con el metabolismo energético del parásito y con la acetilación de las enzimas implicadas. Esta localización es distinta a la observada en la enzima ortóloga de *T. brucei*, donde DAC3 es una enzima localizada en el núcleo y cuya función es esencial para la supervivencia del parásito (Ingram y Horn, 2002).

## VII. Conclusions



## VII. Conclusions

1. The five tested compounds that displayed high *in vitro* activity against *L. infantum* intracellular amastigotes without showing cytotoxicity against mammal cells, share the O-alkylated hydroxamate group. Their efficacy against *Leishmania*, regardless of their lack of activity against human HDAC, highlights the difference between human and trypanosomatid HDAC, uncovering new perspectives for the design of new compounds against leishmaniasis.
2. None of the five active compounds against *L. infantum* intracellular amastigotes turned out to be effective against the promastigote stage, even at high concentration, revealing a stage specific activity.
3. Vehiculization through PLGA or gold nanoparticles, particularly the latter, facilitated *in vivo* administration of these compounds without impairing activity or increasing toxicity, solving the administration issues of poorly soluble compounds.
4. In the murine visceral leishmaniasis model, treatment with MTC-305 vehiculized through gold nanoparticles at 25 mg/kg/day for 14 days was more effective than Glucantime® (104 mg Sb<sup>V</sup>/kg) at reducing spleen parasite load, showing as effective as the antimonial compound in the liver without causing adverse effects on infected mice.
5. Treatment with a combination of MTC-305 (6,25 mg/kg) and Glucantime® showed synergistic effects, improving treatment with those compounds separately and leading to the elimination of the parasite in both target organs, spleen and liver, without affecting mice safety. This fact highlights the possibility of the use of this hydroxamic derivative in drug combinations.
6. The compound MDG was more effective *in vivo* than MTC-305, thus reducing more than 98% of spleen and liver parasite loads at the same dosage (25 mg/kg/day) with a shorter treatment course (10 days), without showing toxic effects on healthy or infected mice. In addition to its improved solubility, this compound can resist acidic medium, therefore enabling its oral administration theoretically.
7. Genes codifying for six HDAC enzymes were found through bioinformatic analysis in the *Leishmania* genome (four zinc-dependent and two NAD<sup>+</sup>-dependent HDAC). These are orthologous to those found in *T. brucei*. The enzyme DAC3 seems to be associated to the parasite mitochondria in *L. mexicana*, in contrast to its nuclear localization in *T. brucei*. This facts might suggest an involvement of this protein with the energetic metabolism of the parasite.

8. (-)- $\alpha$ -Bisabolol is a non-toxic compound that has proved effective in a murine model of visceral leishmaniasis through oral route. It is more effective than Glucantime® at reducing spleen parasite load and as effective as the antimonial at reducing liver parasite load.
9. The activity of this sesquiterpene is stage independent. Its mechanism of action is related to the parasite resistance to nitric oxide through mitochondrial damage. Moreover, it seems to increase nitric oxide synthesis on infected macrophages.
10. In dogs with naturally acquired canine leishmaniasis, a positive association among the clinical status of the animals, bone marrow, lymph node and hair parasite loads was found. A mixed Th1/Th2 immune response was found in all dogs, with a mild imbalance towards Th1 or Th2 in some animals.
11. Hair parasite load showed a strong positive correlation with lymph node and blood parasite loads, and a negative correlation with the coefficient IFNG/IL4, strengthening its potential as a biomarker for treatment evaluation.
12. In the clinical trial, treatment with Glucantime® was effective in two out of the six dogs treated and it caused mild hematological, biochemical, and gastrointestinal alterations along with weight loss, confirming the toxicity of current available treatment. This low effectiveness can be partially attributed to the development of resistance.
13. The synthetic compound MTC-305 showed a high efficacy in the treatment of canine leishmaniasis as it reduced the parasite load in every evaluated tissue of the treated dogs and it improved their clinical status, showing more effective than the antimonial standard. The treatment with MTC-305 was safe as it only caused mild biochemical alterations that returned to normal values during the follow-up period and dogs did not show any damage pattern compatible with vital functions.
14. Combination treatment of MTC-305 (at a lower dosage) and Glucantime® was at least as effective as the reference treatment but it did not improve treatment with MTC-305 as monotherapy. However, the safety of the animal was not affected, reinforcing the possibility of combining MTC-305 with other compounds.
15. Treatment with the natural compound (-)- $\alpha$ -bisabolol was effective in three out of four dogs, and this activity was particularly high during the follow-up period, when its efficacy was maximum. This sesquiterpene induced a Th1 immune response by increasing interferon- $\gamma$  expression level in treated dogs, strengthening its possible role as immunomodulator noticed *in vitro*.

## VII. Conclusions

## VIII. Bibliografía

## VIII. Bibliografía

- Acedo Sánchez, C., Martín Sánchez, J., Vélez Bernal, I.D., Sanchís Marín, M.C., Louassini, M., Maldonado, J.A., Morillas Márquez, F., 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 26, 303–10.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A. V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R., The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399–451. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x
- Agbor-Enoh, S., Seudieu, C., Davidson, E., Dritschilo, A., Jung, M., 2009. Novel inhibitor of Plasmodium histone deacetylase that cures *P. berghei*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1727–34. doi:10.1128/AAC.00729-08
- Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., Sacks, D.L., 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of Leishmania in the sand fly vector. *Science* 324, 265–8. doi:10.1126/science.1169464
- Alcolea, P.J., Alonso, A., Gómez, M.J., Postigo, M., Molina, R., Jiménez, M., Larraga, V., 2014. Stage-specific differential gene expression in Leishmania infantum: from the foregut of Phlebotomus perniciosus to the human phagocyte. *BMC Genomics* 15, 849. doi:10.1186/1471-2164-15-849
- Aliaga, L., Cobo, F., Mediavilla, J.D., Bravo, J., Osuna, A., Amador, J.M., Martín-Sánchez, J., Cordero, E., Navarro, J.M., 2003. Localized mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Leishmania) infantum: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)*. 82, 147–58. doi:10.1097/01.md.0000076009.64510.b8
- Alonso, V.L., Serra, E.C., 2012. Lysine acetylation: elucidating the components of an emerging global signaling pathway in trypanosomes. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 452934. doi:10.1155/2012/452934
- Alsford, S., Kawahara, T., Isamah, C., Horn, D., 2007. A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. *Mol. Microbiol.* 63, 724–736. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05553.x
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., Moreno, J., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 334–59, table of contents. doi:10.1128/CMR.00061-07
- Alvar, J., Blazquez, J., Najera, R., 1989. Association of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *J. Infect. Dis.* 160, 560–1.

## VIII. Bibliografía

- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 298–319.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88. doi:10.1016/S0065-308X(04)57001-X
- Alvar, J., Jiménez, M., 1994. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS* 8, 854.
- Alvar, J., Molina, R., San Andrés, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., González, F., San Andrés, M.D., Boggio, J., Rodriguez, F., 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88, 371–378.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Alves, A. de M.H., Gonçalves, J.C.R., Cruz, J.S., Araújo, D.A.M., 2010. Evaluation of the sesquiterpene (-)-alpha-bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. *Neurosci. Lett.* 472, 11–5. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.042
- Amusategui, I., Sainz, A., Aguirre, E., Tesouro, M.A., 2004. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 154–7. doi:10.1196/annals.1307.022
- Andrade, H.M., Toledo, V.P.C.P., Pinheiro, M.B., Guimarães, T.M.P.D., Oliveira, N.C., Castro, J. a., Silva, R.N., Amorim, a. C., Brandão, R.M.S.S., Yoko, M., Silva, a. S., Dumont, K., Ribeiro, M.L., Bartchewsky, W., Monte, S.J.H., 2011. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet. Parasitol.* 181, 83–90. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.009
- Andrews, K.T., Gupta, A.P., Tran, T.N., Fairlie, D.P., Gobert, G.N., Bozdech, Z., 2012. Comparative gene expression profiling of *P. falciparum* malaria parasites exposed to three different histone deacetylase inhibitors. *PLoS One* 7, e31847. doi:10.1371/journal.pone.0031847
- Andrews, K.T., Tran, T.N., Lucke, A.J., Kahnberg, P., Le, G.T., Boyle, G.M., Gardiner, D.L., Skinner-Adams, T.S., Fairlie, D.P., 2008. Potent antimalarial activity of histone deacetylase inhibitor analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1454–61. doi:10.1128/AAC.00757-07
- Andrews, K.T., Walduck, A., Kelso, M.J., Fairlie, D.P., Saul, A., Parsons, P.G., 2000. Anti-malarial effect of histone deacetylation inhibitors and mammalian tumour cytodifferentiating agents. *Int. J. Parasitol.* 30, 761–768.
- Anthony, J.-P., Fyfe, L., Smith, H., 2005. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.* 21, 462–8. doi:10.1016/j.pt.2005.08.004
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez,

