



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

Nuevos avances en la quimioterapia y el intercambio genético en *Leishmania*

M^a del Camino Gutiérrez Corbo

Biomedicina y Ciencias de la Salud

Directores: Rosa M^a Reguera Torres

Rafael Balaña Fouce

León, 2021



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro



**Junta de
Castilla y León**

Agradecer la financiación del Fondo Social Europeo, Programa Operativo de Castilla y León, y de la Junta de Castilla y León, a través de la Consejería de Educación, por el contrato predoctoral (LE255-16) concedido al amparo de la convocatoria “Ayudas para la contratación predoctoral de personal investigador 2016”

Son muchas las experiencias que he vivido desde que en mi verano de tercero de carrera entré por la puerta del laboratorio de Toxicología. Hoy, me encuentro finalizando mi Memoria de Tesis, a punto de cerrar esta importante etapa. Estos años me han servido para crecer y madurar tanto en el ámbito profesional como en el personal, y aunque no siempre ha sido un camino sencillo, el resultado ha sido enriquecedor. En el balance que hago de esta experiencia, una parte importante son todas las personas que me han rodeado durante estos años y que me han apoyado y han creído en mí, por ello, quiero agradecerérselo en esta Memoria.

A mis directores de tesis, Rosa y Rafa, por permitirme realizar mi tesis doctoral con vosotros. Rosa, gracias por la cantidad de cosas que he aprendido a tu lado, por tu confianza en mí y por mostrarme lo que es disfrutar de aquello a lo que te dedicas. Rafa, gracias por los consejos, por las charlas, las risas y por el enorme apoyo que he recibido cuando me ha hecho falta un último tirón para finalizar este proyecto.

A Yoli, por ser una amiga más, por tener siempre una sonrisa que regalarnos y por los ánimos que me has dado durante todos estos años.

A Irene, porque tu trabajo es fundamental para el laboratorio y tu risa y tu buen humor facilita mucho el trabajo diario.

A Carlos, que ha sido un gran apoyo en los últimos pasos de mi tesis doctoral, siempre dispuesto a ayudar en lo que haga falta.

A mis compañeras de laboratorio, que han sido sin duda un pilar fundamental del día a día. Desde Raquel y Estefanía, mis mentoras en mis inicios, hasta María, Estela, Rubén y Jose, que han formado parte de muchas andanzas, tertulias y algún que otro café, gracias. Mención aparte se ha ganado Bárbara, contigo he compartido tanto que a veces parecíamos la misma persona. Muchas gracias por ser mi compañera, mi amiga, por recibir mis alegrías y mis penas como si fuesen tuyas y por todos los ratos que hemos pasado juntas dentro y fuera del laboratorio, qué alegría coincidir contigo.

A mis amigas Alba, Marta, Paloma. Mis doctoras favoritas, mis compañeras de carrera y de muchas tardes de cerveza y tapeo. Gracias por todo el apoyo y por ser como sois.

A Mario, por los casi tres años que llevas poniendo “cabeza” a mi vida. Gracias por el apoyo incondicional, por escucharme, por tu paciencia conmigo, por el cariño que pones a lo que haces, por no dejar que me derrumbara cuando las cosas no han ido tan bien y por ayudarme a salir a flote siendo una mejor versión de mi misma. Esta tesis es también un poco tuya.

A mis padres, por su apoyo, paciencia, consejos y dedicación, porque gracias a ellos estoy donde estoy y soy quien soy.

A mi hermana, por haber sido mi otra mitad, mi espejo, durante tantos años. Confío en tu capacidad para lidiar con las adversidades y seguir adelante y para conseguir aquello que te propongas.

Gracias al resto de mi familia, por formar una gran piña. Soy tremendamente afortunada.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	V
Tabla de contenido	VII
Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XXIII
Listado de abreviaturas	XXV

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Agente etiológico. Taxonomía y biología del parásito	3
1.1. Género <i>Leishmania</i>	3
1.2. Morfología de <i>Leishmania</i>	4
1.3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	6
1.4. Vectores	8
2. Leishmaniasis. Epidemiología y manifestaciones clínicas	9
2.1. Leishmaniasis cutánea	10
2.2. Leishmaniasis visceral	12
2.3. Leishmaniasis en España	13
3. Tratamiento y prevención de la leishmaniasis	14
3.1. Control de la enfermedad. Control de reservorios y vectores	14
3.2. Vacunas	15
3.3. Tratamientos	17
4. Búsqueda de dianas terapéuticas frente a <i>Leishmania</i> . ADN topoisomerasas	22
4.1. Búsqueda de fármacos basados en diana	22
4.2. ADN topoisomerasas como diana farmacológica frente a <i>Leishmania</i>	23
5. Nanotecnología frente a <i>Leishmania</i>	29
6. Hacia una comprensión de la biología del parásito. Estudio de la reproducción sexual en <i>Leishmania</i>	34

6.1. Glosario	45
Referencias	48
<u>OBJETIVOS</u>	73
<u>RESULTADOS</u>	
CAPÍTULO 1: Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in <i>Leishmania infantum</i>	79
1. Introduction	80
2. Material and methods	81
2.1. Reagents	81
2.2. <i>Leishmania</i> strains	82
2.3. <i>Ex vivo</i> murine splenic explant cultures	82
2.4. Determination of the antileishmanial and cytotoxic effects	82
2.5. DNA topoisomerase IB assays	83
2.6. Cell cycle analysis	83
2.7. Western blotting analyses	84
2.8. Confocal microscopy and foci counting	84
2.9. SDS/K-DNA precipitation	85
3. Results	85
3.1. <i>In vitro</i> screening of indenoisoquinolines activity and TopIB inhibition	85
3.2. Cell cycle analysis	89
3.3. H2A phosphorylation in <i>Leishmania</i>	91
3.4. γ H2A foci generation in <i>Leishmania</i> promastigotes	93
3.5. <i>In situ</i> cleavage complex formation	94
4. Discussion	96
References	98
CAPÍTULO 2: PEGylated dendritic polyglycerol conjugate delivers doxorubicin to the parasitophorous vacuole in <i>Leishmania infantum</i> infections	105

1. Introduction	106
2. Experimental section	108
2.1. Chemical Materials	108
2.2. Synthesis of PG-DOX-PEG Conjugates	109
2.3. Physicochemical Characterization of PG-DOX-PEG Conjugates	110
2.3.1. Surface Charge Measurements	110
2.3.2. Hydrodynamic Diameter Measurements	110
2.4. Drug Release Profile Determination of PG-DOX-PEG Conjugates	110
2.4.1. Analysis of DOX Release by SEC and UV-Vis Spectroscopy	110
2.5. Mice and Parasites	111
2.6. Assessment of Cell Toxicity Using Macrophage Cell Lines	111
2.7. Macrophage Uptake Studies	111
2.8. Flow Cytometric Analysis of Apoptosis/Necrosis	112
2.9. Infection of RAW 267.4 Macrophage Cultures	112
3. Results and discussion	113
3.1. Synthesis and Characterization of PG-DOX-PEG Conjugates	113
3.2. Characterization of the Dendritic Conjugates	114
3.2.1. Hydrodynamic Diameter and Zeta Potential Measurements of the Conjugates	114
3.2.2. Drug Loading of the Dendritic Conjugates and Drug Release Study	115
3.3. DOX Conjugated to Polyglycerol Carriers Reduces Free DOX Toxicity in an <i>ex vivo</i> Physiological Mouse Model of <i>Leishmania</i> Infection	115
3.4. DOX Uptake Showed Different Patterns in J774A.1 and RAW267.4 Macrophages Characterized by a Delayed Release When PG-DOX(pH)-PEG Is Used as a Carrier	119
3.5. PG-DOX-PEG Conjugates Use Endocytosis Pathway to Reach Lysosome, the Natural Niche to <i>Leishmania</i> Parasites during Infection	120

3.6. PG-DOX(pH)-PEG Prevents Necrosis Promoted by Free DOX in RAW 264.7 Macrophages	124
3. Conclusion	126
Supporting information	127
References	131
CAPÍTULO 3 – PARTE A: Reproduction in trypanosomatids: past and present	137
1. Clonal theory or true sex?	138
2. Genetic exchange in <i>Trypanosoma</i>	141
3. Genetic exchange in <i>Leishmania</i>	145
4. Genetic inheritance of kDNA	149
5. Concluding remarks	151
References	153
CAPÍTULO 3 - PARTE B: Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation in <i>Leishmania</i>: successful crossings between visceral and cutaneous strains	161
1. Introduction	162
2. Materials and methods	164
2.1. Animals and infections	164
2.2. Parasites and growth curves	164
2.3. LULO cell cultures	165
2.4. Generation of fluorescent-transgenic lines of <i>Leishmania</i>	165
2.5. Crossing experiments	168
2.6. Analysis of DNA content	168
2.7. Identification of parental <i>Leishmania</i> strains	168
2.8. Single Nucleotide Polymorphisms Cleaved Amplification Polymorphic site (SNP-CAPs)	168
2.9. Determination of inheritance in polyploid hybrids	170
2.10. <i>In vitro</i> infections	170
3. Results and discussion	171
3.1. Generation of engineered parental cell lines	171

3.2.	Formation and characterization of intraclonal hybrid strains <i>in vitro</i>	172
3.3.	Formation and characterization of interspecies hybrid strains <i>in vitro</i>	175
3.4.	Ploidy profile of hybrids	177
3.5.	Genotypic characterization of interspecies hybrids	179
3.6.	Extranuclear DNA inheritance of interspecies hybrid clones	183
3.7.	Infectivity of intraclonal and interspecies hybrids	185
	References	189
	<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	195
	Referencias	199
	<u>CONCLUSIONES</u>	205
	<u>RESUMEN</u>	209
	Anexo I. Compendio de publicaciones	213
	Anexo II. Otras publicaciones como coautora	219

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1.** Representación esquemática mostrando las principales similitudes y diferencias entre la forma proliferativa móvil (promastigote) y la forma quiescente inmóvil (amastigote) en *Leishmania*. Como puede observarse, aunque la morfología es diferente, la mayor parte de las características se conservan en ambas formas, siendo la principal diferencia el flagelo, que además de presentar una longitud distinta, tiene una composición, morfología y función diferente. **4**
- Figura 2.** Dibujo que representa los tipos de promastigotes descritos en el interior del insecto vector, de izquierda a derecha: promastigote procíclico, promastigote nectomona, promastigote leptomona, promastigote haptomona (*válvula estomodeal), promastigote paramastigote y promastigote metacíclico. **5**
- Figura 3.** Preparaciones teñidas con Giemsa de células derivadas de médula ósea infectadas con *L. amazonensis* (A) y *L. donovani* (B) mostrando una sola vacuola parasitófora que alberga numerosos parásitos (A) o vacuolas parasitóforas individuales (B). Las puntas de flecha señalan los límites de las vacuolas parasitóforas. **6**
- Figura 4.** Representación del ciclo de vida de *Leishmania*, incluyendo las fases intermedias en el hospedador invertebrado y en el hospedador mamífero. Los procesos indicados mediante la numeración se explican en el texto anterior a esta figura. **8**
- Figura 5.** Distribución geográfica de los países que más casos de LC reportaron a la OMS durante el año 2019. Modificado a partir del mapa original de la OMS **9**
- Figura 6.** Distribución geográfica de los países que más casos de LV reportaron a la OMS durante el año 2019. Modificado a partir del mapa original de la OMS. **10**
- Figura 7.** Serie de fotografías mostrando diversas manifestaciones cutáneas de LC. A. Úlcera temprana. B. Úlcera con bordes elevados. C. Cicatriz atrófica en antebrazo. D. Úlcera debida a *L. panamensis*. E. Pequeñas lesiones satélite alrededor de una úlcera principal. F. Lesiones típicas de LCD. **11**
- Figura 8.** Ejemplos de lesiones típicas de LMC. A. Paciente de 8 años diagnosticado de leishmaniasis tegumentaria africana con lesión pruriginosa en el labio superior. B. Lesiones mucocutáneas en la cara de un paciente que presenta una manifestación atípica de LMC causada por *L. major*. C. Lesión de la mucosa con perforación del tabique nasal e hinchazón del labio superior en un paciente infectado con *L. braziliensis*. **12**
- Figura 9.** A. Paciente de 5 años que muestra abultada hepatoesplenomegalia. B. Paciente de 5 años que presentaba hepatoesplenomegalia y que fue diagnosticado de coinfección de LV y malaria. C. Pápulas hipopigmentadas en la espalda de un paciente de 50 años que sufre PKDL. **13**
- Figura 10.** Estructuras químicas de las moléculas más utilizadas en el tratamiento de la leishmaniasis. **17**

- Figura 11.** Mecanismos de acción de la miltefosina en *Leishmania*. Entre los mecanismos de acción que han sido descritos para explicar la toxicidad de la miltefosina en protozoos como *Leishmania* se encuentran la alteración del metabolismo lipídico del parásito, la inducción de una muerte similar a la apoptosis debido a la producción de ROs, disfunción mitocondrial, efectos inmunomoduladores produciendo un balance de la respuesta inmune hacia el tipo Th1, entre otros. 19
- Figura 12.** Esquema que representa la diferencia en el tiempo que tarda en llegar al mercado un fármaco mediante el proceso tradicional de descubrimiento y desarrollo de los mismos (panel superior) y mediante el proceso de reposicionamiento de fármacos (panel inferior). 22
- Figura 13.** Hitos importantes en el descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN. **A.** Fotografía “51”, tomada por Rosalind Franklin y Raymond Gosling mediante difracción de rayos X. **B.** Modelo de doble hélice helicoidal propuesto por Watson y Crick en 1953. 23
- Figura 14.** Forma relajada del ADN sin tensiones de torsión (zona central de la figura) y efecto de la introducción de cruces positivos (derecha) y negativos (izquierda) formando superenrollamientos de ambos tipos (positivo y negativo). Created with BioRender.com. 24
- Figura 15.** Relajación del ADN mediante rotación controlada por acción de la TopI. La enzima se une al ADN y escinde una de las hebras, formando el complejo de escisión transitorio enzima-ADN. A continuación, una de las hebras gira alrededor de la otra permitiendo la relajación de la tensión en la doble hélice. Por último, se produce la religación de la rotura del ADN, restaurando la integridad de la doble cadena. 25
- Figura 16.** Mecanismo de desencadenamiento del ADN por la TopII. La enzima se une al ADN encadenado (dos dobles hélices enredadas) y se produce el corte de ambas hebras de uno de los dúplex (azul en la figura). La TopII forma un enlace covalente transitorio mientras la otra doble hélice (en rojo) pasa a través del corte producido gracias a la acción de la enzima. Finalizado el proceso, la TopII religa el ADN y se libera de la doble hélice. Created with BioRender.com. 26
- Figura 17.** Representaciones esquemáticas que muestran las diferencias existentes de los distintos tipos de Tops (TopIB, TopII y TopIII) de los tripanosomátidos y sus homólogos en humanos. **A.** TopIB humana (panel superior) y subunidades que conforman la TopIB en *L. donovani* (panel inferior). **B.** TopII α humana (panel superior) y de *L. donovani* (panel inferior). **C.** TopIII α humana (panel superior) y de *T. brucei* (panel inferior). La franja roja representa el residuo Tyr que permite la escisión del ADN. 27
- Figura 18.** Progresión de los SSBs a DSBs por la estabilización del complejo de escisión por parte de venenos de las Top. Una vez el complejo de escisión es estabilizado impidiendo que la Top restaure la integridad del ADN, durante la fase S, la hoquilla de replicación choca con el complejo enzima-inhibidor-ADN, provocando roturas de doble cadena. Created with BioRender.com. 28
- Figura 19.** Modificada de Real y Mortara, 2012. **A.** LAMP-1 (en rojo) delimita las VPs de *L. amazonensis* en macrófagos derivados de médula ósea infectados (BMMs). En verde se muestra un anticuerpo frente a *L. amazonensis*. A las 2 horas post-infección (A, panel de la izquierda) los parásitos se encuentran en VPs individuales que, transcurridas 48 horas, se han transformado en vacuolas grandes (asterisco) que albergan un mayor número de parásitos (puntas de flecha) (A, panel de la derecha). **B.** LAMP1 y LAMP2 (en rojo) 30

marcan las VPs de *L. major* 48 horas post-infección de BMMs. Las puntas de flecha indican surcos de fisión polarizados en el proceso de división de los amastigotes intracelulares. El asterisco señala parásitos individualizados

- Figura 20.** Representación esquemática de la formulación liposomal de anfotericina B. 31
- Figura 21.** Nanotransportadores poliméricos ordenados de menor a mayor tamaño mostrando las distintas composiciones químicas que pueden presentar. 33
- Figura 22.** **A.** Colocalización de las nanoflores de ADN con cresil violeta, que tiñe endosomas tardíos y lisosomas, en líneas celulares de macrófagos murinos (RAW264.7) y humanos (THP-1). **B.** Células THP-1 infectadas con *L. infantum* WT (panel superior) y *L. infantum* iRFP (panel inferior) colocalizando en las VPs con las nanoflores (flechas). La nanopartícula puede visualizarse gracias a la incorporación de un nucleótido fluorescente ATTO488 en el proceso de síntesis. 34
- Figura 23.** Representación esquemática suponiendo que se diferencien dos sexos, en este caso hembras y machos, del coste de los machos en la reproducción sexual frente a la reproducción asexual. En la figura los machos están representados por cuadrados y las hembras por círculos. 35
- Figura 24.** Tipos de poblaciones clonales o recombinantes, o clonal con una recombinación limitada. Los beneficios potenciales del sexo permiten purgar el genoma de mutaciones deletéreas y generar diversidad, mientras la reproducción sexual permite una rápida expansión. 37
- Figura 25.** Esquema que representa los ciclos biológicos del grupo Apicomplexa (*Plasmodium*, *Eimeria* y *Toxoplasma*) (panel A) y de *Trypanosoma* (panel B). **A.** El grupo Apicomplexa tiene diferenciación sexual (gametocitogénesis) en el interior de las células del hospedador desarrollándose como gametocitos masculinos o femeninos. Los gametos forman una célula diploide que sufre meiosis y da lugar a nuevos esporozitos infecciosos. En estos parásitos se diferencia una etapa asexual y una etapa sexual, ambas obligadas. **B.** El ciclo de vida de *T. brucei* y de otros tripanosomátidos consta de dos hospedadores, y las especies se mantienen diploides la mayor parte del tiempo. Opcionalmente, *T. brucei* puede dar lugar a gametos haploides en el insecto vector para realizar un ciclo sexual meiótico. 39
- Figura 26.** Expresión de los genes específicos de meiosis fusionados a la proteína fluorescente (YFP). **A.** Expresión de genes específicos de meiosis fusionados a la proteína fluorescente amarilla (YFP) en tripanosomas fijados en exudado salival de moscas tsé-tsé. El panel superior muestra la expresión del gen MND1, el panel central del gen DMC1 y el panel inferior muestra la expresión del gen HOP1. **B.** Tripanosomas localizados en el interior de una glándula salival de mosca tsé-tsé mostrando la expresión del gen HOP1. Los tripanosomas fluorescentes tienen una parte posterior roma (señalado con el asterisco) o puntiaguda (indicado con la flecha). 41
- Figura 27.** **A.** Filogenias simplificadas de las proteínas meióticas de los eucariotas, las cuales comparten un patrón evolutivo similar, con un origen ancestral de las arqueas. **B.** Distribución de las proteínas específicas de meiosis y de la proteína de la plasmogamia (HAP2) en los supergrupos eucarióticos. 42
- Figura 28.** Producción secuencial de intermediarios meióticos y gametos según Peacock y colaboradores. Los núcleos se representan en negro (4C o 2C) o en gris (1C). Los 43

kinetoplastos asociados a un flagelo se muestran en negro y los no asociados a flagelo se muestran en rojo. 1C, 2C, 3C y 4C se refieren a la cantidad de ADN total presente en un núcleo o una célula. N y K debajo de cada dibujo indica el número de kinetoplastos (K) y núcleos (N). La secuencia sería la siguiente: a partir de un tripanosoma normal (1 núcleo 2C diploide, 1 kinetoplasto) se forma un divisor meiótico (A) con 2 kinetoplastos y 1 núcleo replicado 4C que da lugar a los intermediarios C1 y C2 mediante una reducción convencional (intermediario B). C1 y C2 son intermediarios meióticos con múltiples kinetoplastos y 3 núcleos (1 núcleo 2C y 2 núcleos 1C, por lo que el contenido total de ADN sigue siendo aquí 4C). Al dividirse C1 para formar C2, se produce un gameto con núcleo 1C y 1 o más kinetoplastos. La célula resultante (D1) es un intermediario que posee 2 núcleos (un núcleo 2C y un núcleo 1C), es decir, es una célula 3C con un número variable de kinetoplastos. En este punto se forma un nuevo flagelo para la producción de un segundo gameto en el paso D2 a D3. El gameto formado tiene un núcleo 1C y 2 kinetoplastos y la célula resultante tiene un núcleo 2C (intermediario E1) en la que se forma un nuevo flagelo dando lugar al intermediario E2. Por último, la división del núcleo de E2 da lugar al intermediario F1, con 2 o 3 kinetoplastos y 2 núcleos 1C, de modo que en la siguiente etapa se produce la formación de dos tipos de gametos (F2) con núcleo 1C y 1 o 2 kinetoplastos si F1 era 3K2N (2K1N y 1K1N) o dos gametos 1K1N si F1 era 2K2N.

CAPÍTULO 1: Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*

Figure 1. Cell cycle proliferation of free-living *L. infantum* promastigotes. Cells treated with a single dose of indenoisoquinoline (green line) or without treatment (red line) were fixed and stained with propidium iodide and analyzed at the indicated times by flow cytometry. **90**

Figure 2. Histone H2A is phosphorylated in *L. infantum* promastigotes as response of LTopIB poisons. **A.** Partial alignment of the C-terminal end of trypanosomatid's histone H2A, showing the Thr residue suitable for phosphorylation as response of DNA damage. **B.** Peptide competition assay performed to demonstrate the specificity of the antibody prepared against KKGKA[pT]PSA. γ H2A signal induced in cells treated with CPT (10 μ M) decreased when the antibody competed with the phosphorylated peptide. **C.** Time-course phosphorylation of histone H2A analyzed by Western-blot hybridization with the polyclonal antibody, of promastigotes exposed to 10 μ M CPT (left), TPT (middle) and SN38 (right). The histogram shows the signal increase of γ H2A relative to time 0. **92**

Figure 2 (cont.). D. Time-course phosphorylation of histone H2A in promastigotes exposed – from left to right – to compounds **2, 3, 7, 12, 17** and **18**. *L. infantum* promastigotes were incubated with the reagents for 15, 60 and 120 min. Alfa-tubulin band is used as housekeeping control. The histogram shows the signal increase of γ H2A relative to time 0. **93**

Figure 3. γ H2A foci formation as response to CPT and indenoisoquinolines. **A.** Confocal microscopy images showing histone γ H2A phosphorylation as response to CPT and **2, 7, 17** and **18** indenoisoquinolines for a period of 30 min. Images were acquired in a Zeiss LS800 confocal microscope using 100X magnification. DNA was stained with DAPI and γ H2A with specific primary and secondary (FITC labeled) antibodies. Scale bar= 5 μ m. **B.** Box-plot distribution values representing the number of foci per nuclei obtained for **94**

each drug treatment. The foci number was obtained using the macro “Focinator” in the open-source program ImageJ. Two hundred cells were analyzed in two independent experiments for each treatment.

Figure 4. Induction of SDS/K-DNA precipitable complexes by indenoisoquinolines in *L. infantum* promastigotes. CPT (A) – as positive control – and the indenoisoquinolines 7 (B), 17 (C) and 18 (D) were added to cultures of *L. infantum* promastigotes, previously labeled with 0.5 mCi/mL [2-¹⁴C] thymidine for 24 h, for 30 min at the concentrations indicated in the bars. After this time, the percentage of SDS/K-DNA precipitable complexes was determined. Results are expressed as means ± SE for at least three different experiments carried out in duplicate. 95

CAPÍTULO 2: PEGylated Dendritic Polyglycerol Conjugate Delivers Doxorubicin to the Parasitophorous Vacuole in *Leishmania infantum* Infections

Figure 1. A. General structures of PG-DOX(pH)-PEG and PG-DOX(non)-PEG conjugates. B. Building blocks for the synthesis of PG-DOX(pH)-PEG and PG-DOX(non)-PEG. 113

Figure 2. Representative release profile of PG-DOX(pH)-PEG and PG-DOX(non)-PEG incubated at pH 4.0 and 7.4 at 37 °C over 27 h. The DOX release (%) was quantified using a SEC assay with assistance of UV–vis spectroscopy. Mean ± SEM were obtained from triplicates in three independent experiments. 115

Figure 3. Cytotoxicity of polymers against macrophage cell lines. A. RAW 264.7 and B. J774A.1. C. Uninfected ex vivo splenic explant. Free DOX (■), PG-DOX(pH)-PEG (●), PG-DOX(non)-PEG (▲). Cell cultures were incubated with different concentrations of polymers or free DOX at 37 °C for 96 h. AlamarBlue was added following manufacture instructions and fluorescence readouts used to express cell viability. CC₅₀ values were estimated by pharmacological approach using SigmaPlot. Mean ± SD error were obtained from duplicates in three independent experiments. X-axis represents μM concentrations of doxorubicin equivalents. 116

Figure 4. Curve dose response of free DOX and conjugated DOX polymers to PG against *iRFP+L. infantum* parasites. A. Effect against promastigotes cultures. Free promastigotes were incubated with different equivalent concentrations of DOX at 26 °C for 96 h. Promastigote viability measured as fluorescence was expressed as % respect untreated control. B. Effects against intracellular amastigotes were incubated with different equivalent concentrations of DOX at 37 °C for 96 h. Free DOX (■), PG-DOX(pH)-PEG (●), PG-DOX(non)-PEG (▲). Mean ± SD error were obtained from duplicates in three independent experiments. EC₅₀ values were estimated by sigmoidal fit using SigmaPlot 10.0. X-axis represents μM concentrations of doxorubicin equivalents. 118

Figure 5. Free and conjugated DOX to PG uptake in J774A.1 and RAW 264.7 macrophages at different time points. Once cells were attached to plates, free or conjugated DOX equivalent amounts (0.5 μM) were added to cultures. Macrophages were harvested and the unbound polymers were removed by acidic treatment. Red fluorescence intensity was acquired on logarithmic scale and represented versus scatter side. Gate Dox-positive population was established as 2% in untreated cells. Uptake is expressed as %. 120

Values are means \pm standard error. **A.** J774A.1 macrophages. **B.** RAW 264.7 macrophages.

Figure 6. Free DOX and PG-DOX(pH)-PEG conjugates trafficked to spatially distinct intracellular locations within 24 h post-treatment with live RAW 264.7 macrophages. **A.** Free DOX after different treatment times. Nucleus is stained with Hoechst 34580 (blue), lysosomes are stained with cresyl-violet (red), and DOX is shown in green. Free DOX is not seen inside nuclei within 30 min, but clearly detected after 24 h. The amastigotes nuclei appear in blue (crosses). PG-DOX(pH)-PEG treatment for 24 h (bottom line) showed that DOX strongly accumulates in vesicles containing parasites that co-localize with cresyl-violet. **121**

Figure 6 (cont.). Free DOX and PG-DOX(pH)-PEG conjugates trafficked to spatially distinct intracellular locations within 24 h post-treatment with live RAW 264.7 macrophages. **B.** DOX fluorescence detected in nuclei of cells treated with free DOX or PG-DOX(pH)-PEG conjugate. A region of interest (ROI) was drawn over nuclei to quantify DOX accumulated in nuclei. Results represented as mean \pm SEM. **122**

Figure 7. A. PG-DOX(pH)-PEG conjugates trafficked to lysosomes and co-localize with intracellular parasites inside lysosomes in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-transduced with GFP-LAMP-1. Free DOX and PG-DOX(pH)-PEG conjugate were added for 24 h before image acquisition. Nucleus is stained with Hoechst 34580 (blue), LAMP-1 is labeling late endosomes and lysosomes (green) and DOX is shown in orange. DOX fluorescence was detected in lysosomes. **123**

Figure 7. B. A line crossing single representative lysosomes was manually traced with a one-pixel width and quantification of the DOX fluorescence in free DOX and PG-DOX(pH)-PEG treated cells is shown. **124**

Figure 8. PG-DOX(pH)-PEG conjugates prevents necrosis in RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with 1.0 μm free DOX or conjugated DOX equivalent amounts for 24 h before apoptosis/necrosis evaluation. Dot-plots showing viability (left bottom), early apoptosis (right bottom), late apoptosis (right top), necrosis (left top). **125**

Figure S1. Size distribution histograms by i) intensity and ii) volumen of PG-DOX-PEG conjugates A and B. **127**

Figure S2. Flow cytometry histogram for uptake studies in J774A.1 macrophages. X-axis represents fluorescence inside the cells. Control untreated cells (grey), free DOX (red), PG-DOX-(pH)-PEG (blue), PG-DOX(non)-PEG (green). **128**

Figure S3. Uptake of PG-DOX(pH)-PEG, PG-DOX(non)-PEG, and free DOX in (A) J774.1 and (B) RAW 264.7 macrophages. SSC: side scatter. TR: Texas Red. **129**

CAPÍTULO 3 – PARTE A: Reproduction in trypanosomatids: past and present

Figure 1. Genomic and kDNA inheritance in trypanosomatids: **A.** Models representing two possible sexual reproduction strategies in trypanosomatids that allow mixture of parental genotypes in daughter cells: (A1) A parasexual process in which two aneuploid parental cells (approximately 2n) are fused to give rise to a transient aneuploidy genotype **141**

(approximately 4n), which further reduces its chromosomal burden in an asymmetric way to produce aneuploid daughter cells (approximately 2n). (A-2) Meiotic process, in which the hypothetical putative distribution of parental chromosomes is represented in daughter cells. Cells are represented with 4 pairs of chromosomes and reflect the mosaic aneuploidy that is frequent in the trypanosomatid *Leishmania*. A classical image of chromosomes is depicted in the figure despite the fact that the genetic material does not condense during the life cycle of trypanosomatids. Chromosomal recombination between homologous chromosomes is not represented in the figure; **B.** Model representing the result of kDNA inheritance. It can be biparental in maxicircles and minicircles, but after some clonal divisions, maxicircles, unlike minicircles, only maintain one parental genotype.