- a. M., Pérez, a. M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 18, 20546. doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20546
- Arevalo, I., Tulliano, G., Quispe, A., Spaeth, G., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., Pollack, H., 2007. Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1549–54. doi:10.1086/518172
- Arnida, Janát-Amsbury, M.M., Ray, A., Peterson, C.M., Ghandehari, H., 2011. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 417–23. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.010
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–81.
- Ashutosh, Sundar, S., Goyal, N., 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J. Med. Microbiol.* 56, 143–53. doi:10.1099/jmm.0.46841-0
- Aste, G., Di Tommaso, M., Steiner, J.M., Williams, D. a., Boari, a., 2005. Pancreatitis associated with N-methyl-glucamine therapy in a dog with leishmaniasis. *Vet. Res. Commun.* 29, 269–272. doi:10.1007/s11259-005-0059-4
- Asthana, J., Kuchibhatla, A., Jana, S.C., Ray, K., Panda, D., 2012. Dynein light chain 1 (LC8) association enhances microtubule stability and promotes microtubule bundling. *J. Biol. Chem.* 287, 40793–805. doi:10.1074/jbc.M112.394353
- Athanasidou, L. V., Saridomichelakis, M.N., Kontos, V.I., Spanakos, G., Rallis, T.S., 2013. Treatment of canine leishmaniasis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Vet. Parasitol.* 192, 91–97. doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.011
- Augustyns, K., Amsoms, K., Yamani, A., Rajan, P.K., Haemers, A., 2001. Trypanothione as a target in the design of antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1117–41.
- Balestieri, F.M.P., Queiroz, A.R.P., Scavone, C., Costa, V.M.A., Barral-Netto, M., Abrahamssohn, I. de A., 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.* 4, 23–9.
- Baneth, G., 2013. Canine leishmaniasis: Bridging science, public health and politics. *Vet. J.* 198, 9–10. doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.011
- Baneth, G., Aroch, I., 2008. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.* 175, 14–15. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.011
- Baneth, G., Shaw, S.E., 2002. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 106, 315–324. doi:10.1016/S0304-4017(02)00115-2
- Barbosa, M. a G., Alexandre-Pires, G., Soares-Clemente, M., Marques, C., Rodrigues, O.R., De Brito, T.V., Da Fonseca, I.P., Alves, L.C., Santos-Gomes, G.M., 2011. Cytokine Gene Expression in

## VIII. Bibliografía

- the Tissues of Dogs Infected by *Leishmania infantum*. *J. Comp. Pathol.* 145, 336–344. doi:10.1016/j.jcpa.2011.03.001
- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrino, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 192, 43–50. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.007
- Bento, D.B., de Souza, B., Steckert, A. V., Dias, R.O., Leffa, D.D., Moreno, S.E., Petronilho, F., de Andrade, V.M., Dal-Pizzol, F., Romão, P.R., 2013. Oxidative stress in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate. *Res. Vet. Sci.* 95, 1134–41. doi:10.1016/j.rvsc.2013.08.004
- Berridge, M. V., Herst, P.M., Tan, A.S., 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 127–52. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7
- Bhatia, S.P., McGinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M., 2008. Fragrance material review on alpha-bisabolol. *Food Chem. Toxicol.* 46 Suppl 1, S72–6. doi:10.1016/j.fct.2008.06.025
- Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K., 2007. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 196, 591–8. doi:10.1086/519690
- Boceta, C., Alonso, C., Jiménez-Ruiz, A., 2000. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 22, 55–62.
- Boelaert, M., Verdonck, K., Menten, J., Sunyoto, T., van Griensven, J., Chappuis, F., Rijal, S., 2014. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease, in: Boelaert, M. (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, p. CD009135. doi:10.1002/14651858.CD009135.pub2
- Boggiatto, P.M., Ramer-Tait, A.E., Metz, K., Kramer, E.E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J.M., Gallup, J.M., Jones, D.E., Petersen, C. a., 2010. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 267–273. doi:10.1128/CVI.00456-09
- Boiani, M., Boiani, L., Merlino, A., Hernández, P., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Cerecetto, H., González, M., 2009. Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 4426–33. doi:10.1016/j.ejmech.2009.06.014
- Boone, L., Meyer, D., Cusick, P., Ennulat, D., Bolliger, a P., Everds, N., Meador, V., Elliott, G., Honor, D., Bounous, D., Jordan, H., 2005. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 182–188.

doi:10.1111/j.1939-165X.2005.tb00041.x

- Borborema, S.E.T., Osso Junior, J.A., de Andrade Junior, H.F., do Nascimento, N., 2013. Biodistribution of meglumine antimoniate in healthy and *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi-infected BALB/c mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 623–630. doi:10.1590/0074-0276108052013014
- Bourdeau, P., Saridomichelakis, M.N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., Foglia Manzillo, V., Koutinas, A.F., Pereira da Fonseca, I., Miró, G., 2014. Management of canine leishmaniasis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit. Vectors* 7, 110. doi:10.1186/1756-3305-7-110
- Bourdoiseau, G., Marchal, T., Magnol, J.P., 1997. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 439–440. doi:10.1177/104063879700900421
- Boyom, F.F., Ngouana, V., Zollo, P.H.A., Menut, C., Bessiere, J.M., Gut, J., Rosenthal, P.J., 2003. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry* 64, 1269–75.
- Bretagne, S., Durand, R., Olivi, M., Garin, J.F., Sulahian, A., Rivollet, D., Vidaud, M., Deniau, M., 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 828–31. doi:10.1128/CDLI.8.4.828-831.2001
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Burza, S., Nabi, E., Mahajan, R., Mitra, G., Lima, M.A., 2013. One-year follow-up of immunocompetent male patients treated with miltefosine for primary visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Clin. Infect. Dis.* 57, 1363–4. doi:10.1093/cid/cit508
- Calvo-Álvarez, E., Stamatakis, K., Punzón, C., Álvarez-Velilla, R., Tejería, A., Escudero-Martínez, J.M., Pérez-Pertejo, Y., Fresno, M., Balaña-Fouce, R., Reguera, R.M., 2015. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for in vitro, ex vivo and in vivo models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003666. doi:10.1371/journal.pntd.0003666
- Campino, L., Maia, C., 2010. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Med. Port.* 23, 859–64.
- Carcelén, J., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Serrano, F., Parejo, J.C., Corraliza, I., Gallardo-Soler, A., Marañón, F., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, C., 2009. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* 27, 5964–73. doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.069
- Cardoso, L., Schallig, H.D.F.H., Cordeiro-da-Silva, a., Cabral, M., Alunda, J.M., Rodrigues, M., 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 35–41.

## VIII. Bibliografía

doi:10.1016/j.vetimm.2007.01.014

- Carrillo, A.K., Guiguemde, W.A., Guy, R.K., 2015. Evaluation of histone deacetylase inhibitors (HDACi) as therapeutic leads for human African trypanosomiasis (HAT). *Bioorg. Med. Chem.* 23, 5151–5. doi:10.1016/j.bmc.2014.12.066
- Carrillo, E., Ahmed, S., Goldsmith-Pestana, K., Nieto, J., Osorio, Y., Travi, B., Moreno, J., McMahon-Pratt, D., 2007. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 25, 1534–43. doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.036
- Carrillo, E., Moreno, J., 2009. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 67–70. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.310
- Carrillo, E., Moreno, J., Cruz, I., 2013. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? *Trends Parasitol.* 29, 579–80. doi:10.1016/j.pt.2013.10.007
- Carrió, J., Portús, M., 2002. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol.* 2, 11. doi:10.1186/1471-2210-2-11
- Carson, C., Quinnell, R.J., Day, M.J., Courtenay, O., 2010. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133, 264–268. doi:10.1016/j.vetimm.2009.07.017
- Carter, K.C., O’Grady, J., Dolan, T.F., Baillie, a. J., Alexander, J., Keys, J., 1989. A direct comparison of sodium stibogluconate treatment in two animal models of human visceral leishmaniasis, mouse and hamster. *Int. J. Pharm.* 53, 129–137. doi:10.1016/0378-5173(89)90236-6
- Carvalho, L., Luque-Ortega, J.R., López-Martín, C., Castanys, S., Rivas, L., Gamarro, F., 2011. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4204–10. doi:10.1128/AAC.00520-11
- Cavaliere, E., Bergamini, C., Mariotto, S., Leoni, S., Perbellini, L., Darra, E., Suzuki, H., Fato, R., Lenaz, G., 2009. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in alpha-bisabolol induced apoptosis. *FEBS J.* 276, 3990–4000. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07108.x
- Cavaliere, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., de Prati, A.C., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R., Suzuki, H., 2004. alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 589–94. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.088
- Cavaliere, T., Arnold, P., Mathis, a, Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P., 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 330–334.

- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73, 203–66.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873–82. doi:10.1038/nrmicro1748
- Chellat, F., Merhi, Y., Moreau, A., Yahia, L., 2005. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials* 26, 7260–75. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.044
- Chen, W., Hou, J., Yin, Y., Jang, J., Zheng, Z., Fan, H., Zou, G., 2010. alpha-Bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NFkappaB. *Biochem. Pharmacol.* 80, 247–54. doi:10.1016/j.bcp.2010.03.021
- Chiba, M., Ishii, Y., Sugiyama, Y., 2009. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *AAPS J.* 11, 262–76. doi:10.1208/s12248-009-9103-6
- Chirumbolo, S., 2015. Alpha-bisabolol, not a matter for cancer therapy. Commentary: “Research on the immunosuppressive activity of ingredients contained in sunscreens.” *Front. Pharmacol.* 6, Article 96 (p1–3). doi:10.3389/fphar.2015.00096
- Clayton, C., Shapira, M., 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156, 93–101. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.007
- Cobo, F., Aliaga, L., Talavera, P., Concha, Á., 2007. The histological spectrum of non-granulomatous localized mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101, 689–694. doi:10.1179/136485907X229095
- Cobrin, a R., Blois, S.L., Kruth, S. a, Abrams-Ogg, a C.G., Dewey, C., 2013. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *J. Small Anim. Pract.* 54, 647–55. doi:10.1111/jsap.12150
- Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P.M., Matheron, S., 2012. Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 704–6. doi:10.3201/eid1804.110841
- Colares, A.V., Almeida-Souza, F., Taniwaki, N.N., Souza, C.D.S.F., Da Costa, J.G.M., Calabrese, K.D.S., Abreu-Silva, A.L., 2013. In vitro antileishmanial activity of essential oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) baker. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/727042
- Collantes, F., Ortega, E.M., 1997. Sobre la validez taxonómica de *Phlebotomus longicuspis* (Nitzulescu, 1931) (Diptera: Psychodidae). *Boln. Asoc. esp. Ent.* 21, 141–146.