Figure 2. **A.** Schematic representation of hybrid generation using parental mixtures in the vector insect or *in vitro* using microplates; **B.** Example of two parents used to obtain an intraclonal hybrid between *L. infantum* BCN150 mCherry BSD and *L. infantum* BCN150 CTN PAC; **C.** Schematic showing the integration of pLEXSY plasmids, which allow the expression of fluorescent proteins and antibiotic resistance genes, at the 18S RNA locus; **D.** Specific PCR amplification of the gene encoding fluorescent proteins in the parental parasites (lines 1, 2, 3 and 4) and in the hybrid (lines 5 and 6). 148

CAPÍTULO 3 - PARTE B: Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation in *Leishmania*: successful crossings between visceral and cutaneous strains.

Figure 1. Engineered *Leishmania* parental strains. **A.** Schematic representation of pLEXSY-CTN-PAC. 171

Figure 1 (cont.). Engineered *Leishmania* parental strains. **B.** Representative confocal microscopy pictures of promastigotes of the parental fluorescent strains of *Leishmania* used for the intraclonal and interspecies outcrossings. Lt mCh HYG: *L. tropica* mCh HYG (561 nm); Lt CTN PAC: *L. tropica* CTN PAC (488 nm); Lt iRFP PAC: *L. tropica* iRFP PAC (640 nm); Ld mCh HYG: *L. donovani* mCh HYG (561 nm); Ld CTN PAC: *L. donovani* CTN PAC (488 nm); Lm mCh HYG: *L. major* mCh HYG (561 nm); Lm CTN PAC: *L. major* CTN PAC (488 nm). 172

Figure 2. Characterization of intraclonal hybrids. **A.** Confocal microscopy showing the interaction between LULO cells and parental cell lines of *L. tropica* before mating. 173

Figure 2 (cont.). Characterization of intraclonal hybrids. **B.** Representative image of confocal microscopy of one hybrid clone of *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC and fluorescence emission in the mCh (561 nm) and CTN (488 nm) channels. **C.** Growth curves (number of promastigotes in culture during 7 days) of the parental *L. tropica* mCh HYG (Lt mCh) and *L. tropica* CTN PAC (Lt CTN), and three representative intraclonal hybrids (Lt mCh x Lt CTN 1, 2 and 3). **D.** Agarose gels of the electrophoresis of the PCR products obtained after the amplification of the genes encoding fluorescent proteins (mCh and CTN) and antibiotic resistance (HYG or PAC) in the parental (P) and three representative intraclonal hybrids (H). The arrowheads indicate the 1000 bp band in the DNA molecular weight marker (M). 174

Figure 3. Characterization of interspecific hybrids. **A, left panel.** Representative merged images of confocal microscopy and fluorescence emission in the mCh (561 nm) 176

and CTN (488 nm) channels of one hybrid clone obtained after the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld mCh HYG x Lm CTN PAC. **A, right panel.** Representative merged images of confocal microscopy and fluorescence emission in the mCh (561 nm) and iRFP (640 nm) channels of one hybrid clone obtained after the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld mCh HYG x Lt iRFP PAC. **B, left panel.** Growth curves (number of promastigotes in culture during 7 days) of the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh) and *L. major* CTN PAC (Lm CTN) and the interspecies hybrids Ld mCh x Lm CTN 1, 2 and 3. **B, right panel.** Growth curves (number of promastigotes in culture during 7 days) of the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh) and *L. tropica* iRFP PAC (Lt iRFP), and the interspecies hybrids Ld mCh x Lt iRFP 1 and 2.

Figure 3 (cont.). Characterization of interspecific hybrids. C, left panel. Agarose gels of the electrophoresis of the PCR products obtained after the amplification of the genes encoding fluorescent proteins (mCh and CTN) and antibiotic resistance (HYG or PAC) in the parental strains (P) and in the three interspecies hybrids (H) obtained after the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC. **C, right panel.** Agarose gels of the electrophoresis of the PCR products obtained after the amplification of the genes encoding fluorescent proteins (mCh and iRFP) and antibiotic resistance (HYG or PAC) in the parental strains (P) and in the two interspecies hybrids (H) resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC. The arrowheads indicate the 1000 bp band in the DNA molecular weight marker (M). 177

Figure 4. Analysis of the ploidy profile. A. Representative chart of flow cytometry showing the ploidy of *L. tropica* mCh HYG (Lt mCh HYG), *L. tropica* CTN PAC (Lt CTN PAC) and one hybrid of the intraclonal crossing (Hybrid 1 Lt x Lt). **B.** Representative chart of flow cytometry showing the ploidy of *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh HYG), *L. major* CTN PAC (Lm CTN PAC) and one hybrid of the interspecies crossing (Hybrid 1 Ld x Lm). **C.** Representative chart of flow cytometry showing the ploidy of *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh HYG), *L. tropica* iRFP PAC (Lt iRFP PAC) and one hybrid of the interspecies crossing (Hybrid 1 Ld x Lt). *L. major* Friedlin (ploidy = 2n) and *L. braziliensis* Mb2904 (ploidy = 3n) were used as ploidy controls (2N CONTROL and 3N CONTROL, respectively) in order to assess the ploidy of the rest of the parasites. 178

Figure 5. Characterization of the nuclear inheritance of the interspecies hybrids. A. Agarose gels of the SNP-CAPs analysis showing the DNA products after PCR amplification and enzymatic digestion of the ten genes present in nine different chromosomes. The electrophoretic profile of the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC is shown in the top panel, whereas the electrophoretic profile of the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC is shown in the bottom panel. Note the absence of the *L. major* allele of the gene located on chromosome 1 in hybrid number two (indicated with an asterisk). 180

Figure 5 (cont.). Characterization of the nuclear inheritance of the interspecies hybrids. B. Agarose gels of the PCR amplification of the A2 gene in the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (top panel), and in the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (bottom panel). The arrowheads indicate the 1000 bp band in the DNA molecular weight marker (M). **C.** Fluorograms showing the sequence of part of the actin gene and some SNPs (marked with an asterisk) in the parental strains *L.* 181

donovani mCh HYG (Ld), *L. major* CTN PAC (Lm) and *L. tropica* iRFP PAC (Lt), and one representative hybrid of the outcrossing between *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld x Lm) and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld x Lt). Note the triple nucleotide peaks in the fluorograms of *L. donovani* x *L. tropica* hybrid (arrow in the SNP located at position 462 in the right panel).

Figure 6. Characterization of the inheritance of extra chromosome sets in the interspecies hybrid clones. A. Agarose gels of the SNP-CAPs analysis showing the DNA products after PCR amplification and enzymatic digestion of three loci present in chromosomes 2, 22 and 35. The top panel shows the electrophoretic profile of *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. major* CTN PAC (Lm) and three hybrids (Ld x Lm), and the ratios between the intensity of the upper band from the parental *L. donovani* and the uncut upper band from the other parental *L. major* in the corresponding hybrid clones. Simulated 3n were created by mixing parental DNA in 1:1, 1:2 and 2:1 ratio (*L. donovani*:*L. major*). The bottom panel shows the electrophoretic profile of *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. tropica* iRFP PAC (Lt) and two hybrids (Ld x Lt), and the ratios between the intensity of the upper band from the parental *L. donovani* and the uncut upper band from the other parental *L. tropica* in the corresponding hybrid clones. Simulated 4n were created by mixing parental DNA in 1:1, 1:3 and 3:1 ratio (*L. donovani*:*L. tropica*). The arrowhead indicates 1000 bp in the DNA molecular weight marker (M).

182

Figure 6 (cont.). Characterization of the inheritance of extra chromosome sets in the interspecies hybrid clones. B, C. Statistical representation by k-means analysis in SPSS of the extrachromosome inheritance of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld mCh HYG x Lm CTN PAC) hybrids, which are clustered together with ratio 2:1 (LdxLm) (B), and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld mCh HYG x Lt iRFP PAC) hybrids, the latter being clustered together with ratio 1:3 (LdxLt) (C).

183

Figure 7. Characterization of the inheritance of kDNA in the interspecies hybrid clones. A, B, top panels. Agarose gels of the SNP-CAPs analysis showing the DNA products after PCR amplification and enzymatic digestion of *Cyb* and *ND5* genes. The electrophoretic profile of the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. major* CTN PAC (Lm) (A), or the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. tropica* iRFP PAC (Lt) (B), are shown. **A, B bottom panels.** Fluorograms showing the sequence of part of the *ND7* and *I2 sRNA* genes with some SNPs, which have been indicated as Ld (*L. donovani*) and Lm (*L. major*) in the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. major* CTN PAC (Lm) and in their clonal hybrids (LdxLm) 1, 2 and 3 (A), or as Ld (*L. donovani*) and Lt (*L. tropica*) in the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. tropica* iRFP PAC (Lt) and in their clonal hybrids (LdxLt) 1 and 2 (B). C. Agarose gels showing the band profile after amplification of a conserved region (MIN1) or a variable region (MIN2) of minicircles in the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. major* CTN PAC (Lm) (left panel), or in the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. tropica* iRFP PAC (Lt) (right panel). The arrowhead indicates 1000 bp in the DNA molecular weight marker (M).

184

Figure 8. Infectivity of intraclonal and interspecies hybrids. A. Representative image of confocal microscopy of a RAW cell infected with one hybrid of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC. Merge and fluorescent pictures in the mCh (561 nm) and CTN (488 nm) channels are shown. **B.** Representative image of BMMs infected with amastigotes of one hybrid of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC and stained with Giemsa.

186

Figure 8 (cont.). Infectivity of intraclonal and interspecies hybrids. C. Box plots representing the number of amastigotes present within each BMM after *in vitro* infection of either promastigotes or amastigotes of *L. tropica* mCh HYG (Lt mCh), *L. tropica* CTN PAC (Lt CTN), three intraclonal hybrids *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC (Lt x Lt 1, 2 and 3), *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh), *L. major* CTN PAC (Lm CTN) three interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld x Lm 1, 2 and 3), *L. tropica* iRFP PAC (Lt iRFP), and two interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld x Lt 1 and 2). **D.** Bar graphs representing the percentage of infected BMMs after *in vitro* infection of either promastigotes or amastigotes of *L. tropica* mCh HYG (Lt mCh), *L. tropica* CTN PAC (Lt CTN), three intraclonal hybrids *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC (Lt x Lt 1, 2 and 3), *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh), *L. major* CTN PAC (Lm CTN) three interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld x Lm 1, 2 and 3), *L. tropica* iRFP PAC (Lt iRFP), and two interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld x Lt 1 and 2). Differences were considered as significant when $p < 0,05$ and in a Kruskal-Wallis test (C) or in a one-way ANOVA analysis (D) (represented with an asterisk regarding the first parental line and with a hash regarding the second parental line). **187**

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1. Vacunas que han llegado a ensayos clínicos.	16
---	----

CAPÍTULO 1: Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*

Table 1. Bioactivity of <i>N</i> -6-aminoalkyl indenoisoquinolines on iRFP- <i>L. infantum</i> promastigotes and splenic-infecting amastigotes. The cytotoxic effect was assessed on mouse non-infected splenocytes using the Alamar Blue method. Each point represents the average of three different experiments by duplicate.	86
---	----

Table 2. Bioactivity of <i>N</i> -6-imidazolylpropyl indenoisoquinolines on iRFP- <i>L. infantum</i> promastigotes and splenic-infecting amastigotes. The cytotoxic effect was assessed on mouse non-infected splenocytes using the Alamar Blue method. Each point represents the average of three different experiments by duplicate.	87
---	----

Table 3. Bioactivity of <i>N</i> -6-morpholinopropyl indenoisoquinolines on iRFP- <i>L. infantum</i> promastigotes and splenic-infecting amastigotes. The cytotoxic effect was assessed on mouse non-infected splenocytes using the Alamar Blue method. Each point represents the average of three different experiments by duplicate.	88
---	----

CAPÍTULO 2: PEGylated Dendritic Polyglycerol Conjugate Delivers Doxorubicin to the Parasitophorous Vacuole in *Leishmania infantum* Infections

Table 1. Physico-chemical characterization of PG-DOX-PEG conjugates.	114
---	-----

Table S1. Summary of the hydrodynamic diameters measured by DLS of PG-DOX-PEG conjugates	127
---	-----

CAPÍTULO 3 - PARTE B: Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation in *Leishmania*: successful crossings between visceral and cutaneous strains.

Table 1: Primers used in this work	166
---	-----

Table 2: Genes tested by SNP-CAPs. The gene name, gene identification (ID), location, the name of forward and reverse primers used for PCR amplification	169
---	-----

(sequence of these primers can be found in Table 1), SNP position, as well as the expected band sizes after digestion with the suitable restriction enzymes, are shown.

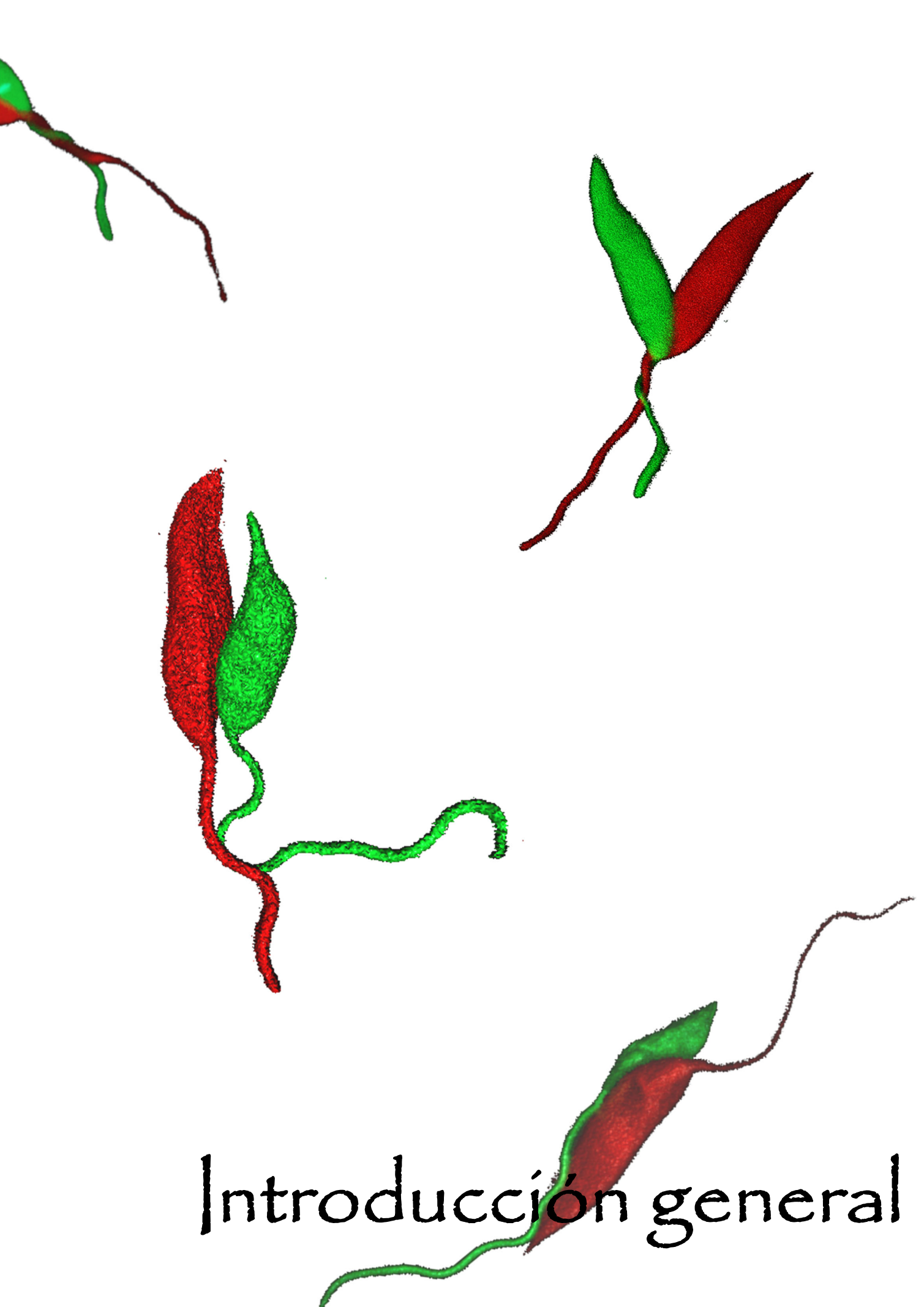
Table 3. Intraclonal hybrid formation in *L. tropica* 172