## VIII. Bibliografía

- Collins, M.I., 1992. Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse : sodium stibogluconate treatment during acute and chronic stages of infection : II . Changes in tissue drug distribution. *Int. J. Pharm.* 57, 23–28.
- Corpas-López, V., Morillas-Márquez, F., Navarro-Moll, M.C., Merino-Espinosa, G., Díaz-Sáez, V., Martín-Sánchez, J., 2015. (–)- $\alpha$ -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J. Nat. Prod.* 78, 1202–1207. doi:10.1021/np5008697
- Costa, D.J., Carvalho, R.M. de A., Abbehusen, M., Teixeira, C., Pitombo, M., Trigo, J., Nascimento, F., Amorim, L., Abreu-Silva, A.L., do Socorro Pires Cruz, M., Miranda, J.C., Fukutani, K., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., 2013. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One* 8, e60535. doi:10.1371/journal.pone.0060535
- Croft, S.L., Coombs, G.H., 2003. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 19, 502–8.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111–126. doi:10.1128/CMR.19.1.111-126.2006
- Croft, S.L., Yardley, V., Oto, Z., Merle, a S., 1999. Animal Models of Visceral Leishmaniasis. *Handb. Anim. Model. Infect.* 783–787.
- Da Silva, S.M., Amorim, I.F.G., Ribeiro, R.R., Azevedo, E.G., Demicheli, C., Melo, M.N., Tafuri, W.L., Gontijo, N.F., Michalick, M.S.M., Frézard, F., 2012. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2858–2867. doi:10.1128/AAC.00208-12
- Dantas-Torres, F., Baneth, G., Miró, G., Cardoso, L., Oliva, G., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Otranto, D., 2014. Further thoughts on “Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector”. *Vet. Parasitol.* 204, 443–4. doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.018
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. When is an “asymptomatic” dog asymptomatic? *Vet. Parasitol.* 202, 341–2. doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.008
- Darkin-Ratray, S.J., Gurnett, a M., Myers, R.W., Dulski, P.M., Crumley, T.M., Allocco, J.J., Cannova, C., Meinke, P.T., Colletti, S.L., Bednarek, M. a, Singh, S.B., Goetz, M. a, Dombrowski, a W., Polishook, J.D., Schmatz, D.M., 1996. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13143–13147. doi:10.1073/pnas.93.23.13143
- Darra, E., Abdel-Azeim, S., Manara, A., Shoji, K., Maréchal, J.-D., Mariotto, S., Cavalieri, E., Perbellini, L., Pizza, C., Perahia, D., Crimi, M., Suzuki, H., 2008. Insight into the apoptosis-inducing action of  $\alpha$ -bisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and Bid. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 113–23. doi:10.1016/j.abb.2008.02.004

- Das, S., Roy, P., Mondal, S., Bera, T., Mukherjee, A., 2013. One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 107, 27–34. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.01.061
- Das, V.N., Ranjan, A., Sinha, A.N., Verma, N., Lal, C.S., Gupta, A.K., Siddiqui, N.A., Kar, S.K., 2001. A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral leishmaniasis. *J. Assoc. Physicians India* 49, 609–13.
- Day, M.J., 2007. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet. Parasitol.* 147, 2–8. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.037
- Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Veronica, J., Sundar, S., Maurya, R., 2015. In vitro and in vivo evaluation of anti-leishmanial and immunomodulatory activity of Neem leaf extract in *Leishmania donovani* infection. *Exp. Parasitol.* 153, 45–54. doi:10.1016/j.exppara.2015.02.011
- de Andrade, I.L., Bezerra, J.N.S., Lima, M.A.A., de Faria, R.A.P.G., Lima, M.A.S., Andrade-Neto, M., Cavalcanti, F.S., Mesquita, A.L.M., 2004. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* baker against *Bemisia argentifolii*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5879–81. doi:10.1021/jf049788l
- de Carvalho, R.F., Ribeiro, I.F., Miranda-Vilela, A.L., de Souza Filho, J., Martins, O.P., de Oliveira Cintra e Silva, D., Tedesco, A.C., Lacava, Z.G.M., Bão, S.N., Sampaio, R.N.R., 2013. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp. Parasitol.* 135, 217–222. doi:10.1016/j.exppara.2013.07.008
- de La Rosa, R., Pineda, J.A., Delgado, J., Macías, J., Morillas, F., Mira, J.A., Sánchez-Quijano, A., Leal, M., Lissen, E., 2002. Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 40, 762–7.
- de Morais, S.M., Vila-Nova, N.S., Bevilaqua, C.M.L., Rondon, F.C., Lobo, C.H., de Alencar Araripe Noronha Moura, A., Sales, A.D., Rodrigues, A.P.R., de Figueiredo, J.R., Campello, C.C., Wilson, M.E., de Andrade, H.F., 2014. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 6250–5. doi:10.1016/j.bmc.2014.08.020
- De Muylder, G., Ang, K.K.H., Chen, S., Arkin, M.R., Engel, J.C., McKerrow, J.H., 2011. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1253. doi:10.1371/journal.pntd.0001253
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–8.

## VIII. Bibliografía

- Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2014. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. *Vet. Parasitol.* 202, 119–127.
- do Socorro S Rosa, M. do S.S., Mendonça-Filho, R.R., Bizzo, H.R., de Almeida Rodrigues, I., Soares, R.M.A., Souto-Padrón, T., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., 2003. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1895–901.
- Don, R., Ioset, J.-R., 2014. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 141, 140–6. doi:10.1017/S003118201300142X
- Dorlo, T.P.C., Balasegaram, M., Beijnen, J.H., de Vries, P.J., 2012a. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2576–97. doi:10.1093/jac/dks275
- Dorlo, T.P.C., Eggelte, T.A., Schoone, G.J., de Vries, P.J., Beijnen, J.H., 2012b. A poor-quality generic drug for the treatment of visceral leishmaniasis: a case report and appeal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1544. doi:10.1371/journal.pntd.0001544
- Dorlo, T.P.C., Rijal, S., Ostyn, B., de Vries, P.J., Singh, R., Bhattarai, N., Uranw, S., Dujardin, J.-C., Boelaert, M., Beijnen, J.H., Huitema, A.D.R., 2014. Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. *J. Infect. Dis.* 210, 146–53. doi:10.1093/infdis/jiu039
- Dorlo, T.P.C., van Thiel, P.P.A.M., Schoone, G.J., Stienstra, Y., van Vugt, M., Beijnen, J.H., de Vries, P.J., 2011. Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1436. doi:10.1371/journal.pntd.0001436
- Dostálová, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* 5, 276. doi:10.1186/1756-3305-5-276
- Earle, W.R., Sanford, K.K., Evans, V.J., Waltz, H.K., Shannon, J.E., 1951. The influence of inoculum size on proliferation in tissue cultures. *J. Natl. Cancer Inst.* 12, 133–53.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C., Croft, S.L., 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 81, 151–7.
- Faucher, B., Pomares, C., Fourcade, S., Benyamine, A., Marty, P., Pratlong, L., Faraut, F., Mary, C., Piarroux, R., Dedet, J.-P., Pratlong, F., 2011. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. *J. Infect.* 63, 76–82. doi:10.1016/j.jinf.2011.03.012
- Fessel, M.R., Lira, C.B., Giorgio, S., Ramos, C.H.I., Cano, M.I.N., 2011. Sir2-Related Protein 1 from

- Leishmania amazonensis* is a glycosylated NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase. *Parasitology* 138, 1245–58. doi:10.1017/S0031182011001077
- Fiebig, M., Gluenz, E., Carrington, M., Kelly, S., 2014. SLaP Mapper: a webserver for identifying and quantifying spliced-leader addition and polyadenylation site usage in kinetoplastid genomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 196, 10–13. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.07.012
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Foglia Manzillo, V., Restucci, B., Pagano, A., Gradoni, L., Oliva, G., 2006. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet. Rec.* 158, 690–4.
- Fortin, A., Hendrickx, S., Yardley, V., Cos, P., Jansen, H., Maes, L., 2012. Efficacy and tolerability of oleylphosphocholine (OLPC) in a laboratory model of visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2707–2712. doi:10.1093/jac/dks273
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, a., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, a., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011
- Freitas-Junior, L.H., Chatelain, E., Kim, H.A., Siqueira-Neto, J.L., 2012. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist.* 2, 11–9. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.003
- Frikeche, J., Couteau, C., Roussakis, C., Coiffard, L.J.M., 2015. Research on the immunosuppressive activity of ingredients contained in sunscreens. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 211–8. doi:10.1007/s00403-014-1528-9
- Fumarola, L., Spinelli, R., Brandonisio, O., 2004. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res. Microbiol.* 155, 224–30. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.001
- Gállego, M., 2004. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis. *Rev. Sci. Tech.* 23, 661–76.
- Gangneux, J.P., Dullin, M., Sulahian, A., Garin, Y.J.F., Derouin, F., 1999. Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 172–174.
- García, A.L., Parrado, R., De Doncker, S., Bermudez, H., Dujardin, J., 2007. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 368–71. doi:10.1016/j.trstmh.2006.06.009
- Garnock-Jones, K.P., 2015. Panobinostat: First Global Approval. *Drugs* 75, 695–704. doi:10.1007/s40265-015-0388-8
- Giavedoni, P., Iranzo, P., Fuertes, I., Estrach, T., Alsina Gibert, M., 2015. Cutaneous Leishmaniasis: 20 Years' Experience in a Spanish Tertiary Care Hospital. *Actas Dermosifiliogr.* 106, 310–