Table 4. Interspecies crossings performed with *L. donovani*, *L. major* and *L. tropica*, and the success rate (percentage of hybrids obtained) using different mating parental lines, different promastigote stages and in the presence and absence of LULO cells. 175

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN-PK (Proteína quinasa dependiente de ADN)	GFP (Green fluorescent protein – Proteína fluorescente verde)
AmB (Amphotericin B)	HBSS (Hanks balanced salt solution)
ATM (Ataxia telangiectasia mutada)	HYG (Hygromicine)
ATR (Ataxia telangiectasia-Rad3)	IR (Luz infrarroja)
ATSB (Attractive targeted sugar baits – Cebos de azúcar tóxicos atractivos)	iRFP (infrared fluorescent protein)
AVAD (Años de vida ajustados por discapacidad)	ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1)
BLA (Blasticidine)	kDNA (ADN del kinetoplasto)
BMM (Bone marrow-derived macrophages – Macrófagos derivados de médula ósea)	LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein 1)
CLR (C-type lectin receptors)	LC (Leishmaniasis cutánea)
CPT (Camptothecin)	LCan (Leishmaniasis canina)
DDT (Diclorodifeniltricloroetano)	LCD (Leishmaniasis cutánea difusa)
DLS (Dynamic light scattering)	LDPK (Leishmaniasis dérmica post kala-azar)
DOX (Doxorubicin - Doxorubicina)	LMC (Leishmaniasis mucocutánea)
DSB (Double strand break – Rotura de doble cadena)	LPG (Lipofosfoglicano)
DTUs (Discrete Typing Units)	LTopIB (<i>Leishmania</i> topoisomerase IB – Topoisomerasa IB de <i>Leishmania</i>)
FBS (Heat-inactivated fetal bovine serum – Suero fetal bovino inactivado por calor)	LV (Leishmaniasis visceral)
FCS (Heat-inactivated fetal calf serum)	MA (Antimoniato de meglumina)
	mCh (mCherry)
	NGS (Next-generation sequencing)

NO (Óxido nítrico)	SEC (Size exclusion chromatography)
NTD (Neglected tropical disease - Enfermedad tropical desatendida)	SI (Selectivity index – Índice selectivo)
OMS (Organización Mundial de la Salud)	SNP-CAPs (Single nucleotide polymorphisms cleaved amplification polymorphic site)
PAC (Puromycin)	SSB (Single strand break – Rotura de cadena simple)
PCE (Predominant Clonal Evolution – Evolución Clonal Predominante)	SSG (Estibogluconato de sodio)
PDI (Polydispersity index)	Tdp1 (Tyrosil DNA-phosphodiesterase – Tirosil ADN-fosfodiesterasa)
PEG (Polyethyleneglycol - Polietilenglicol)	Th1 (células T-helper 1)
PG (polyglycerol)	Top (Topoisomerasa)
PGA (Poli ácido glicólico)	TopI (Topoisomerasa de tipo I)
PI (propidium iodide)	TopII (Topoisomerasa de tipo II)
PIKKs (Phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like family)	TPT (Topotecan)
PLA (Poli ácido láctico)	UV (Luz ultravioleta)
PLGA (Poli ácido láctico-co-glicólico)	VIH (Virus de la inmunodeficiencia humana)
PS (Fosfatidilserina)	VP (Vacuola parasitófora)
RFP (Red fluorescent protein – Proteína fluorescente roja)	YFP (Yellow fluorescent protein – Proteína fluorescente amarilla)
ROs (Reactive oxygen species – Especies reactivas de oxígeno)	γ H2AX (Variante de la histona H2AX fosforilada)
RQH (Red Queen Hypothesis – Hipótesis de la Reina Roja)	
Sb ^v (Antimoniales pentavalentes)	



Introducción general

1. AGENTE ETIOLÓGICO. TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DEL PARÁSITO

1.1. Género *Leishmania*

Los protistas kinetoplásticos (Clase Kinetoplastea), entre los que encontramos el género *Leishmania*, pertenecen, junto a las Clases de protistas Euglenoidea, Postgaurdea y Diplonemea, al Filo Euglenozoa.¹ El nombre de la clase Kinetoplastea (orden Kinetoplastida en clasificaciones anteriores) se debe al característico kinetoplasto que poseen.² El kinetoplasto es un conjunto de ADN extranuclear situado en el interior de la única mitocondria que tienen estas especies y puede presentarse en forma de tres patrones distintos dentro de las familias pertenecientes a esta Clase; compactado y situado cerca de la bolsa flagelar (eukinetoplasto), disperso alrededor del lumen mitocondrial en grupos separados e idénticos (polikinetoplasto) o disperso como una masa difusa e irregular en el interior de la mitocondria (pankinetoplasto).^{2,3} El kinetoplasto contiene miles de anillos de ADN entrelazados de dos tipos: maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos son aproximadamente 50 moléculas de ADN conservadas y de mayor tamaño que los minicírculos⁴, contienen genes mitocondriales que codifican para algunas proteínas, dos genes de ARN ribosómico, algunos genes con función desconocida y algunas guías de ARN.^{5,6} Por otro lado, los minicírculos, mucho más abundantes que los maxicírculos (5000-10000 por célula) codifican ARNs guía que participan en la edición de los ARN mitocondriales.⁷

Dentro de este amplio grupo, los parásitos de importancia médica a destacar son los agentes causantes de la enfermedad de Chagas, aquellos responsables de la tripanosomiasis africana y los parásitos que provocan los distintos tipos de leishmaniasis. Todos ellos pertenecen a los géneros *Trypanosoma* o *Leishmania*, clasificados ambos dentro de la familia Trypanosomatidae. A su vez, las especies que se encuadran dentro del género *Leishmania* se clasifican en tres subgéneros en función de la localización en la que se desarrollan los parásitos en el intestino del vector invertebrado. El subgénero *Sauroleishmania* incluye especies cuyos hospedadores se limitan a reptiles del Viejo Mundo y se desarrollan únicamente en el intestino posterior (píloro y recto) del insecto vector (parásitos hipopilares). El subgénero *Leishmania* incluye especies (por ejemplo *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* o el complejo *L. infantum*) cuyo desarrollo se produce en el intestino medio y el intestino anterior (parásitos suprapilares). Los hospedadores de estos parásitos son mamíferos en el Viejo y el Nuevo Mundo. Por último, el subgénero *Viannia* incluye las especies (por ejemplo *L. braziliensis*, *L. tarentolae* o *L. adleri*) cuyo desarrollo primero tiene lugar en el intestino posterior, antes de migrar hacia el intestino medio y el intestino anterior (parásitos peripilares). Sus hospedadores van desde reptiles en el Viejo Mundo hasta mamíferos en el

Nuevo Mundo.⁸⁻¹⁰ Debido a la gran cantidad de especies existentes y las diferencias entre ellas, las especies de *Leishmania* también se diferencian entre aquellas procedentes del Viejo Mundo (que incluye África, Asia, Oriente Medio y el sur de Europa) y especies localizadas en el Nuevo Mundo (que se refiere a aquellas que encontramos en México, América Central, América del Sur y Estados Unidos)^{11,12}

1.2. Morfología de *Leishmania*

Los parásitos pertenecientes al género *Leishmania* son pleomórficos, con dos tipos celulares principales (Figura 1) que son morfológica y fisiológicamente diferentes, aunque comparten las características celulares básicas (kinetoplasto anterior al núcleo y flagelo que se extiende desde el cuerpo basal).¹³ La invaginación en la que se sitúa el flagelo constituye en ambas formas la bolsa flagelar, estructura importante en estos parásitos por ser el único lugar en el que se producen procesos como la endocitosis y la exocitosis, por lo que resulta importante en las interacciones hospedador-parásito.^{13,14} El promastigote es la forma proliferativa, tiene una morfología ovoide y alargada, es extracelular, móvil gracias a la presencia de flagelo y se localiza en el tracto digestivo de su vector. Por otro lado, el amastigote es la forma quiescente, tiene una morfología esférica y es de menor tamaño, es inmóvil (el flagelo apenas sobresale de la bolsa flagelar) e intracelular (se localiza en el interior de vacuolas parasitóforas en las células del hospedador mamífero, principalmente macrófagos).^{13,15}

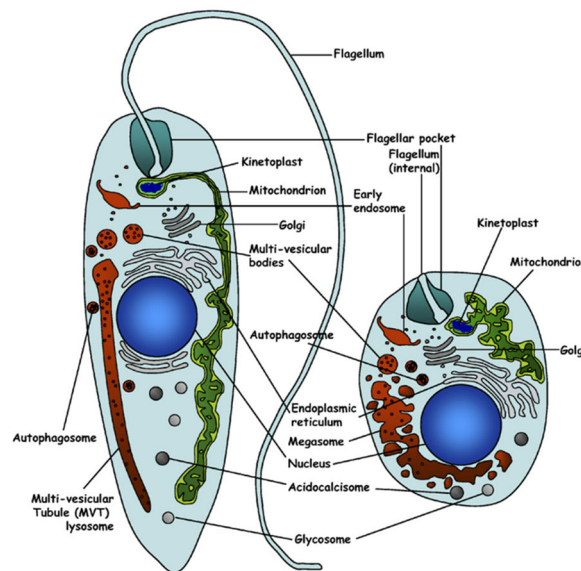


Figura 1. Representación esquemática mostrando las principales similitudes y diferencias entre la forma proliferativa móvil (promastigote) y la forma quiescente inmóvil (amastigote) en *Leishmania*.¹⁵ Como puede observarse, aunque la morfología es diferente, la mayor parte de las características se conservan en ambas formas, siendo la principal diferencia el flagelo, que además de presentar una longitud distinta, tiene una composición, morfología y función diferente.¹⁶

Aunque las características básicas se mantienen, el promastigote se divide en varios subtipos que realizan distintas funciones a lo largo del ciclo de vida del parásito en el vector. Se han descrito seis tipos de promastigotes (Figura 2) que se clasifican principalmente por la relación anchura/longitud del cuerpo celular del parásito, así como por la relación existente entre la longitud del flagelo y la del cuerpo celular^{13,17,18}, estos son: i) promastigote procíclico, con una longitud del cuerpo celular que varía entre 6.5 y 11.5 μm y una anchura variable, flagelo de menor longitud que el cuerpo celular; ii) promastigote nectomona: cuerpo celular de más de 12 μm , la longitud del flagelo y la anchura del cuerpo celular es variable; iii) promastigote leptomona, con una longitud del cuerpo celular entre 6.5 y 11.5 μm y un flagelo de mayor longitud que el cuerpo celular; iv) promastigote haptomona, cuya punta del flagelo (de longitud variable) se extiende en forma de disco, con morfología variable del cuerpo celular; v) paramastigote, forma rara que presenta el kinetoplasto adyacente al núcleo, con flagelo presente de longitud variable¹⁷ y vi) promastigote metacíclico, con un cuerpo celular menor a 8 μm de longitud y anchura menor de 1 μm , y que presenta un flagelo de longitud considerablemente mayor que el cuerpo celular.

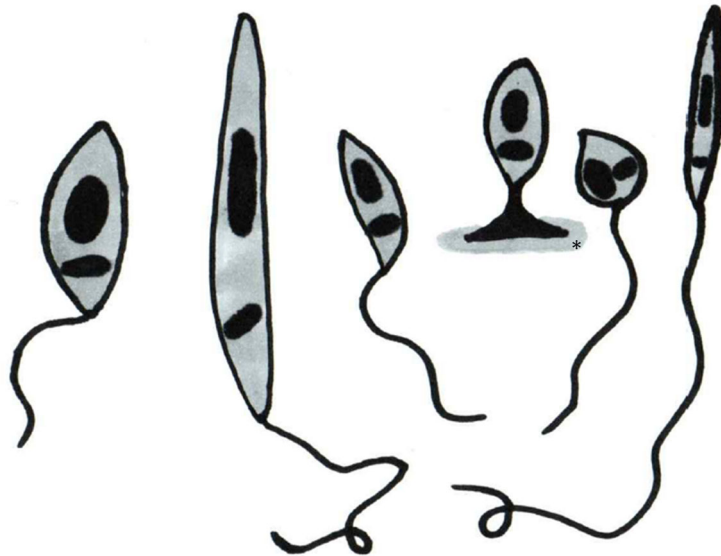


Figura 2. Dibujo que representa los tipos de promastigotes descritos en el interior del insecto vector, de izquierda a derecha: promastigote procíclico, promastigote nectomona, promastigote leptomona, promastigote haptomona (*válvula estomodeal), promastigote paramastigote y promastigote metacíclico.

El amastigote presenta una relación superficie-volumen menor en comparación con el promastigote, lo que permite que el parásito reduzca el área expuesta al entorno hostil de la vacuola parasitófora en la que se encuentra.¹³ Aunque no se han descrito distintos tipos de amastigotes, existen diferencias entre distintas especies de *Leishmania* en la disposición de los amastigotes en las vacuolas parasitóforas, de modo que en especies como *L. mexicana* o

L. amazonensis, los amastigotes se localizan agrupados en una misma vacuola parasitófora. En el resto de especies de *Leishmania*, como por ejemplo *L. major* o *L. donovani*, los amastigotes se encuentran en vacuolas parasitóforas individuales^{19,20} (Figura 3).

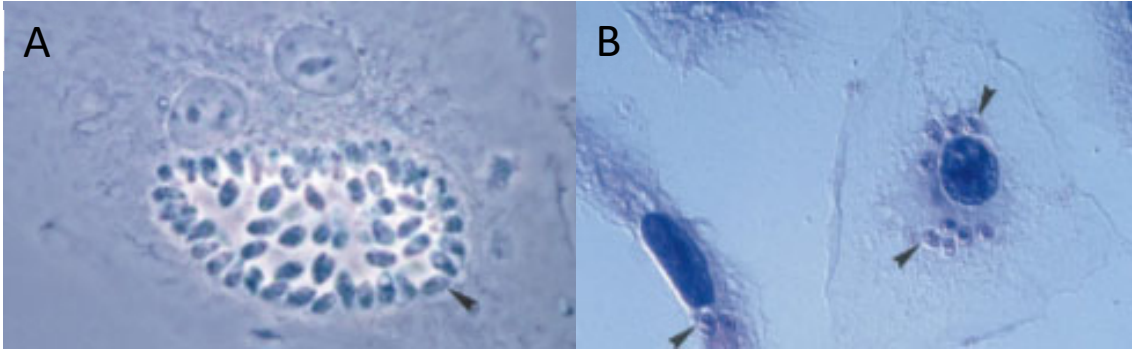


Figura 3.²⁰ Preparaciones teñidas con Giemsa de células derivadas de médula ósea infectadas con *L. amazonensis* (A) y *L. donovani* (B) mostrando una sola vacuola parasitófora que alberga numerosos parásitos (A) o vacuolas parasitóforas individuales (B). Las puntas de flecha señalan los límites de las vacuolas parasitóforas.

1.3. Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo biológico de *Leishmania* es digenético, es decir, se desarrolla en dos hospedadores distintos. Incluye una fase en las hembras del insecto vector (géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*)⁸ y otra en el hospedador mamífero, que incluye el ser humano, cánidos domésticos y silvestres, liebres, e incluso gatos o equinos, entre otros.²¹⁻²³

De acuerdo con el esquema de la Figura 4²⁴, el ciclo biológico de *Leishmania* comienza con la ingestión de sangre infectada con *Leishmania* por parte de una hembra flebotomina (**1, en amarillo**). Al ingerir el alimento, el insecto regurgita parte de su sangre, inoculando los promastigotes metacíclicos (con capacidad infectiva) (**2**) que son fagocitados por macrófagos y neutrófilos en el lugar de la picadura (**3**). Los neutrófilos son las células que llegan en primer lugar y podrían actuar como un caballo de Troya en la infección de *Leishmania*, ocultando el parásito al sistema inmune del hospedador y facilitando la infección de los macrófagos cuando fagocitan neutrófilos apoptóticos infectados²⁵⁻²⁸, aunque se piensa que esto puede variar en función de la especie de *Leishmania*, de modo que algunas especies pueden ser capaces de modular de forma más efectiva la apoptosis de los neutrófilos.²⁹ En el interior del fagolisosoma del macrófago, los promastigotes se transforman en amastigotes infectivos (**4**) gracias al ambiente ácido y al aumento de temperatura.^{15,30} Los amastigotes se dividen en el interior de los macrófagos por fisión binaria (**5**) de modo que finalmente la célula que los contiene se lisa, liberando los amastigotes y permitiendo que éstos infecten las células de alrededor (**6**). Es posible que la

función principal del flagelo en los amastigotes sea sensorial, ya que su estructura recuerda en gran medida a los cilios primarios de los mamíferos.¹⁶ De este modo, el flagelo en los amastigotes no sería un orgánulo residual, si no que tendría funciones como la detección de la capacidad de supervivencia del macrófago en el que se encuentra, dividiéndose en caso de detectar que el macrófago se mantiene funcional e inhibiendo su división en caso de que el macrófago fuese a morir y liberar los amastigotes que contiene.^{13,16}

Si los mecanismos de defensa inmune del hospedador no terminan con el parásito, los amastigotes infectivos colonizan diversos órganos en la leishmaniasis visceral **(7)** principalmente hígado y bazo^{31,32}, lugares en los que el parásito se replica y establece la infección **(8)**. En el caso de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea, es en el propio lugar de la picadura donde se establece la infección, generando una respuesta inflamatoria que da lugar a las manifestaciones cutáneas típicas de estas especies.²⁸ El ciclo continúa en el vector cuando una hembra flebotomina acude a ingerir sangre del mamífero infectado **(9)**, recogiendo células infectadas con amastigotes de *Leishmania* o bien parásitos libres junto a la sangre que le sirve de alimento. En el interior del intestino posterior del insecto **(10)** los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos **(11)** al disminuir la temperatura y aumentar el pH.^{8,13} Estos promastigotes se dividen activamente y se transforman en promastigotes nectomonas, los cuales migran **(12)** hacia el intestino medio anterior (válvula estomodal) del insecto, donde se transforman en promastigotes leptomonas **(13)**.^{18,33} Los promastigotes leptomonas se dividen en una segunda fase de crecimiento y posteriormente se transforman en promastigotes metacíclicos mediante el proceso de diferenciación denominado metaciclogénesis **(14)**, situándose cerca de la probóscide de la mosca a la espera de una nueva ingesta de sangre, que en el proceso los regurgitará para una nueva infección de otro hospedador.²⁴ Los promastigotes metacíclicos no regurgitados en el proceso sufren una rediferenciación, transformándose en promastigotes retroleptomonas mediante un proceso denominado retrometaciclogénesis.³⁴ Los retroleptomonas se replicarán en el interior del vector dando lugar a un aumento del número de promastigotes leptomonas adheridos al intestino medio anterior del flebotomo **(14)**. Esto tendrá como consecuencia el aumento de la población de promastigotes metacíclicos en una nueva etapa de diferenciación. De este modo, las sucesivas ingestas de sangre por parte de hembras flebotominas producen un aumento de la capacidad infectiva de *Leishmania*.^{24,34}

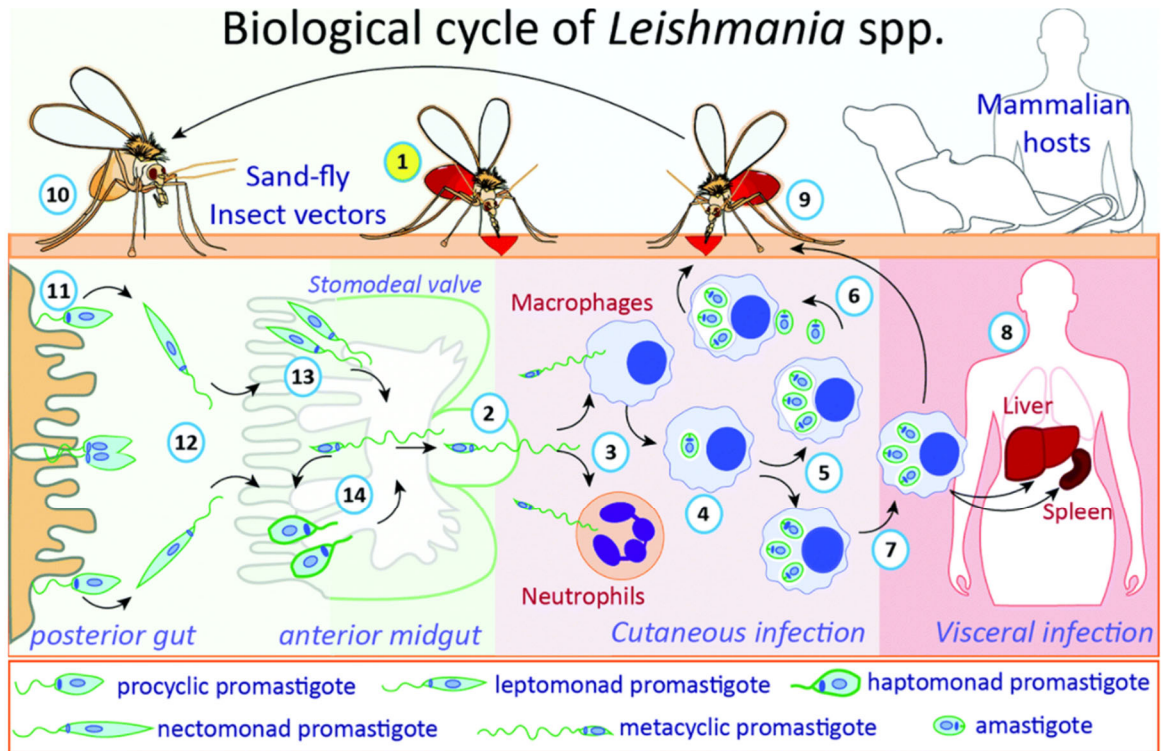


Figura 4. Representación del ciclo de vida de *Leishmania*, incluyendo las fases intermedias en el hospedador invertebrado y en el hospedador mamífero.²⁴ Los procesos indicados mediante la numeración se explican en el texto anterior a esta figura.

1.4. Vectores

Los flebotómíneos son pequeños dípteros hematófagos que pertenecen a la familia Psychodidae y actúan como transmisores o vectores de parásitos del género *Leishmania* y también de bacterias del género *Bartonella* e incluso de algunos virus.^{12,35} Los miembros de esta familia predominan en regiones tropicales y subtropicales y se clasifican en 6 géneros, de los cuales los más importantes en la transmisión de *Leishmania* son los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.¹⁰ Un aspecto interesante es que los vectores se consideran permisivos o específicos en función de si muestran especificidad por algunas especies de *Leishmania* o si por el contrario toleran el desarrollo de cualquier especie de *Leishmania* en su interior. Esta diferencia se debe a que en la fijación al intestino en los vectores específicos (*P. duboscqi*, *P. sergenti* y *P. papatasi*) interviene la molécula de lipofosfoglicano (LPG) mientras que en las especies catalogadas como permisivas, por ejemplo *L. longipalpis*, el LPG no es necesario.^{8,35,36} El alimento principal de los machos y las hembras de estos vectores son azúcares y jugos de plantas, sin embargo, las hembras se alimentan también de sangre, especialmente por la noche, y son las que transmiten los parásitos entre reservorios y hospedadores.^{37,38}

2. LEISHMANIASIS. EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

El género *Leishmania* agrupa unas 22 especies patógenas para el ser humano¹² que provocan un conjunto de enfermedades denominadas leishmaniasis. Se trata de una de las enfermedades clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedad tropical desatendida (NTD por sus siglas en inglés- Neglected Tropical Disease). Actualmente, 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad en todo el mundo y se registran entre 20,000 y 30,000 muertes al año.¹² La leishmaniasis se presenta como un conjunto de enfermedades que pueden clasificarse, en función de las manifestaciones clínicas, en leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis visceral (LV). Dentro de las LCs, podemos diferenciar la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis dérmica post kala-azar (LDPK).³⁹ La leishmaniasis está presente en los cinco continentes, 102 países son endémicos de la enfermedad y 350 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección. La leishmaniasis en sus distintas formas clínicas es responsable de 2,35 millones de años de vida perdidos ajustados por discapacidad (AVAD).⁴⁰

Actualmente se producen entre 600,000 y 1 millón de nuevos casos de LC cada año. El 75% de los nuevos casos de LC se detectan en 5 países (Figura 5): Afganistán, Brasil, Irán, Irak y Siria. Los países con mayor número de casos de LMC son Bolivia, Brasil y Perú.

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2019

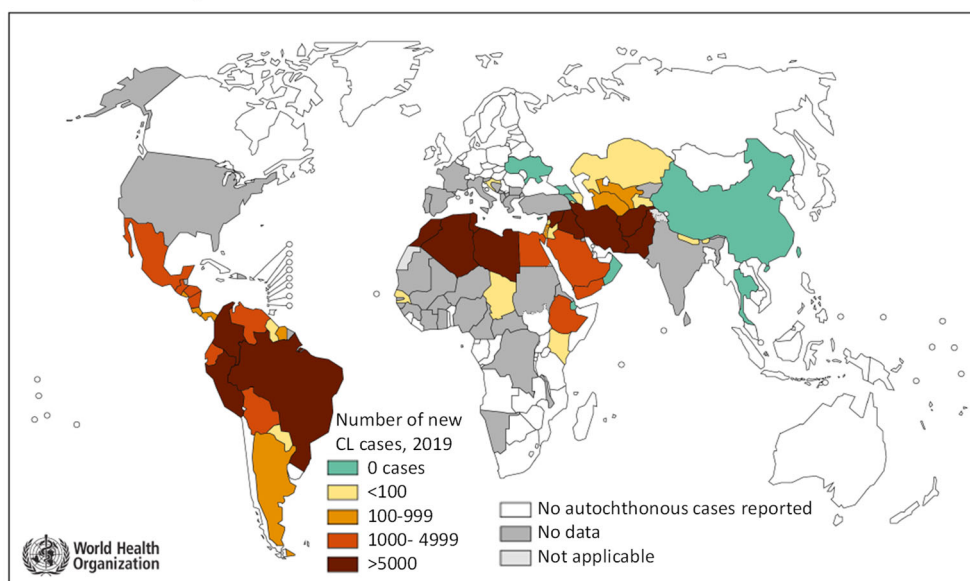


Figura 5. Distribución geográfica de los países que más casos de LC reportaron a la OMS durante el año 2019. Modificado a partir del mapa original de la OMS.

Por otro lado, los casos de LV han descendido en los últimos años, desde 200,000 a 400,000 nuevos casos estimados en 2012⁴¹ hasta los 50,000 a 90,000 casos estimados en 2019.^{11,12} India, Nepal y Bangladesh solían tener el 50% de la carga mundial de LV y en 2005 se comprometieron a eliminar esta enfermedad como problema de salud pública, de modo que esto ha podido contribuir a la disminución mundial de LV.^{42,43} El 90% de los casos de LV (Figura 6) se concentran actualmente en Brasil, India, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Kenia.^{12,40}

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2019

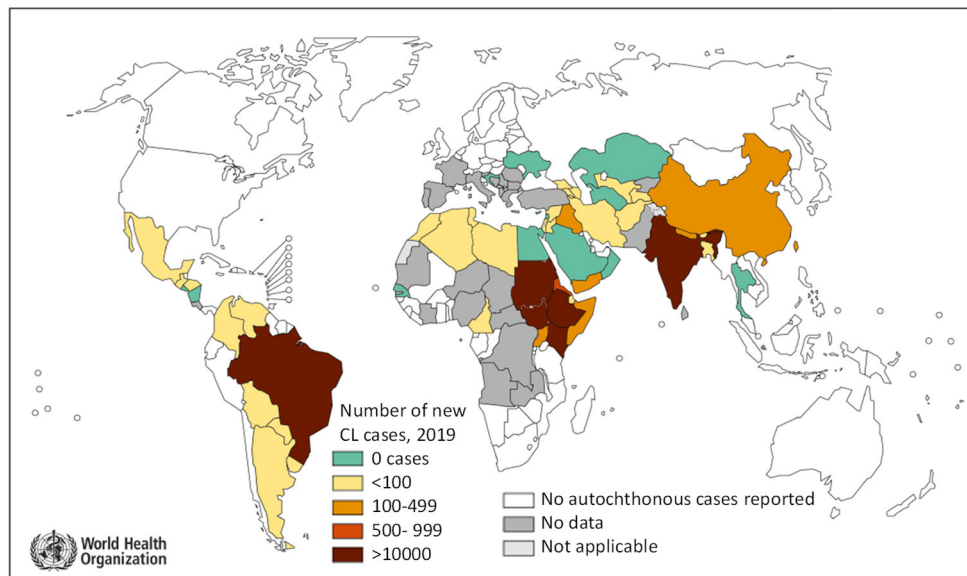


Figura 6. Distribución geográfica de los países que más casos de LV reportaron a la OMS durante el año 2019. Modificado a partir del mapa original de la OMS.