## VIII. Bibliografía

316. doi:10.1016/j.adengl.2015.03.005
- Gil Collado, J., Morillas Márquez, F., Sanchis Marín, M.C., 1989. Phlebotomus in Spain. Rev. Sanid. Hig. Publica (Madr). 63, 15–34.
- Giudice, A., Camada, I., Leopoldo, P.T.G., Pereira, J.M.B., Riley, L.W., Wilson, M.E., Ho, J.L., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., Almeida, R.P., 2007. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. BMC Infect. Dis. 7, 7. doi:10.1186/1471-2334-7-7
- Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O.A., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2008. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 121, 23–33. doi:10.1016/j.vetimm.2007.07.009
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F., Couto, C.G., 2009. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. Vet. J. 179, 259–63. doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.014
- Gómez-Pérez, V., García-Hernández, R., Corpas-López, V., Martín-Sánchez, J., Castanys, S., Gamarro, F., 2015. Failure of antimonial treatment associated with drug resistance in a dog with natural Leishmania infantum infection, in: COST ACTION CM1307. 2nd Conference/CaPF Joint Meeting. Belgrade (Serbia).
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M., Rosen, B.P., Mukhopadhyay, R., 2004. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in Leishmania by an Aquaglyceroporin. J. Biol. Chem. 279, 31010–31017. doi:10.1074/jbc.M403959200
- Gradoni, L., 2015. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. Vet. Parasitol. 208, 94–100. doi:10.1016/j.vetpar.2015.01.003
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Orsini, S., 1992. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of Leishmania infantum isolated from dogs after several courses of drug treatment. Ann. Trop. Med. Parasitol. 86, 613–20.
- Grant, S., Easley, C., Kirkpatrick, P., 2007. Vorinostat. Nat. Rev. Drug Discov. 6, 21–2. doi:10.1038/nrd2227
- Guerrant, W., Mwakwari, S.C., Chen, P.C., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Oyelere, A.K., 2010. A structure-activity relationship study of the antimalarial and antileishmanial activities of nonpeptide macrocyclic histone deacetylase inhibitors. ChemMedChem 5, 1232–5. doi:10.1002/cmdc.201000087
- Gupta, R., Kushawaha, P.K., Samant, M., Jaiswal, A.K., Baharia, R.K., Dube, A., 2012. Treatment of Leishmania donovani-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. J. Antimicrob. Chemother. 67, 440–3. doi:10.1093/jac/dkr485

- Hailu, A., Musa, A., Wasunna, M., Balasegaram, M., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tesfaye, S., Makonnen, E., Khalil, E., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Raheem, M., Mueller, M., Koummuki, Y., Rashid, J., Mbui, J., Mucee, G., Njoroje, S., Manduku, V., Musibi, A., Mutuma, G., Kirui, F., Lodenyo, H., Mutea, D., Kirigi, G., Edwards, T., Smith, P., Muthami, L., Royce, C., Ellis, S., Aloba, M., Omollo, R., Kesusu, J., Owiti, R., Kinuthia, J., 2010. Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: a multicentre, open-label, randomized trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e709. doi:10.1371/journal.pntd.0000709
- Hansen, F.K., Sumanadasa, S.D.M., Stenzel, K., Duffy, S., Meister, S., Marek, L., Schmetter, R., Kuna, K., Hamacher, A., Mordmüller, B., Kassack, M.U., Winzeler, E. a, Avery, V.M., Andrews, K.T., Kurz, T., 2014. Discovery of HDAC inhibitors with potent activity against multiple malaria parasite life cycle stages. *Eur. J. Med. Chem.* 82, 204–13. doi:10.1016/j.ejmech.2014.05.050
- Hendrickx, S., Boulet, G., Mondelaers, A., Dujardin, J.C., Rijal, S., Lachaud, L., Cos, P., Delputte, P., Maes, L., 2014. Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Parasitol. Res.* 113, 1875–1881. doi:10.1007/s00436-014-3835-7
- Hernández, L., Bolás-fernández, F., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Serrano, D.R., Torrado, J.J., Otranto, D., Latrofa, M.S., Miró, G., 2015. Unresponsiveness of Experimental Canine Leishmaniasis to a New Amphotericin B Formulation. *Adv. Pharm.* 2015, 160208.
- Hernández, L., Gálvez, R., Montoya, A., Checa, R., Bello, A., Bosschaerts, T., Jansen, H., Rupérez, C., Fortin, A., Miró, G., 2014. First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine-OIPC) in the treatment of canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 113, 157–64. doi:10.1007/s00436-013-3638-2
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B.C., Granados, M., San Martín, J.V., Aparicio, P., 2015. Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997-2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003594. doi:10.1371/journal.pntd.0003594
- Hervás, J.A., Martín-Santiago, A., Hervás, D., Rojo, E., Mena, A., Rocamora, V., Dueñas, J., 2012. Old world *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis unresponsive to liposomal amphotericin B treated with topical imiquimod. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 97–100. doi:10.1097/INF.0b013e31822dfbf7
- Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., 2007. Inhibition of antiassociation activity of translation initiation factor 3 by paromomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 175–80. doi:10.1128/AAC.01096-06
- Honoré, S., Garin, Y.J., Sulahian, A., Gangneux, J.P., Derouin, F., 1998. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21, 231–9.

## VIII. Bibliografía

- Horn, D., 2008. Histone deacetylases. *Adv Exp Med Biol* 625, 81–86. doi:10.1007/978-0-387-77570-8\_7
- Ikeda-García, F. a., Lopes, R.S., Ciarlini, P.C., Marques, F.J., Lima, V.M.F., Perri, S.H. V, Feitosa, M.M., 2007. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res. Vet. Sci.* 83, 105–108. doi:10.1016/j.rvsc.2006.10.008
- Ikeda-García, F.A., Lopes, R.S., Marques, F.J., de Lima, V.M.F., Morinishi, C.K., Bonello, F.L., Zanette, M.F., Perri, S.H.V., Feitosa, M.M., 2007. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 143, 254–259. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.019
- Ingram, A.K., Horn, D., 2002. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. *Mol. Microbiol.* 45, 89–97.
- Iniesta, L., Gállego, M., Portús, M., 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 77–81. doi:10.1016/j.vetimm.2004.08.011
- Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop.* 128, 468–472. doi:10.1016/j.actatropica.2013.07.007
- JCCM, 2014. Orden de 02/06/2014, de la Consejería de Agricultura, por la que se establece el Programa Zoonosanitario Básico de Cánidos, Félidos y Hurones en Castilla-La Mancha. *Diario Oficial de Castilla-La Mancha*. Número 110, 10 de junio de 2014. 15262–15269.
- Jha, T.K., Olliaro, P., Thakur, C.P., Kanyok, T.P., Singhanía, B.L., Singh, I.J., Singh, N.K., Akhoury, S., Jha, S., 1998. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ* 316, 1200–5.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Felton, J.M., Sabin, A.J., Horton, J., 2005. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 1005–11.
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.* 202, 296–300. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.027
- Jirků, M., Yurchenko, V.Y., Lukeš, J., Maslov, D. a., 2012. New species of insect trypanosomatids from costa rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae [WWW Document]. *J. Eukaryot. Microbiol.* doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00636.x
- Junta de Andalucía, 2010. Orden de 19 de abril de 2010, por la que se establecen los tratamientos obligatorios de los animales de compañía, los datos para su identificación en la venta y