Entre los factores de riesgo de la leishmaniasis destacan factores como la pobreza, las migraciones, el estado inmunitario de la población de los países endémicos, la falta de higiene y la malnutrición, así como vivir en contacto estrecho con reservorios y vectores.^{12,41} El limitado acceso a una asistencia sanitaria de calidad puede complicar el proceso y empeorar el pronóstico.⁴⁴

2.1. Leishmaniasis cutánea

Las principales especies responsables de la LC son *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* en África, Asia y Europa y las especies que forman parte de los complejos *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en el continente americano.³⁹ Las especies típicas del Viejo Mundo causan una patología que se caracteriza por un desarrollo más rápido de los síntomas, así como por la presencia de úlceras húmedas, de mayor tamaño, con mayor grado de afectación del tejido conectivo y que muestran un tiempo de ulceración mayor.⁴⁵ Además de

estas especies, se han descrito algunos casos de LC provocadas por cepas de *L. infantum* e incluso de *L. donovani*.^{46,47}

En el tipo más frecuente de LC, la LCL, el parásito provoca una reacción inflamatoria local que recluta células al lugar de la picadura, principalmente neutrófilos, macrófagos y otros fagocitos.²⁸ En una primera fase no se observan cambios en la epidermis, debido a que la enfermedad pasa por una etapa silenciosa en la que el parásito se divide sin ser detectado, fase que puede durar desde semanas a meses.^{39,48} Posteriormente, la activación de los macrófagos provoca la liberación de factores proinflamatorios como IFN- γ , facilitando la aparición de edema local debido a la acumulación de células y fluidos en el lugar de la infección, lo que da lugar a una mácula en el lugar de la picadura, que evoluciona a pápula y finalmente desarrolla un nódulo. El nódulo va creciendo y termina produciéndose necrosis y ulceración^{12,44}, es decir, la ulceración podría ser más una respuesta inmunitaria que un daño provocado por el propio parásito.^{39,48} En función de la especie de *Leishmania* y de la respuesta inmune del hospedador, las lesiones evolucionan hacia nódulos eritematosos, placas induradas, placas escamosas o úlceras⁴⁴, (Figura 7) además, pueden aparecer lesiones satélite alrededor de la lesión principal y los ganglios linfáticos cercanos que drenan la infección pueden encontrarse agrandados.^{39,49} La cicatrización se produce una vez que el parásito ha sido eliminado, bien por la acción del sistema inmune, bien gracias a la quimioterapia, de forma que la producción de colágeno y metaloproteasas permite la regeneración del tejido dañado, formándose finalmente cicatrices maduras.^{10,12}

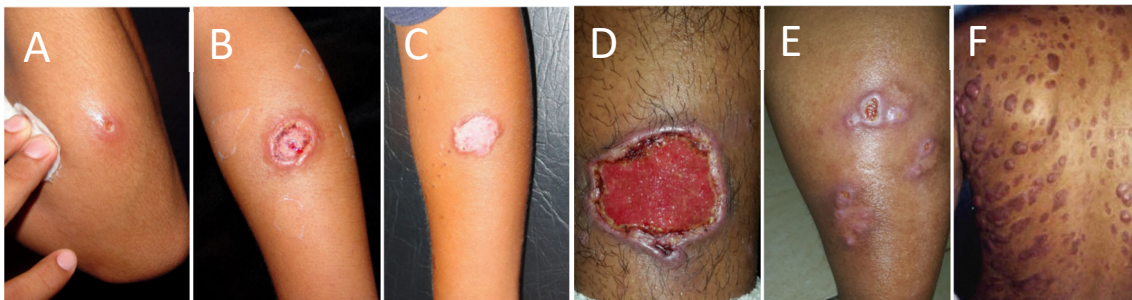


Figura 7. Serie de fotografías mostrando diversas manifestaciones cutáneas de LC. **A**¹⁰. Úlcera temprana. **B**¹⁰. Úlcera con bordes elevados. **C**¹⁰. Cicatriz atrófica en antebrazo. **D**¹¹. Úlcera debida a *L. panamensis*. **E**¹¹. Pequeñas lesiones satélite alrededor de una úlcera principal. **F**¹⁰. Lesiones típicas de LCD.

Las manifestaciones clínicas que afectan a la mucosa (leishmaniasis mucocutánea) pueden aparecer si la especie que causa la LC es *L. braziliensis* y en menor medida *L. amazonensis*, *L. guyanensis* o *L. panamensis*, incluso en raras ocasiones puede derivarse de la infección por *L. major*.⁵⁰ El desarrollo del proceso inflamatorio es similar, pero las lesiones pueden curar de forma espontánea para reaparecer en los tejidos mucosos formando lesiones

crónicas destructivas (Figura 8).⁵¹ Estas lesiones contienen una carga parasitaria baja, y se detectan niveles elevados de TNF- α y moléculas proinflamatorias, lo que sugiere de nuevo que el sistema inmune sería el principal responsable del daño tisular.^{39,52}



Figura 8. Ejemplos de lesiones típicas de LMC. **A**⁵³. Paciente de 8 años diagnosticado de leishmaniasis tegumentaria africana con lesión pruriginosa en el labio superior. **B**⁵⁰. Lesiones mucocutáneas en la cara de un paciente que presenta una manifestación atípica de LMC causada por *L. major*. **C**⁵⁴. Lesión de la mucosa con perforación del tabique nasal e hinchazón del labio superior en un paciente infectado con *L. braziliensis*.

Aunque la LC no es una enfermedad mortal para el ser humano, no han dejado de aumentar las consecuencias derivadas de su padecimiento. Por un lado las cicatrices y lesiones provocan estigma en muchos países endémicos de leishmaniasis, y por otro lado, las discapacidades a las que pueden enfrentarse los afectados son elevadas.^{44,55} En el caso de la LMC las lesiones en los tejidos de la mucosa pueden causar graves desfiguraciones y llegar a ser mortales si no se tratan.⁵¹ Sin tratamiento, las tasas de curación de las LCs simples varían en función de la especie, desde un 44-72% en las infecciones por *L. mexicana* hasta tan solo 6,2-20% en las leishmaniasis provocadas por *L. braziliensis*.⁵⁶

2.2. Leishmaniasis visceral

La LV, también conocida como kala-azar, es la forma más severa de leishmaniasis. Las especies que la causan más frecuentemente son *L. infantum* y *L. donovani*, aunque es posible que algunas especies que causan LC visceralicen, especialmente en pacientes con el sistema inmune comprometido.⁵⁷ Los síntomas incluyen pérdida de peso, fiebre crónica, linfadenopatía, pancitopenia, atrofia muscular y hepatoesplenomegalia, pudiendo palpar el hígado y el bazo en el abdomen agrandado que presentan los pacientes (Figura 9A, 9B).^{57,58} Es una enfermedad cuya mortalidad es muy elevada sin tratamiento.³²

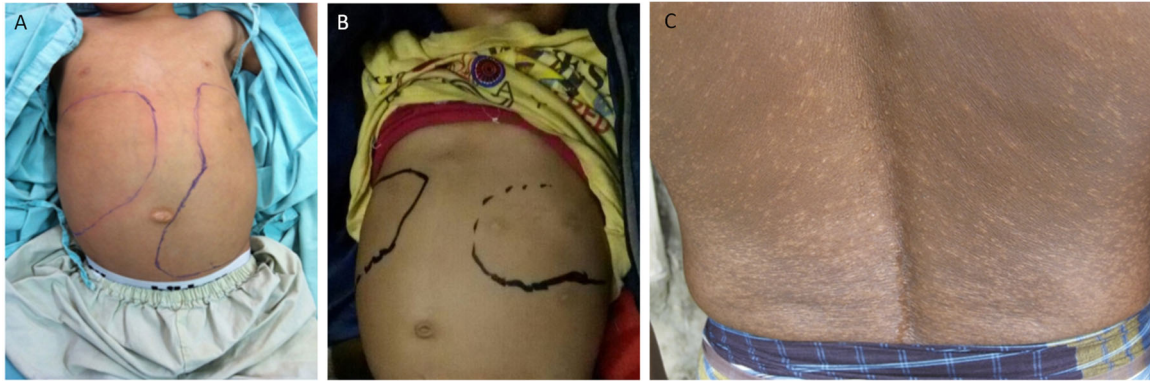


Figura 9. A⁵⁹. Paciente de 5 años que muestra abultada hepatoesplenomegalia. B⁶⁰. Paciente de 5 años que presentaba hepatoesplenomegalia y que fue diagnosticado de coinfección de LV y malaria. C⁶¹. Pápulas hipopigmentadas en la espalda de un paciente de 50 años que sufre PKDL.

En la LV, los órganos principalmente afectados son bazo, hígado, médula ósea y timo.^{31,32} El desarrollo de la infección tiene lugar en dos etapas principales y se caracteriza por desencadenar una respuesta inmune específica de órgano⁶²; en un primer lugar, los parásitos colonizan las células del hígado en una fase temprana y aguda de la infección, resolviéndose en pocas semanas sin apenas daño tisular y con capacidad para evitar la reinfección. Por el contrario, la segunda etapa de la infección es la fase crónica, en la cual el bazo se convierte en el lugar de persistencia permanente de los parásitos, ya que en este caso la respuesta Th1 es menor y no se elimina la infección.^{32,57} Una complicación posterior al tratamiento con éxito de la LV con antimoniales es la aparición mucho tiempo después de LDPK, caracterizada por erupciones cutáneas crónicas (Figura 9C). Entre el 25 y el 50% de los pacientes de Sudán desarrollan LDPK después de un tratamiento de LV.⁶³

También cabe destacar aquí la co-morbilidad entre la leishmaniasis, especialmente la LV, y el SIDA. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, ya que según datos de la OMS se estima que a finales de 2019, 38 millones de personas estaban infectadas con VIH, además de producirse cada año 2 millones de nuevas infecciones.⁶⁴ La co-infección de ambos patógenos suele tener como consecuencia una mayor dispersión del parásito por todo el cuerpo, el agravamiento de los síntomas y una mayor probabilidad de fracaso terapéutico.⁶⁵⁻⁶⁷

2.3. Leishmaniasis en España

Como ocurre en la mayor parte de los países de la Europa Mediterránea, España es un país endémico de leishmaniasis, y se considera una enfermedad emergente en la Cuenca Mediterránea.⁶⁸ En España, la leishmaniasis autóctona está causada por *L. infantum*, y aunque la incidencia de la leishmaniasis canina (LCan) es elevada, la incidencia de la leishmaniasis humana es baja.⁶⁹ Sin embargo, el número de casos está infravalorado debido

a la levedad de los síntomas, que conlleva a infradiagnóstico y a falta de declaración de los casos. En un estudio reciente detectaron que entre el 49.4% y el 65.8% de los casos de leishmaniasis en la provincia de Granada entre los años 2003 y 2016 no se habían diagnosticado correctamente.⁶⁹

Uno de los factores de riesgo que puede influir en el aumento de los casos de leishmaniasis es la aparición de nuevos reservorios, principalmente animales silvestres, que pueden jugar un papel importante en los brotes de leishmaniasis, como el que se produjo en la Comunidad de Madrid durante los años 2010 y 2011.^{21,70} Recientemente se ha llevado a cabo un estudio de la presencia de *L. infantum* en ratas de alcantarilla de la ciudad de Barcelona, dando como resultado una prevalencia de 33.33%. Esto indica que existen otros potenciales reservorios distintos a los más reconocidos.⁷¹

3. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA LEISHMANIASIS

3.1. Control de la enfermedad. Control de reservorios y vectores

Las estrategias de control de la enfermedad deben incluir estrategias de intervención distintas debido a la complejidad del ciclo biológico de *Leishmania*. La leishmaniasis puede transmitirse entre humanos (leishmaniasis antroponótica) o de animales a humanos (leishmaniasis zoonótica) mediante los vectores⁷², por lo tanto, esta enfermedad puede prevenirse controlando el vector (reducción del número de moscas de la arena infectadas) o mediante el control de los reservorios (reduciendo los reservorios animales de *Leishmania* en zonas donde la transmisión de la enfermedad es principalmente zoonótica).³⁸ Entre los problemas que dificultan el control de la enfermedad se puede destacar el desconocimiento sobre los lugares de reposo y cría de las moscas de la arena^{73,74}, los casos asintomáticos de la enfermedad, la LDPK como reservorio potencial de *Leishmania* o la co-infección VIH-LV.⁷⁵⁻⁷⁷ Para el control de los vectores transmisores de la enfermedad se han empleado distintas estrategias. Una de las medidas principales ha sido la utilización de insecticidas, ya que los flebotomos son bastante sensibles a ellos - a excepción de cierta resistencia al diclorodifeniltricloroetano (DDT) -.^{38,78} Estos insecticidas pueden utilizarse en viviendas y refugios de animales, en mosquiteras impregnadas, utilizando collares impregnados para perros y en forma de protección personal con repelentes^{73,74} Los programas de fumigación, aunque efectivos, pueden derivar en problemas secundarios sobre la salud de las personas y efectos perjudiciales sobre el medio ambiente, coste elevado y problemas logísticos asociados, lo que compromete la sostenibilidad de esta intervención a largo plazo en los países endémicos de leishmaniasis.^{79,80} También se ha estudiado la utilización de cebos de azúcar tóxicos atractivos (ATSB por sus siglas en inglés – Attractive targeted sugar baits) –

mezcla de pesticidas orales con azúcar, zumo de frutas y ácido bórico⁸¹ - que han demostrado tener éxito en regiones de África, Oriente Medio, América e Irán.^{74,82,83} Es necesario el conocimiento de la biología de estos vectores (horas de actividad, estacionalidad, elaboración de mapas de riesgo y distribución geográfica y ambiental, estudio de las fuentes de alimento y su relación con potenciales reservorios, etc.⁷³ La OMS busca promover la gestión integrada de los vectores, dirigiendo los recursos disponibles a más de una enfermedad, optimizando las estrategias y aumentando la sostenibilidad de estos programas de prevención.^{79,84}

Respecto a los métodos más utilizados para controlar los reservorios, es importante estudiar el papel que desempeñan otras especies además del perro en la transmisión del parásito, como por ejemplo roedores, controlados mediante cebos envenenados o mediante la eliminación de las plantas que les sirven de alimento o la destrucción de madrigueras.^{37,38} Los perros son un importante reservorio en muchos países endémicos⁸⁵, por lo que han sido objetivo en la prevención de la enfermedad. Entre las estrategias utilizadas se encuentran la vacuna canina de la leishmaniasis, el sacrificio de perros positivos a la infección, la utilización de collares insecticidas y la quimioterapia de los perros con dueño, aunque ésta presenta una elevada tasa de fracaso.^{38,86} Pese a que el sacrificio de perros sigue siendo una práctica extendida en zonas rurales de China, países del norte de África y algunas regiones de Oriente Medio^{41,85} no parece ser una medida eficaz a largo plazo debido a entre otras causas, el rápido reemplazo de los perros sacrificados por otros perros susceptibles en poco tiempo.⁸⁵⁻⁸⁷ Resulta más efectivo la vacunación de los mismos, ya que los perros vacunados no son reemplazados por nuevos cánidos infectados, el uso de collares con insecticida o la aplicación de insecticidas tópicos mensualmente, sin embargo, el coste y la logística son un problema en los países más pobres.^{85,86}

3.2. Vacunas

La estrategia de vacunación es el método más económico para la prevención de las enfermedades infecciosas, protegiendo contra la enfermedad a largo plazo y reduciendo la transmisión⁸⁸, sin embargo, aunque se han diseñado varias vacunas frente a la infección por *Leishmania*, ninguna de ellas ha mostrado una eficacia notable y han fracasado⁸⁸, aunque el desarrollo de vacunas para perros (Leishmune[®], CaniLeish[®]), que han mostrado una respuesta de tipo Th1 efectiva durante un año, demuestra que es posible el desarrollo de algo semejante en humanos.^{85,89} En la leishmaniasis, interesa polarizar la respuesta inmune hacia el tipo Th1 (células T-helper 1), que se acompaña de la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 y protege al animal de la infección mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROs por sus siglas en inglés – Reactive oxygen species) y óxido nítrico por los macrófagos infectados.^{88,90,91} En el otro extremo se encuentra la respuesta inmune de tipo