- los métodos de sacrificio de los mismos en la Comunidad Autónoma de Andalucía. Boletín Of. la Junta Andalucía Número 81, 15–34.
- Kathuria, M., Bhattacharjee, A., Sashidhara, K. V, Singh, S.P., Mitra, K., 2014. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Leishmania donovani* by orally active clerodane diterpene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5916–28. doi:10.1128/AAC.02459-14
- Kawano, Y., Noma, T., Yata, J., 1994. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J. Immunol.* 153, 4948–58.
- Kerr, J.S., Galloway, S., Lagrutta, A., Armstrong, M., Miller, T., Richon, V.M., Andrews, P. a, 2010. Nonclinical safety assessment of the histone deacetylase inhibitor vorinostat. *Int. J. Toxicol.* 29, 3–19. doi:10.1177/1091581809352111
- Khalil, E.A.G., Weldegebreal, T., Younis, B.M., Omollo, R., Musa, A.M., Hailu, W., Abuzaid, A.A., Dorlo, T.P.C., Hurissa, Z., Yifru, S., Haleke, W., Smith, P.G., Ellis, S., Balasegaram, M., EL-Hassan, A.M., Schoone, G.J., Wasunna, M., Kimutai, R., Edwards, T., Hailu, A., 2014. Safety and efficacy of single dose versus multiple doses of AmBisome for treatment of visceral leishmaniasis in eastern Africa: a randomised trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2613. doi:10.1371/journal.pntd.0002613
- Khalil, N.M., Cristina De Mattos, A., Moraes, T.C., Carraro, M., Ludwig, D.B., Mainardes, R.M., 2013. Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases. *Curr. Pharm. Des.* 19, 7316–7329.
- Khan, G.M., Rifat, K., Bhaskar, H., Salam, A., Akther, T., 2012. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification ( LAMP ) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasit. Vectors* 5, 1. doi:10.1186/1756-3305-5-280
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., Rioux, J.A., Lanotte, G., Leaney, A.J., 1980. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 74, 563–5.
- Kim, S., Jung, E., Kim, J.-H., Park, Y.-H., Lee, J., Park, D., 2011. Inhibitory effects of (-)- $\alpha$ -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2580–5. doi:10.1016/j.fct.2011.06.076
- Kip, A.E., Balasegaram, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., de Vries, P.J., Dorlo, T.P.C., 2015. Systematic Review of Biomarkers To Monitor Therapeutic Response in Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1–14. doi:10.1128/AAC.04298-14
- Koutinas, a F., Koutinas, C.K., 2014. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet. Pathol.* 51, 527–38. doi:10.1177/0300985814521248
- Kraeva, N., Butenko, A., Hlaváčová, J., Kostygov, A., Myšková, J., Grybchuk, D., Leštinová, T., Voťpka, J., Volf, P., Opperdoes, F., Flegontov, P., Lukeš, J., Yurchenko, V., 2015. *Leptomonas*

## VIII. Bibliografía

- seymouri: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*. *PLOS Pathog.* 11, e1005127. doi:10.1371/journal.ppat.1005127
- Kramer, S., 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181, 61–72. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.10.002
- Kumar, S., Ali, M.R., Bawa, S., 2014. Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 6, 222–8. doi:10.4103/0975-7406.142943
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 75, 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- Lane, R., 1993. *Medical Insects and Arachnids. Sandflies (Phlebotominae)*. Springer Netherlands, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-011-1554-4
- Laurenti, M.D., Marcondes, M., 2014. Asymptomatic or infect dog, symptomatic or sick/severely sick dog: The nomenclature did not change the clinical pathological classification in canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 202, 339–340. doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.046
- Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schönián, G., Wirth, T., 2011. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1091–5. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.004
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Hitakarun, A., Kato, H., Tan-ariya, P., Siriyasatien, P., Osatakul, S., Mungthin, M., 2013. Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. *BMC Microbiol.* 13, 60. doi:10.1186/1471-2180-13-60
- Leon, A.C., Davis, L.L., Kraemer, H.C., 2011. The role and interpretation of pilot studies in clinical research. *J. Psychiatr. Res.* 45, 626–9. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.10.008
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27, 37–58.
- Lima, W.G., Michalick, M.S.M., Melo, M.N. De, Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2004. Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 92, 43–53. doi:10.1016/j.actatropica.2004.04.007
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- López-Vélez, R., 2003. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*

97 Suppl 1, 143–7. doi:10.1179/000349803225002615

- Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P.X., Robert-Gero, M., 1997. In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell Res.* 232, 339–48. doi:10.1006/excr.1997.3500
- Mai, A., Cerbara, I., Valente, S., Massa, S., Walker, L. a., Tekwani, B.L., 2004. Antimalarial and Antileishmanial Activities of Aroyl-Pyrrolyl-Hydroxyamides, a New Class of Histone Deacetylase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1435–1436. doi:10.1128/AAC.48.4.1435-1436.2004
- Maia, C., Rolão, N., Nunes, M., Gonçalves, L., Campino, L., 2007. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 103, 150–5. doi:10.1016/j.actatropica.2007.06.001
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., Gravino, A.E., 2015. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit. Vectors* 8, 289. doi:10.1186/s13071-015-0896-0
- Manna, L., Gravino, A.E., Picillo, E., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2008a. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 358–360. doi:10.1196/annals.1428.018
- Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Manzillo, V.F., Michele, P.L., Caracappa, S., Gravino, A.E., 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 142, 271–280. doi:10.1016/j.vetpar.2006.06.028
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Gravino, A.E., 2009a. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res. Vet. Sci.* 87, 76–78. doi:10.1016/j.rvsc.2008.12.009
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M., Gravino, A.E., 2008b. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* 177, 279–282. doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.013
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F., Gravino, A.E., 2009b. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet. J.* 182, 441–445. doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.009
- Mansfield, C., 2012. Acute Pancreatitis in Dogs: Advances in Understanding, Diagnostics, and Treatment. *Top. Companion Anim. Med.* 27, 123–132. doi:10.1053/j.tcam.2012.04.003
- Manzano, J.I., García-Hernández, R., Castanys, S., Gamarro, F., 2013. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3719–30. doi:10.1128/AAC.00211-13
- Marongiu, L., Donini, M., Bovi, M., Perduca, M., Vivian, F., Romeo, A., Mariotto, S., Monaco, H.L., Dusi, S., 2014. The inclusion into PLGA nanoparticles enables  $\alpha$ -bisabolol to efficiently

## VIII. Bibliografía

- inhibit the human dendritic cell pro-inflammatory activity. *J. Nanoparticle Res.* 16, 2554. doi:10.1007/s11051-014-2554-4
- Martinez Ortega, E., Conesa Gallego, E., Romera Lozano, H., 1996. A new sandfly from Spain: *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera, Psychodidae). *Parasite* 3, 77–80.
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit. Vectors* 4, 57. doi:10.1186/1756-3305-4-57
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-De-Rueda, J.C., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G., Figueroa-Angulo, E.E., 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 525241. doi:10.1155/2010/525241
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267–73. doi:10.1016/j.vetpar.2006.11.005
- Martin-Sanchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 228–32.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 795–8. doi:10.3201/eid1505.080969
- Mateo, M., Maynard, L., Vischer, C., Bianciardi, P., Miró, G., 2009. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol. Res.* 105, 155–162. doi:10.1007/s00436-009-1375-3
- Matlashewski, G., Arana, B., Kroeger, A., Battacharya, S., Sundar, S., Das, P., Sinha, P.K., Rijal, S., 2011. Visceral leishmaniasis: elimination with existing. *Lancet Infect. Dis.* 11, 322–325. doi:10.1016/S1473-3099(10)70320-0
- McGwire, B.S., Satoskar, A.R., 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM* 107, 7–14. doi:10.1093/qjmed/hct116
- Mencke, N., 2011. The importance of canine leishmaniosis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 124, 434–42.
- Menna-Barreto, R.F.S., de Castro, S.L., 2014. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res. Int.* 2014, 614014. doi:10.1155/2014/614014
- Miles, S.A., Conrad, S.M., Alves, R.G., Jeronimo, S.M.B., Mosser, D.M., 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.* 201, 747–54. doi:10.1084/jem.20041470

- Miranda-Verástegui, C., Llanos-Cuentas, A., Arévalo, I., Ward, B.J., Matlashewski, G., 2005. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1395–403. doi:10.1086/429238
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 24, 371–377. doi:10.1016/j.pt.2008.05.003
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit. Vectors* 5, 60. doi:10.1186/1756-3305-5-60
- Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M.A., Molina, R., 2011. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit. Vectors* 4, 52. doi:10.1186/1756-3305-4-52
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491–3.
- Molina, R., Gradoni, L., Alvar, J., 2003. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97 Suppl 1, 29–45. doi:10.1179/000349803225002516
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 190, 268–71. doi:10.1016/j.vetpar.2012.05.006
- Momo, C., Jacintho, A.P.P., Moreira, P.R.R., Munari, D.P., Machado, G.F., Vasconcelos, R.D.O., 2014. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Med. Int.* 2014, 150582. doi:10.1155/2014/150582
- Monge-Maillo, B., Lopez-Velez, R., 2014. Topical Paromomycin and Gentamicin for New World Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 1191–1191. doi:10.4269/ajtmh.14-0040a
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2015. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clin. Infect. Dis.* 60, 1398–404. doi:10.1093/cid/civ004
- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2013. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs* 73, 1863–88. doi:10.1007/s40265-013-0133-0
- Monge-Maillo, B., Norman, F.F., Cruz, I., Alvar, J., López-Vélez, R., 2014. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3021. doi:10.1371/journal.pntd.0003021
- Morales Yuste, M., 2012. La leishmaniosis canina en el sudeste de España: cambios en las últimas

## VIII. Bibliografía

- dos décadas, factores de riesgo y criterios diagnósticos. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., 2012. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol. Res.* 111, 155–164. doi:10.1007/s00436-011-2812-7
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., Valero-López, A., Navarro-Moll, M.C., 2010. Activity of (-)-alpha-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine* 17, 279–81. doi:10.1016/j.phymed.2009.05.019
- Moreira, P.R.R., Vieira, L.M., De Andrade, M.M.C., De Barros Bandarra, M., MacHado, G.F., Munari, D.P., De Oliveira Vasconcelos, R., 2010. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 107, 605–613. doi:10.1007/s00436-010-1902-2
- Mori, Y., Notomi, T., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 15, 62–69. doi:10.1007/s10156-009-0669-9
- Morillas, F., Sanchez Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchiz-Marín, M.C., 1996. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol. Res.* 82, 569–70.
- Morillas Márquez, F., Sanchís Marín, M.C., Martín Sánchez, J., Acedo Sánchez, C., 1991. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia* 33 Suppl, 437–44.
- Moritz, a, Steuber, S., Greiner, M., 1999. Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai J.Exp.Clin.Med.* 23, 279–283.
- Moura Rocha, N.F., Venâncio, E.T., Moura, B.A., Gomes Silva, M.I., Aquino Neto, M.R., Vasconcelos Rios, E.R., de Sousa, D.P., Mendes Vasconcelos, S.M., de França Fonteles, M.M., de Sousa, F.C.F., 2010. Gastroprotection of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24, 63–71. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00726.x
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J.E., Kaye, P.M., Chatterjee, M., 2014. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends Parasitol.* 30, 65–74. doi:10.1016/j.pt.2013.12.004
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 128, 706–709.

doi:10.1016/j.actatropica.2013.08.009

- Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A.A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroge, S., Manduku, V., Mutuma, G., Apadet, L., Lodenyo, H., Mutea, D., Kirigi, G., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tafes, H., Mekonnen, Y., Makonnen, E., Ndegwa, S., Sagaki, P., Kimutai, R., Kesusu, J., Owiti, R., Ellis, S., Wasunna, M., 2012. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1674. doi:10.1371/journal.pntd.0001674
- Musa, A.M., Younis, B., Fadlalla, A., Royce, C., Balasegaram, M., Wasunna, M., Hailu, A., Edwards, T., Omollo, R., Mudawi, M., Kokwaro, G., El-Hassan, A., Khalil, E., 2010. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized, open-label, dose-finding study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e855. doi:10.1371/journal.pntd.0000855
- Mwakwari, S.C., Guerrant, W., Patil, V., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Gurard-Levin, Z.A., Mrksich, M., Oyelere, A.K., 2010. Non-peptide macrocyclic histone deacetylase inhibitors derived from tricyclic ketolide skeleton. *J. Med. Chem.* 53, 6100–11. doi:10.1021/jm100507q
- Naucke, T.J., Menn, B., Massberg, D., Lorentz, S., 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol. Res.* 103 Suppl , S65–8. doi:10.1007/s00436-008-1052-y
- Navea-Pérez, H.M., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2015. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol. Res.* 114, 2363–70. doi:10.1007/s00436-015-4434-y
- Neal, R.A., Allen, S., McCoy, N., Olliaro, P., Croft, S.L., 1995. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 577–84.
- Neal, R.A., Croft, S.L., 1984. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, 463–475.
- Neto, R.G.T., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitor, R.W.D.A., Coura-Vital, W., Quaresma, P.F., Ker, H.G., Melo, L.A. De, Gontijo, C.M.F., Reis, A.B., 2010. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 169, 248–257. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.023
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1666–9.
- Nieto, J., Alvar, J., Mullen, a. B., Carter, K.C., Rodríguez, C., San Andrés, M.I., San Andrés, M.D., Baillie, a. J., González, F., 2003. Pharmacokinetics, toxicities, and efficacies of sodium stibogluconate formulations after intravenous administration in animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2781–2787. doi:10.1128/AAC.47.9.2781-2787.2003
- Noli, C., Auxilia, S.T., 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis : *Vet. Dermatol.*

## VIII. Bibliografía

16, 213–232.

- Noli, C., Saridomichelakis, M.N., 2014. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet. J.* 202, 425–35. doi:10.1016/j.tvjl.2014.09.002
- O.M.S., 2010. Control de la leishmaniasis. Ser. Inf. Técnicos 949.
- Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A., Zini, E., 2010. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 1192–8. doi:10.2460/javma.236.11.1192
- Oliveira, T.M.F.S., Mineo, T.W.P., Bason, M., Day, M.J., Machado, R.Z., 2009. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. *Vet. Parasitol.* 162, 16–22. doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.018
- Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2013. Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento.
- Ostyn, B., Hasker, E., Dorlo, T.P.C., Rijal, S., Sundar, S., Dujardin, J.-C., Boelaert, M., 2014. Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia. *PLoS One* 9, e100220. doi:10.1371/journal.pone.0100220
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 29, 339–45. doi:10.1016/j.pt.2013.05.003
- Paiva-cavalcanti, M. De, Carla, R., Morais, S. De, Pessoa-e-silva, R., Trajano-silva, L.A.M., Gonçalves-de-albuquerque, S.C., Hollanda, D. De, Tavares, C., Brelaz-de-castro, M.C.A., Freitas, R. De, 2015. Leishmaniasis diagnosis : an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci.* 1–10. doi:10.1186/s13578-015-0021-2
- Panadero Fajardo, S., Corpas López, V., Arévalo Ruiz, M., Domínguez Seglar, J., Morillas Márquez, F., Martín Sánchez, J., Gómez Vidal, J., Tabraue Chávez, M., 2011. Compuesto con actividad antileishmania. ES2402252.
- Panaro, M. a, Brandonisio, O., Cianciulli, a, Cavallo, P., Lacasella, V., Paradies, P., Testini, G., De Caprariis, D., Mitolo, V., Otranto, D., 2009. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology* 136, 823–831. doi:10.1017/S0031182009006155
- Patil, V., Guerrant, W., Chen, P.C., Gryder, B., Benicewicz, D.B., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Oyelere, A.K., 2010. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 415–25. doi:10.1016/j.bmc.2009.10.042
- Patterson, S., Wyllie, S., 2014. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* 30, 289–298. doi:10.1016/j.pt.2014.04.003
- Pavlik, C.M., Wong, C.Y.B., Ononye, S., Lopez, D.D., Engene, N., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Balunas, M.J., 2013. Santacruzamate A, a potent and selective histone deacetylase inhibitor

- from the panamanian marine cyanobacterium cf. *symploca* sp. *J. Nat. Prod.* 76, 2026–2033. doi:10.1021/np400198r
- Pérez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Ouellette, M., Castanys, S., 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* 278, 49965–71. doi:10.1074/jbc.M308352200
- Pérez-Victoria, J.M., Parodi-Talice, A., Torres, C., Gamarro, F., Castanys, S., 2001. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int. Microbiol.* 4, 159–66. doi:10.1007/s10123-001-0031-2
- Perry, M.R., Wyllie, S., Raab, A., Feldmann, J., Fairlamb, A.H., 2013. Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19932–7. doi:10.1073/pnas.1311535110
- Petersen, C.A., Barr, S.C., 2009. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 39, 1065–74, vi. doi:10.1016/j.cvsm.2009.06.008
- Pineda, J.A., Macías, J., Morillas, F., Fernandez-Ochoa, J., Cara, J., de La Rosa, R., Mira, J.A., Martín-Sánchez, J., González, M., Delgado, J., Acedo, C., Lissen, E., 2001. Evidence of increased risk for leishmania infantum infection among HIV-seronegative intravenous drug users from southern Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 354–7.
- Pineda, J.A., Martín-Sánchez, J., Macías, J., Morillas, F., 2002. *Leishmania* spp infection in injecting drug users. *Lancet (London, England)* 360, 950–1. doi:10.1016/S0140-6736(02)11056-7
- Pintado, V., López-Vélez, R., 2001. HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 291–300.
- Piochon, M., Legault, J., Gauthier, C., Pichette, A., 2009. Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural alpha-bisabolol beta-D-fucopyranoside and analogues. *Phytochemistry* 70, 228–36. doi:10.1016/j.phytochem.2008.11.013
- Poon, L.L.M., Wong, B.W.Y., Ma, E.H.T., Chan, K.H., Chow, L.M.C., Abeyewickreme, W., Tangpukdee, N., Yuen, K.Y., Guan, Y., Looareesuwan, S., Peiris, J.S.M., 2006. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin. Chem.* 52, 303–6. doi:10.1373/clinchem.2005.057901
- Pothirat, T., Tantiworawit, A., Chaiwarith, R., Jariyapan, N., Wannasan, A., Siriyasatien, P., Supparatpinyo, K., Bates, M.D., Kwakye-Nuako, G., Bates, P.A., 2014. First isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: case report, identification as *Leishmania martiniquensis* and phylogenetic position within the *Leishmania enriettii* complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3339. doi:10.1371/journal.pntd.0003339
- Prince, H.M., Dickinson, M., 2012. Romidepsin for cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 18, 3509–15. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3144

## VIII. Bibliografía

- Proverbio, D., Spada, E., Bagnagatti De Giorgi, G., Perego, R., Valena, E., 2014a. Relationship between Leishmania IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res. Int.* 2014, 412808. doi:10.1155/2014/412808
- Proverbio, D., Spada, E., Giorgi, G.B. De, Perego, R., 2014b. Case Report Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural Leishmania infantum Infection. *Case Reports Vet. Med.* 2014, 640151.
- Purkait, B., Singh, R., Wasnik, K., Das, S., Kumar, a., Paine, M., Dikhit, M., Singh, D., Sardar, a. H., Ghosh, a. K., Das, P., 2015. Up-regulation of silent information regulator 2 (Sir2) is associated with amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. *J. Antimicrob. Chemother.* 2, 1343–1356. doi:10.1093/jac/dku534
- Quaresma, P.F., Murta, S.M.F., Ferreira, E. de C., da Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P., Gontijo, C.M.F., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 111, 289–94. doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.008
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915–34. doi:10.1017/S0031182009991156
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Shaw, M. -a., Day, M.J., Garcez, L.M., Dye, C., Kaye, P.M., 2001. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421–1424.
- Quinones, G.B., Danowski, B.A., Devaraj, A., Singh, V., Ligon, L.A., 2011. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Mol. Biol. Cell* 22, 1045–57. doi:10.1091/mbc.E10-06-0519
- Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A., Koutinas, A.F., 2005. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (Leishmania infantum): a clinicopathological study of 26 cases. *J. Comp. Pathol.* 132, 145–52. doi:10.1016/j.jcpa.2004.09.004
- Ralph, P., Nakoinz, I., 1977. Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Res.* 37, 546–50.
- Ramos, A., Múñez, E., García-Domínguez, J., Martínez-Ruiz, R., Chicharro, C., Baños, I., Suarez-Massa, D., Cuervas-Mons, V., 2015. Mucosal leishmaniasis mimicking squamous cell carcinoma in a liver transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 17, 488–92. doi:10.1111/tid.12380
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 15, 19505.
- Recanatini, M., Poluzzi, E., Masetti, M., Cavalli, A., De Ponti, F., 2005. QT prolongation through hERG K(+) channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med. Res. Rev.* 25, 133–66. doi:10.1002/med.20019

- Reimão, J.Q., Colombo, F.A., Pereira-Chiocola, V.L., Tempone, A.G., 2011. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Exp. Parasitol.* 128, 111–5. doi:10.1016/j.exppara.2011.02.021
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87–95. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.307
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R. a., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. a., 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102–116. doi:10.1016/j.vetimm.2006.02.001
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., Aslund, L., 2008. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 283, 15884–92. doi:10.1074/jbc.M802081200
- Ribeiro, R.R., Moura, E.P., Pimentel, V.M., Sampaio, W.M., Silva, S.M., Schettini, D. a., Alves, C.F., Melo, F. a., Tafuri, W.L., Demicheli, C., Melo, M.N., Frézard, F., Michalick, M.S.M., 2008. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2564–2572. doi:10.1128/AAC.00223-08
- Rijal, S., Ostyn, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N.R., Dorlo, T.P.C., Beijnen, J.H., Vanaerschot, M., Decuypere, S., Dhakal, S.S., Das, M.L., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M., Dujardin, J.-C., 2013. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1530–8. doi:10.1093/cid/cit102
- Ritagliati, C., Alonso, V.L., Manarin, R., Cribb, P., Serra, E.C., 2015. Overexpression of cytoplasmic TcSIR2RP1 and mitochondrial TcSIR2RP3 impacts on *Trypanosoma cruzi* growth and cell invasion. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003725. doi:10.1371/journal.pntd.0003725
- Ritmeijer, K., Dejenie, A., Assefa, Y., Hundie, T.B., Mesure, J., Boots, G., den Boer, M., Davidson, R.N., 2006. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 43, 357–64. doi:10.1086/505217
- Rittig, M.G., Bogdan, C., 2000. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol. Today* 16, 292–7.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J., 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid

## VIII. Bibliografía

- parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 129–42.
- Rocha, N.F.M., Rios, E.R.V., Carvalho, A.M.R., Cerqueira, G.S., Lopes, A. de A., Leal, L.K.A.M., Dias, M.L., de Sousa, D.P., de Sousa, F.C.F., 2011. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- $\alpha$ -bisabolol in rodents. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 384, 525–33. doi:10.1007/s00210-011-0679-x
- Rochette, A., Raymond, F., Corbeil, J., Ouellette, M., Papadopoulou, B., 2009. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165, 32–47. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.12.012
- Rodrigues, R.F., Charret, K.S., Campos, M.C., Amaral, V., Echevarria, A., Dos Reis, C., Canto-Cavalheiro, M.M., Leon, L.L., 2012. The in vivo activity of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide compounds in the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 182–90. doi:10.1093/jac/dkr409
- Rogers, M.B., Downing, T., Smith, B.A., Imamura, H., Sanders, M., Svobodova, M., Volf, P., Berriman, M., Cotton, J.A., Smith, D.F., 2014. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet.* 10, e1004092. doi:10.1371/journal.pgen.1004092
- Rolão, N., Melo, C., Campino, L., 2004. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 90, 123–6.
- Romero, G.A.S., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e584. doi:10.1371/journal.pntd.0000584
- Romero, M. del C., Valero, A., Martín-Sánchez, J., Navarro-Moll, M.C., 2012. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine* 19, 520–3. doi:10.1016/j.phymed.2012.02.005
- Rottini, M.M., Amaral, A.C.F., Ferreira, J.L.P., Silva, J.R. de A., Taniwaki, N.N., Souza, C. da S.F. de, d'Escoffier, L.N., Almeida-Souza, F., Haridoim, D. de J., Gonçalves da Costa, S.C., Calabrese, K. da S., 2015. In vitro evaluation of (-)- $\alpha$ -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.* 148, 66–72. doi:10.1016/j.exppara.2014.10.001
- Rougeron, V., De Meeüs, T., Kako Ouraga, S., Hide, M., Bañuls, A.-L., 2010. "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS Pathog.* 6, e1001004. doi:10.1371/journal.ppat.1001004
- Rougier, S., Hasseine, L., Delaunay, P., Michel, G., Marty, P., 2012. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 186, 245–253. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.016
- Rougier, S., Vouldoukis, I., Fournel, S., Pérès, S., Woehrlé, F., 2008. Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: A pilot study. *Vet. Parasitol.* 153, 244–254. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.041

- Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A., Zini, E., 2013. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet. J.* 198, 43–47. doi:10.1016/j.tvjl.2013.04.001
- Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M., Ferrer, L., 2014. trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev. Vet. Med.* 115, 56–63. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.010
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Alberola, J., Rodriguez-Cortés, a., Ojeda, a., López-Fuertes, L., Timon, M., Sanchez, a., Francino, O., 2008. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 168–175. doi:10.1016/j.vetimm.2008.04.010
- Santiago, M.E.B., Neto, L.S., Alexandre, E.C., Munari, D.P., Andrade, M.M.C., Somenzari, M.A., Ciarlina, P.C., De Lima, V.M.F., 2013. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Trop.* 127, 174–180. doi:10.1016/j.actatropica.2013.04.005
- Sasse, R., Gull, K., 1988. Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 90, 577–89.
- Saxena, A., Lahav, T., Holland, N., Aggarwal, G., Anupama, A., Huang, Y., Volpin, H., Myler, P.J., Zilberstein, D., 2007. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 53–65. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.11.011
- Schmidt, T.J., Khalid, S.A., Romanha, A.J., Alves, T.M., Biavatti, M.W., Brun, R., Da Costa, F.B., de Castro, S.L., Ferreira, V.F., de Lacerda, M.V.G., Lago, J.H.G., Leon, L.L., Lopes, N.P., das Neves Amorim, R.C., Niehues, M., Ogungbe, I. V., Pohlit, A.M., Scotti, M.T., Setzer, W.N., de N C Soeiro, M., Steindel, M., Tempone, A.G., 2012. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr. Med. Chem.* 19, 2128–75.
- Seifert, K., Escobar, P., Croft, S.L., 2010. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 508–11. doi:10.1093/jac/dkp500
- Sen, R., Chatterjee, M., 2011. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* 18, 1056–1069. doi:10.1016/j.phymed.2011.03.004
- Sereno, D., Alegre, a M., Silvestre, R., Vergnes, B., 2005. In Vitro Antileishmanial Activity of Nicotinamide In Vitro Antileishmanial Activity of Nicotinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 808–812. doi:10.1128/AAC.49.2.808
- Serna, M.E., Maldonado, M., Torres, S., Schinini, A., Peixoto de Abreu Lima, A., Pandolfi, E., Rojas de Arias, A., 2015. Finding of leishmanicidal activity of 14-hydroxylunularin in mice experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitol. Int.* 64, 295–8.

## VIII. Bibliografia

- doi:10.1016/j.parint.2015.03.005
- Sharma, V., McNeill, J.H., 2009. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Br. J. Pharmacol.* 157, 907–21. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00267.x
- Shaw, J., Pralong, F., Floeter-Winter, L., Ishikawa, E., El Baidouri, F., Ravel, C., Dedet, J.-P., 2015. Characterization of *Leishmania (Leishmania) waltoni* n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 552–8. doi:10.4269/ajtmh.14-0774
- Shaw, S.E., Langton, D.A., Hillman, T.J., 2009. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet. Parasitol.* 163, 281–5. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.025
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–22.
- Silva, M.A.L. da, Medeiros, Z., Soares, C.R.P., Silva, E.D. da, Miranda-filho, D.B., Melo, F.L. de, Almerice, M., Medeiros, Z., Regina, C., Soares, P., Dionísio, E., Miranda-filho, D.B., Melo, F.L. de, 2014. A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 193–7.
- Silveira, F.T., Carneiro, L. a., Ramos, P.K.S., Chagas, E.J., Lima, L.V.R., Campos, M.B., Laurenti, M.D., Gomes, C.M.C., Corbett, C.E.P., 2012. A cross-sectional study on canine *Leishmania (L.) infantum* chagasi infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. *Parasitol. Res.* 111, 1513–1522. doi:10.1007/s00436-012-2989-4
- Singh, N., Chikara, S., Sundar, S., 2013. SOLiD™ sequencing of genomes of clinical isolates of *Leishmania donovani* from India confirm leptomonas co-infection and raise some key questions. *PLoS One* 8, e55738. doi:10.1371/journal.pone.0055738
- Singh, N., Kumar, M., Singh, R.K., 2012a. Leishmaniasis : Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 485–497. doi:10.1016/S1995-7645(12)60084-4
- Singh, N., Kumar, M., Singh, R.K., 2012b. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 485–97. doi:10.1016/S1995-7645(12)60084-4
- Singh, O.P., Sundar, S., 2014. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Front. Immunol.* 5, 296. doi:10.3389/fimmu.2014.00296
- Sodji, Q., Patil, V., Jain, S., Kornacki, J.R., Mrksich, M., Tekwani, B.L., Oyelere, A.K., 2014. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters The antileishmanial activity of isoforms 6- and 8-selective histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4826–4830. doi:10.1016/j.bmcl.2014.08.060

- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellon, H., Serra, R., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., Ferrer, L., 2003. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet. J.* 35, 320–3.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, a., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 165, 1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors* 4, 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., Portús, M., 2001. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96, 265–76.
- Soto, J., Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J.D., Junge, K., Engel, J., Sindermann, H., 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 38, 1266–72. doi:10.1086/383321
- Soto, J., Rea, J., Valderrama, M., Toledo, J., Valda, L., Ardiles, J., Berman, J., 2009. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 387–9.
- Soto, J., Toledo, J.T., 2007. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 7. doi:10.1016/S1473-3099(06)70665-X
- Srivastava, A., Sweat, J.M., Azizan, A., Vesely, B., Kyle, D.E., 2013. Real-time PCR to quantify *Leishmania donovani* in hamsters. *J. Parasitol.* 99, 145–50. doi:10.1645/GE-3221.1
- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R., Salotra, P., 2012. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. *Parasitol. Res.* 110, 1065–1078. doi:10.1007/s00436-011-2680-1
- Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Jaffe, C.L., 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 38, 547–564. doi:10.1051/vetres:2007015
- Sudarshan, M., Singh, T., Singh, A.K., Chourasia, A., Singh, B., Wilson, M.E., Chakravarty, J., Sundar, S., 2014. Quantitative PCR in Epidemiology for Early Detection of Visceral Leishmaniasis Cases in India. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3366. doi:10.1371/journal.pntd.0003366
- Sudarshan, M., Sundar, S., 2014. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 80, 40–2. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.031
- Sudarshan, M., Weirather, J.L., Wilson, M.E., Sundar, S., 2011. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1751–1755. doi:10.1093/jac/dkr185

## VIII. Bibliografía

- Sumanadasa, S.D.M., Goodman, C.D., Lucke, A.J., Skinner-Adams, T., Sahama, I., Haque, A., Do, T.A., McFadden, G.I., Fairlie, D.P., Andrews, K.T., 2012. Antimalarial Activity of the Anticancer Histone Deacetylase Inhibitor SB939. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3849–3856. doi:10.1128/AAC.00030-12
- Sun, T., Zhang, Y., 2008. Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. *Nucleic Acids Res.* 36, 1654–64. doi:10.1093/nar/gkm1180
- Sundar, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 6, 849–54.
- Sundar, S., Agrawal, S., Pai, K., Chance, M., Hommel, M., 2005. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 269–271.
- Sundar, S., Chakravarty, J., 2015. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 237–52. doi:10.1517/14656566.2015.973850
- Sundar, S., Chakravarty, J., Agarwal, D., Rai, M., Murray, H.W., 2010. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* 362, 504–12. doi:10.1056/NEJMoa0903627
- Sundar, S., Singh, A., Chakravarty, J., Rai, M., 2015a. Efficacy and safety of miltefosine in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *ScientificWorldJournal.* 2015, 414378. doi:10.1155/2015/414378
- Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Chakravarty, J., 2015b. Single-dose indigenous liposomal amphotericin B in the treatment of Indian visceral leishmaniasis: a phase 2 study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 513–7. doi:10.4269/ajtmh.14-0259
- Sundar, S., Sinha, P.K., Rai, M., Verma, D.K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C.S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P., Modabber, F., 2011. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 377, 477–86. doi:10.1016/S0140-6736(10)62050-8
- Tasew, G., Kebede, A., Wolday, D., Gadisa, E., Britton, S., Eidsmo, L., Akuffo, H., 2009. Low-cost liquid medium for in vitro cultivation of Leishmania parasites in low-income countries. *Glob. Health Action* 2. doi:10.3402/gha.v2i0.2046
- Tavares, J., Ouaisi, A., Santarém, N., Sereno, D., Vergnes, B., Sampaio, P., Cordeiro-da-Silva, A., 2008. The Leishmania infantum cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD<sup>+</sup> - dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. *Biochem. J.* 415, 377–86. doi:10.1042/BJ20080666
- Tavares, J., Ouaisi, A., Silva, A.M., Lin, P.K.T., Roy, N., Cordeiro-da-Silva, A., 2012. Anti-leishmanial

- activity of the bisnaphthalimidopropyl derivatives. *Parasitol. Int.* 61, 360–3. doi:10.1016/j.parint.2011.11.005
- Thabane, L., Ma, J., Chu, R., Cheng, J., Ismaila, A., Rios, L.P., Robson, R., Thabane, M., Giangregorio, L., Goldsmith, C.H., 2010. A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC Med. Res. Methodol.* 10, 1. doi:10.1186/1471-2288-10-1
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N.R., Campbell, D.A., Myler, P.J., 2009. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* 10, 152. doi:10.1186/1471-2164-10-152
- Thompson, C.A., 2014. Belinostat approved for use in treating rare lymphoma. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 71, 1328. doi:10.2146/news140056
- Titus, R.G., Marchand, M., Boon, T., Louis, J.A., 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* 7, 545–55.
- Tiuman, T.S., Santos, A.O., Dias, B.P., Nakamura, C. V., 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int. J. Infect. Dis.* 15, 525–532. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.021
- Torres, M., Bardagí, M., Roura, X., Zanna, G., Ravera, I., Ferrer, L., 2011. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* 188, 346–351. doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.025
- Travi, B.L., 2014. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomedica* 34, 7–12. doi:10.1590/S0120-41572014000100002
- Trenholme, K., Marek, L., Duffy, S., Pradel, G., Fisher, G., Hansen, F.K., Skinner-Adams, T.S., Butterworth, A., Ngwa, C.J., Moecking, J., Goodman, C.D., McFadden, G.I., Sumanadasa, S.D.M., Fairlie, D.P., Avery, V.M., Kurz, T., Andrews, K.T., 2014. Lysine acetylation in sexual stage malaria parasites is a target for antimalarial small molecules. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3666–3678. doi:10.1128/AAC.02721-13
- Vaish, M., Mehrotra, S., 2011. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2003–2005. doi:10.1128/JCM.00130-11
- van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L., Moreno, J., 2014. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 286–99. doi:10.1111/1469-0691.12556
- Varani, S., Cagarelli, R., Melchionda, F., Attard, L., Salvadori, C., Finarelli, A.C., Gentilomi, G.A., Tigani, R., Rangoni, R., Todeschini, R., Scalone, A., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Viale, P., Landini, M.P., 2013. Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013. *Euro Surveill.* 18, 20530.
- Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., de Bilbao, N.I.V., Miño, P., Chiriboga, X., Cerecetto, H., González, M., 2014. In vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity of hydro-ethanolic extract and

## VIII. Bibliografía

- isolated active principles from *Aristeguietia glutinosa* and mechanism of action studies. *Molecules* 19, 8488–502. doi:10.3390/molecules19068488
- Vergnes, B., Vanhille, L., Ouaisi, A., Sereno, D., 2005. Stage-specific antileishmanial activity of an inhibitor of SIR2 histone deacetylase. *Acta Trop.* 94, 107–115. doi:10.1016/j.actatropica.2005.03.004
- Verma, S., Avishek, K., Sharma, V., Negi, N.S., Ramesh, V., Salotra, P., 2013. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 390–395. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.011
- Verma, S., Kumar, R., Katara, G.K., Singh, L.C., Negi, N.S., Ramesh, V., Salotra, P., 2010. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0010107
- Votýpka, J., d'Avila-Levy, C.M., Grellier, P., Maslov, D.A., Lukeš, J., Yurchenko, V., 2015. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends Parasitol.* 31, 460–469. doi:10.1016/j.pt.2015.06.015
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S., Saha, B., 2009. Miltefosine Promotes IFN- $\gamma$ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *J. Immunol.* 182, 7146–7154. doi:10.4049/jimmunol.0803859
- Wang, Q.-P., Kawahara, T., Horn, D., 2010. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. *Mol. Microbiol.* 77, 1237–45. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07284.x
- Wylie, C.E., Carbonell-Antoñanzas, M., Aiassa, E., Dhollander, S., Zagmutt, F.J., Brodbelt, D.C., Solano-Gallego, L., 2014. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. *Prev. Vet. Med.* 117, 19–27. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.06.016
- Yahiaoui, B., Taibi, A., Ouaisi, A., 1996. A *Leishmania* major protein with extensive homology to silent information regulator 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 169, 115–118. doi:10.1016/0378-1119(95)00785-7
- Zamboni, D.S., Rabinovitch, M., 2003. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* 71, 1225–33.
- Zauli-Nascimento, R.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Pereira, L.I.A., Pelli de Oliveira, M.A., Ribeiro-Dias, F., Dorta, M.L., Uliana, S.R.B., 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop. Med. Int. Health* 15, 68–76. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02414.x