Th2, que permite la persistencia de la infección mediante la producción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TGF- β .^{89,92,93} Se han estudiado numerosos antígenos de *Leishmania* como candidatos para controlar la infección, dando lugar a vacunas de primera generación (vacunas con parásitos vivos atenuados o muertos), de segunda generación (proteínas recombinantes de *Leishmania*) y de tercera generación (vacunas de ADN codificantes de proteínas de *Leishmania*).^{88,89} Otra de las aproximaciones estudiada es la utilización de inmunomoduladores.⁹³⁻⁹⁵ Las vacunas de primera generación tienen la ventaja de su bajo coste, lo que permite su producción en países en desarrollo, sin embargo, las diferencias en la respuesta inmunitaria y los obstáculos para su registro y estandarización, así como los riesgos, han hecho que ninguna llegue a comercializarse.^{88,96} Las vacunas de segunda generación incluyen vacunas con parásitos que carecen de genes esenciales (timidilato sintasa, cisteína, transportador de bipterina, etc) y que pueden generar una respuesta inmune con una infección inactiva, de modo que la enfermedad no progresa. También puede utilizarse como vehículo de transporte bacterias o virus recombinantes que expresan antígenos de *Leishmania*, de modo que estos vehículos actuarían también como adyuvantes. Dentro de este tipo de vacunas también se destacan las que utilizan proteínas recombinantes, sin embargo, pocas han podido llegar a estudios preclínicos en humanos.⁸⁸ Por último, las vacunas de tercera generación son vacunas de ADN, que son más estables que las vacunas basadas en proteínas recombinantes, el coste de producción es menor y se pueden combinar distintos genes en la misma vacuna.^{97,98} En algunos estudios ya se ha logrado una respuesta inmune adecuada frente a infecciones de *L. infantum* y *L. donovani*.⁹⁹

Tabla 1. Vacunas que han llegado a ensayos clínicos.¹⁰⁰

Nombre y referencia	Clasificación	Fase I	Fase II	Fase III
Leishvaccine ¹⁰¹	Primera generación			X
ALM ^{q102}	Primera generación		X	
Leishmune ¹⁰³	Primera generación			X
CaniLeish ¹⁰⁴	Primera generación			X
GALM ^{a105}	Primera generación		X	
LEISH-F1 ¹⁰⁶	Segunda generación	X		
LEISH-F2 ¹⁰⁷	Segunda generación		X	
LEISH-F3 ¹⁰⁸	Segunda generación	X		
Leish-Tec ¹⁰⁹	Segunda generación			X
SMT ^γ + NH ^{μ110}	Segunda generación	X		
ChAd63-KH ⁹⁹	Tercera generación		X	

3.3. Tratamientos

Debido a la falta de una vacuna eficaz, el principal método utilizado para combatir la leishmaniasis ha sido y sigue siendo la quimioterapia¹¹¹ (Figura 10).

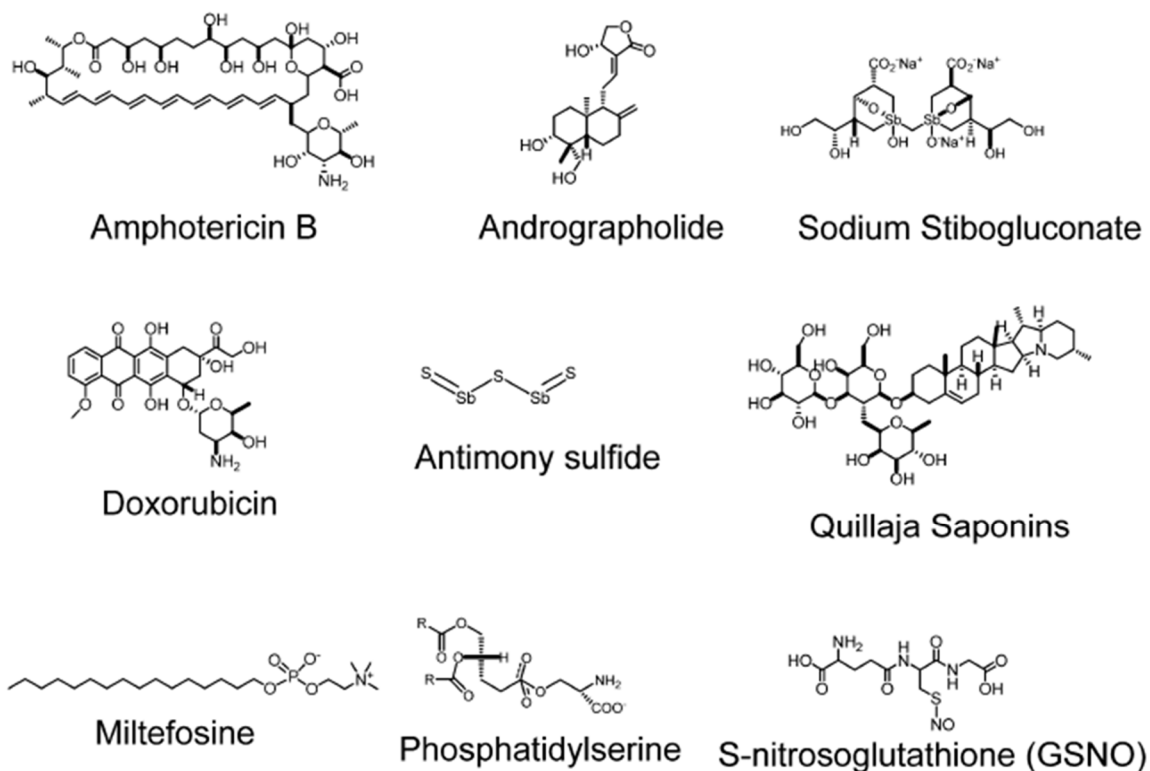


Figura 10. Estructuras químicas de las moléculas más utilizadas en el tratamiento de la leishmaniasis.¹¹¹

Los antimoniales pentavalentes (Sb^{V}) (Glucantime[®], Pentostam[®]) son derivados organometálicos del Sb^{V} que se llevan utilizando como fármacos de primera línea desde hace 7 décadas, en forma de antimoniato de meglumina (MA) y estibogluconato de sodio (SSG). Su mecanismo de acción se basa en la interacción con biomoléculas que contienen ligandos de nitrógeno y de tipo sulfhidrilo (péptidos, proteínas, enzimas...) previa reducción de Sb^{V} para dar lugar a Sb^{III} , por lo que se les considera profármacos.¹¹² Es el único tratamiento que presenta tasas de éxito elevadas para todas las formas clínicas de leishmaniasis, aunque su uso excesivo ha dado lugar a la aparición de resistencias.^{10,113} Pese a su eficacia, se trata de fármacos que se administran de forma parenteral y con una elevada toxicidad, provocando numerosos efectos secundarios como irritación local, alteraciones cardíacas y hepáticas, anorexia, náuseas, vómitos, mialgia o artralgia^{114,115}, lo que disminuye la adherencia al tratamiento.⁹⁵ El riesgo de cardiotoxicidad impide su administración en pacientes mayores de 45 años y menores de 15.¹¹⁶⁻¹¹⁸ En pacientes coinfectados con VIH los efectos

secundarios son más frecuentes y graves y la tasa de éxito es menor, además de presentar mayor riesgo de recidiva y mayor mortalidad durante el tratamiento.^{65,119} Frente a la LC, se utilizan de forma local mediante infiltración intralesional, aunque la respuesta es variada en función de la especie causante de la enfermedad. Por ejemplo, se utiliza como tratamiento de primera línea frente a *L. major*, *L. tropica* y *L. panamensis*^{10,120} y también han mostrado eficacia en ensayos de fase II frente a especies del Nuevo Mundo.¹²¹ En los casos de LMC se administran de forma sistémica¹¹⁵ obteniendo tasas de éxito del 75% en las formas leves o moderadas y menor en las formas más graves, frente a las que se utiliza la anfotericina B como fármaco de rescate.^{10,122}

La anfotericina B desoxicolato es un antifúngico de amplio espectro disponible desde 1960 para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas graves.¹²³ Se trata de una molécula anfipática formada por un anillo de lactona macrólido de 37 átomos de carbono¹²³ (Figura 10) que pasó a ser el tratamiento de segunda línea frente a la leishmaniasis, llegando a ser el tratamiento de elección en algunas zonas debido al aumento de cepas resistentes a los Sb^v^{10,95,124}. El mecanismo de acción consiste en su unión selectiva a los esteroides de la membrana plasmática del parásito, principalmente al ergosterol, creando canales iónicos que aumentan la permeabilidad. Esto altera el equilibrio osmótico del parásito produciendo radicales libres que llevan a la muerte celular.^{115,125,126} A pesar de su eficacia y rapidez de curación¹⁰, la anfotericina B presenta algunos inconvenientes, como administración endovenosa¹¹, efectos secundarios indeseados como fiebre, miocarditis y nefrotoxicidad¹²⁷ o la aparición de cepas resistentes.¹²⁸ La anfotericina B tiene una versión liposomal, AmBisome[®].⁹⁵ Es un tratamiento caro pero eficaz, y en general es el tratamiento de elección en mujeres embarazadas, en pacientes coinfectados con VIH y en otros pacientes inmunocomprometidos.^{10,65,114} También se utiliza en países en los que la primera línea de tratamiento presenta menores tasas de éxito, como en Nepal, en el que se recomienda AmBisome[®] tras el aumento del fracaso de los Sb^v.¹²⁹ Aunque logra reducir los efectos secundarios del fármaco, su utilización es complicada en los países empobrecidos debido a su precio elevado.⁹⁵

La miltefosina (Impavido[®]) es un fármaco antineoplásico descubierto en los años 80. Se trata del único fármaco que se administra de forma oral frente a la leishmaniasis.^{114,130} Estructuralmente la miltefosina es un fosfolípido alquilo cuyos mecanismos de acción incluyen la alteración de la síntesis de fosfatidilcolina, la inhibición de la citocromo c oxidasa (disminuyendo el oxígeno y el ATP disponible para el parásito), la producción de una muerte similar a la apoptosis o la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1¹³¹⁻¹³⁴ (Figura 11). Se trata de una molécula con una elevada vida media y que se acumula durante la administración.¹³⁵ Entre los inconvenientes encontramos el aumento de cepas resistentes y

la duplicación de la tasa de recaídas debido al aumento de su uso¹³⁶⁻¹³⁸, además, su administración tiene efectos secundarios como dolor de cabeza, alteraciones gastrointestinales, hepatotoxicidad y sobre todo teratogénesis, por lo que se recomienda la interrupción de su uso en mujeres gestantes o que prevean la posibilidad de quedarse embarazadas durante el tratamiento.^{114,139} La tasa de éxito varía en función de la especie que causa la leishmaniasis, recomendándose en Colombia para el tratamiento de la LC causada por *L. panamensis*, pero no frente a la LC provocada por *L. braziliensis* en Guatemala, mientras que sí recomienda frente a la misma especie en Bahía, Brasil.^{95,130} Actualmente, en la India y en otras zonas geográficas solamente se recomienda en combinación con otros fármacos por haber disminuido su eficacia en monoterapia.^{137,140}

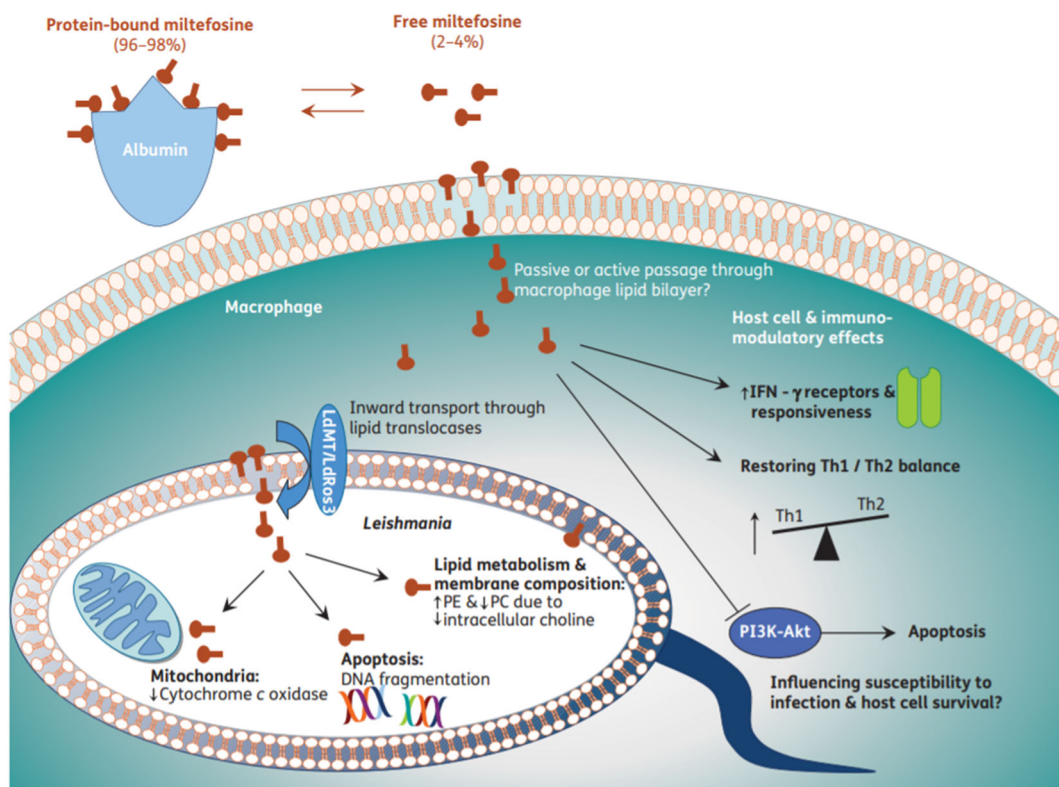


Figura 11.¹³¹ Mecanismos de acción de la miltefosina en *Leishmania*. Entre los mecanismos de acción que han sido descritos para explicar la toxicidad de la miltefosina en protozoos como *Leishmania* se encuentran la alteración del metabolismo lipídico del parásito, la inducción de una muerte similar a la apoptosis debido a la producción de ROs, disfunción mitocondrial, efectos inmunomoduladores produciendo un balance de la respuesta inmune hacia el tipo Th1, entre otros.

La paromomicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que se utiliza frente a bacterias y otras enfermedades causadas por protozoos, como giardiasis y amebiasis y que comenzó a utilizarse en los años 60 como tratamiento frente a la leishmaniasis.^{140,141} Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la función mitocondrial y la interferencia

en la síntesis proteica.^{95,126,141} En monoterapia existe riesgo de aparición de resistencias¹⁴⁰ y diferencias en cuanto a la eficacia en distintas regiones, mostrando tasas de éxito elevadas en India pero eficacia limitada en África Oriental.^{142,143} Su eficacia frente a la LC también depende de la especie que cause la enfermedad.⁹⁵

La pentamidina es una diamina aromática que se ha utilizado frente a otros protozoos.¹⁴⁴ Su mecanismo de acción es difuso e incluye la inhibición de la síntesis y el transporte de poliaminas del parásito y la interacción con su ADN.^{145,146} En el caso de *Leishmania* se había abandonado casi por completo su uso debido al riesgo de aparición de resistencias y a los efectos secundarios graves que provocaba^{10,95,114}, sin embargo, recientemente se ha recomendado en pacientes coinfectados con VIH cuyo recuento de células CD4 sea de menos de 200 CD4/ μ l¹⁴⁷, y es útil como tratamiento de la LCD.¹⁰

Otro tipo de fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis son los antifúngicos azólicos, que se han empleado principalmente en el tratamiento de la LC⁹⁵, siendo los más comunes el fluconazol, ketoconazol e itraconazol.^{148,149} Su mecanismo de acción se basa en la inhibición del lanosterol, intermediario en la síntesis de ergosterol del parásito.¹⁴⁸ Las tasas de eficacia de estos compuestos son variables, de modo que aunque algunos estudios muestran tasas de éxito elevadas, otros han llegado a la conclusión de que en monoterapia no son muy eficaces^{150,151} y por ello deben administrarse en combinación con otros fármacos como miltefosina.^{152,153} Tienen riesgo de aparición de resistencias y efectos secundarios como hepatotoxicidad y cardiotoxicidad.^{95,154,155}

El tratamiento a escoger depende de las recomendaciones en las distintas zonas geográficas en las que la leishmaniasis es endémica, que se determinan en función de las tasas de éxito y las cepas resistentes detectadas. Además, el estado inmunitario del enfermo puede también condicionar el tipo de tratamiento a elegir.^{57,115} En el tratamiento de la LV esto ha llevado a utilizar en ocasiones combinaciones de fármacos que buscan disminuir el tiempo de tratamiento necesario, reducir los efectos secundarios (facilitando la adherencia) y disminuir el riesgo de aparición de cepas resistentes.^{115,156} El fármaco más utilizado en combinación es la paromomicina, que se utiliza en África junto al SSG, reduciendo el tratamiento de 30 a 17 días¹⁵⁷ o en combinación con miltefosina, evitando la aparición de resistencias a la paromomicina.¹⁵⁸

En el tratamiento de la LC, la elección de administrar fármacos de forma local o sistémica varía en función de la especie causante de la enfermedad, las características de las lesiones y el riesgo existente de evolución a LMC^{159,160}, de este modo, el tratamiento sistémico se utiliza en los casos de LC compleja (lesiones en dedos de las manos o pies o en los genitales, lesiones de tamaño de más de 5 cm, presencia de manifestaciones cutáneas en la cara o

duración de la enfermedad superior a 6 meses) y también en casos de LCD, pacientes inmunocomprometidos o infección con especies que pueden cursar con LMC.^{160,161} En el tratamiento de la LC también se ha empleado la combinación de fármacos con tratamientos físicos, como la combinación de termoterapia y miltefosina.¹⁶² La termoterapia consiste en la aplicación de calor externo en las zonas afectadas provocando la muerte del parásito.^{163,164} Los tratamientos físicos se utilizan a menudo en el tratamiento de la LC y además de la termoterapia se utilizan otros como la fototerapia, la electroterapia, la terapia láser o la crioterapia.^{95,165,166}

Por todo lo descrito anteriormente, resulta de vital importancia el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la leishmaniasis por las importantes limitaciones de los tratamientos utilizados actualmente: numerosos efectos secundarios, cepas resistentes y riesgo de aparición de nuevas resistencias, bajas tasas de éxito en algunas zonas geográficas o en función de la especie de *Leishmania*, menor eficacia en personas coinfectadas con VIH, etc. A todo esto se suma la escasa inversión para el desarrollo de nuevos fármacos que buscan acabar con enfermedades tropicales desatendidas y olvidadas.^{95,167} Entre las estrategias que actualmente buscan soluciones a esta problemática podemos destacar la investigación de inmunomoduladores, el reposicionamiento de fármacos, la búsqueda de nuevas dianas de intervención o la nanotecnología, que busca dirigir los fármacos y con ello mejorar algunas de sus propiedades, entre otras aproximaciones.

Los inmunomoduladores son una de las líneas de investigación en el desarrollo de nuevos tratamientos debido a que los parásitos de *Leishmania* son capaces de confundir al sistema inmune y manipularlo, por lo que el restablecimiento de las funciones normales del sistema inmune debería funcionar como tratamiento frente a *Leishmania*. Se ha probado la combinación de tratamientos con IFN- γ , citoquina que induce al macrófago a eliminar los parásitos de *Leishmania*.¹⁶⁸ Una de las estrategias de inmunomodulación más utilizada es el desarrollo de vacunas terapéuticas, es decir, vacunas utilizadas como tratamiento en pacientes infectados^{94,95}, y algunos de estos estudios han mostrado resultados prometedores.^{169,170} El reposicionamiento de fármacos es una estrategia que busca identificar nuevos usos a los fármacos que ya existen. El descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso largo y costoso, que dura entre 10 y 17 años y que requiere de inversiones millonarias, mientras la tasa de éxito es limitada.¹⁷¹ Utilizando el reposicionamiento de fármacos se consigue acortar el tiempo necesario para que el tratamiento pueda llegar al mercado (Figura 12), se reduce el riesgo de fracaso del fármaco, disminuyen los costes y aumentan las posibilidades de identificar nuevas dianas.^{172,173} Además, es una estrategia interesante en este tipo de enfermedades, en las cuales la inversión para el descubrimiento de nuevos fármacos es limitada.¹⁷⁴ Uno de los principales retos es el establecimiento de una

potencial conexión entre la diana farmacológica y el antiguo fármaco, para lo cual se utilizan frecuentemente programas informáticos que permiten predecir sitios de unión ligando-diana o fármaco-receptor (herramientas de docking molecular)¹⁷⁵ y también se utilizan programas informáticos que permiten comparar ciertas características de unos fármacos con otras moléculas para detectar similitudes.¹⁷⁶

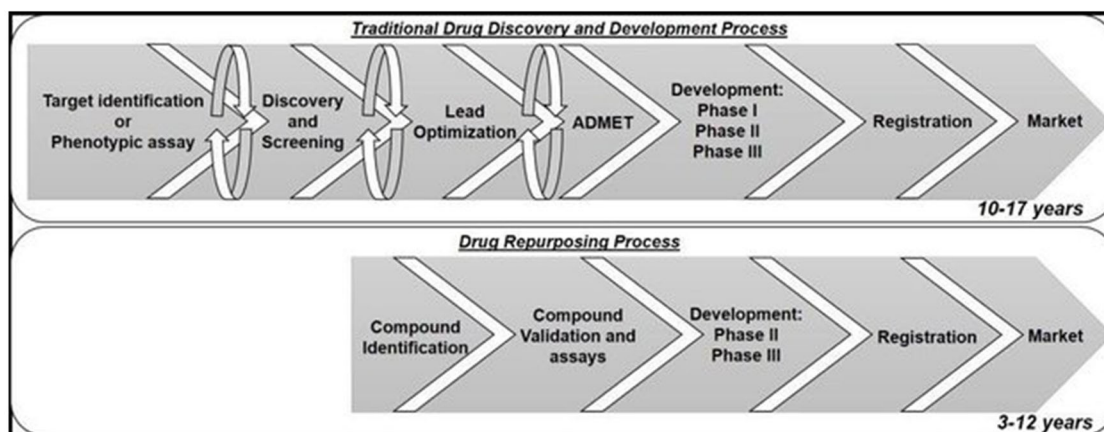


Figura 12.¹⁷⁷ Esquema que representa la diferencia en el tiempo que tarda en llegar al mercado un fármaco mediante el proceso tradicional de descubrimiento y desarrollo de los mismos (panel superior) y mediante el proceso de reposicionamiento de fármacos (panel inferior).

La búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y la nanotecnología para hacer frente a *Leishmania* serán temas abordados en profundidad a continuación.

4. BÚSQUEDA DE DIANAS TERAPÉUTICAS FRENTE A *LEISHMANIA*. ADN TOPOISOMERASAS.

4.1. Búsqueda de fármacos basados en diana

En la búsqueda de potenciales moléculas que puedan utilizarse en el tratamiento de cualquier enfermedad, existen dos aproximaciones diferentes, por un lado, el cribado fenotípico, que permite evaluar la capacidad que tienen los compuestos para matar al parásito, es decir, ensayos de viabilidad celular. Por otro lado, el cribado dirigido, que se basa en identificar compuestos activos frente a determinadas dianas específicas que previamente han sido identificadas como potencialmente idóneas para acabar con el parásito.¹⁷⁴ La identificación de dianas terapéuticas se basa en la comparación de determinados genes del parásito y sus homólogos en el hospedador con el fin de establecer el grado de similitud y las características biológicas únicas que permiten inhibir ciertas funciones vitales del parásito sin dañar al hospedador¹⁷⁸, por ello, las dianas que forman parte del metabolismo del parásito siguen siendo muy interesantes.^{174,179,180} Otras dianas que han sido estudiadas en este campo son

biomoléculas como glicosomas, acidocalcisomas, enzimas con funciones en la replicación y la reparación del ADN, etc.¹⁷⁸ Todavía se desconocen muchos aspectos relacionados con el proceso de enfermedad en la leishmaniasis, por lo que son necesarias más dianas terapéuticas validadas que permitan ensayar compuestos potencialmente leishmanicidas.^{174,181}

4.2. ADN topoisomerasas como diana farmacológica frente a *Leishmania*

Entre las dianas terapéuticas identificadas frente a *Leishmania* se encuentran las ADN topoisomerasas (Top). Estas enzimas tienen importantes funciones en la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN, y por tanto son potenciales dianas terapéuticas en la búsqueda de fármacos frente a *Leishmania*.¹⁸²⁻¹⁸⁴

En 1953, Watson y Crick describían por primera vez, gracias en parte a pruebas experimentales obtenidas por Rosalind Franklin (Figura 13A)¹⁸⁵, la estructura del ADN como dos cadenas helicoidales, cada una enrollada alrededor del mismo eje de forma antiparalela y constituida por cadenas polinucleotídicas de bases nitrogenadas complementarias (Figura 13B).¹⁸⁶

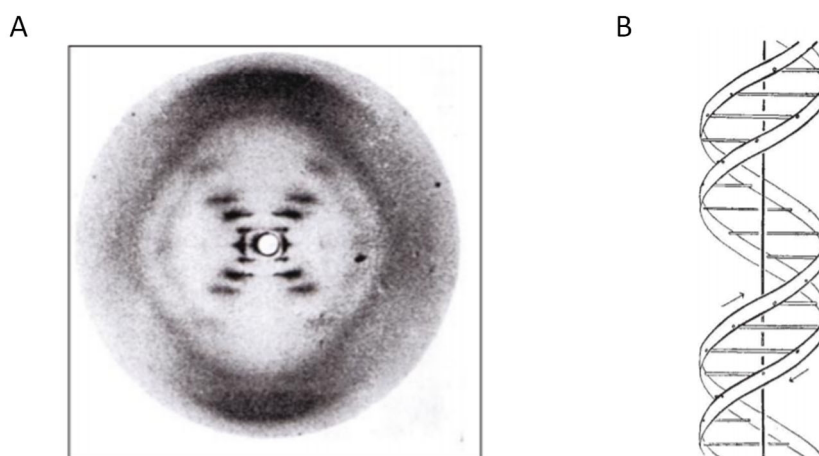


Figura 13. Hitos importantes en el descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN. **A.** Fotografía “51”, tomada por Rosalind Franklin y Raymond Gosling mediante difracción de rayos X. **B.** Modelo de doble hélice helicoidal propuesto por Watson y Crick en 1953.

El ADN es la molécula que contiene toda la información necesaria para la transcripción de ARNm y posterior traducción a proteínas. El acceso a esta información y su replicación se regula mediante mecanismos enzimáticos.¹⁸⁷ Estas dos propiedades esenciales (almacén de la información y estructura que modula el acceso a la información) permiten al ADN formar parte de las indispensables funciones biológicas en las que interviene. Sin tensiones de torsión, el ADN se encuentra en forma relajada (Figura 14), pero cuando se somete a estas

tensiones, el ADN se encuentra en forma superenrollada. Estos superenrollamientos tienen una energía intrínseca superior a las moléculas de ADN relajadas y pueden ser positivos si se producen en el mismo sentido que la doble hélice de ADN, o negativos, si tienen lugar en sentido contrario (Figura 14).^{187,188}

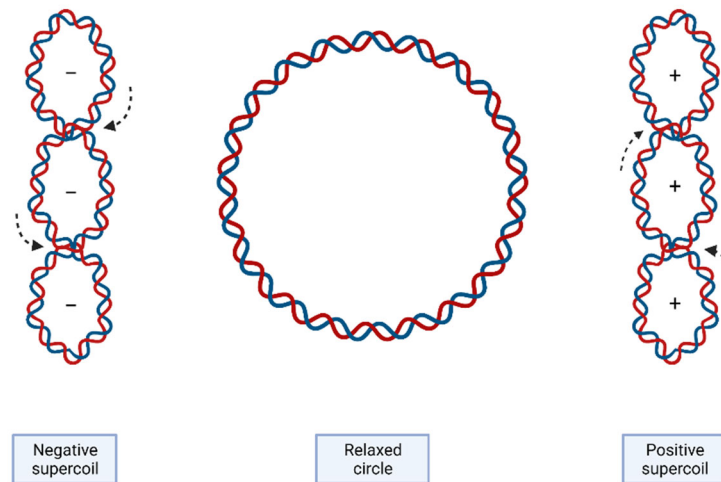


Figura 14.¹⁸⁷ Forma relajada del ADN sin tensiones de torsión (zona central de la figura) y efecto de la introducción de cruces positivos (derecha) y negativos (izquierda) formando superenrollamientos de ambos tipos (positivo y negativo). Created with BioRender.com.

El ADN que forma los genomas es un polímero con un diámetro aproximado de 2 nm y una longitud que puede alcanzar los 10^9 nm.¹⁸⁷ El estado topológico de una molécula de ADN circular, de doble cadena y cerrada mediante enlaces covalentes se define mediante el número de enlace (Lk), definido como el número entero de enlaces entre las dos hebras complementarias de la molécula de ADN.¹⁸⁸ El Lk viene dado por la suma de otros dos factores, la torsión (Tw) y el retorcimiento (Wr).¹⁸⁹ La torsión se refiere al número de veces que las hebras se han retorcido una alrededor de la otra a lo largo del eje helicoidal, mientras que el retorcimiento es una medida del enrollamiento y de cruce en el espacio del eje de la doble hélice de ADN.¹⁹⁰

Entre las enzimas que regulan la topología del ADN en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación se encuentran las ADN topoisomerasas, encargadas de la relajación de las tensiones de torsión que tienen lugar durante estos procesos^{191,192} y descubiertas casi 20 años más tarde que la estructura de doble hélice descrita en 1953.^{193,194} Para ello, producen la escisión temporal de una o ambas hebras de la doble hélice, formando un enlace covalente transitorio con la cadena nucleotídica. El proceso comienza con el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de un residuo tirosina presente en todas las enzimas de este tipo. Este residuo se encuentra en el centro activo de la enzima y es el que genera un enlace fosfodiéster transitorio con la hebra escindida.¹⁹⁵

Las Top se clasifican en dos grandes familias en función de si la enzima escinde una o ambas hebras del ADN y de si requiere ATP en el proceso; Top de tipo I (TopI) y Top de tipo II (TopII), respectivamente. Las TopI son enzimas por lo general monoméricas que escinden una sola hebra de ADN sin necesidad de ATP y forman el enlace covalente transitorio, permitiendo que la hebra escindida gire alrededor de su complementaria, lo que permite que el ADN adquiera un estado topológico más relajado^{184,196} (Figura 15). A su vez, las TopI se subdividen en TopIA (el intermediario covalente se forma con el extremo 5' del segmento escindido) y TopIB (el intermediario covalente se forma con el extremo 3').

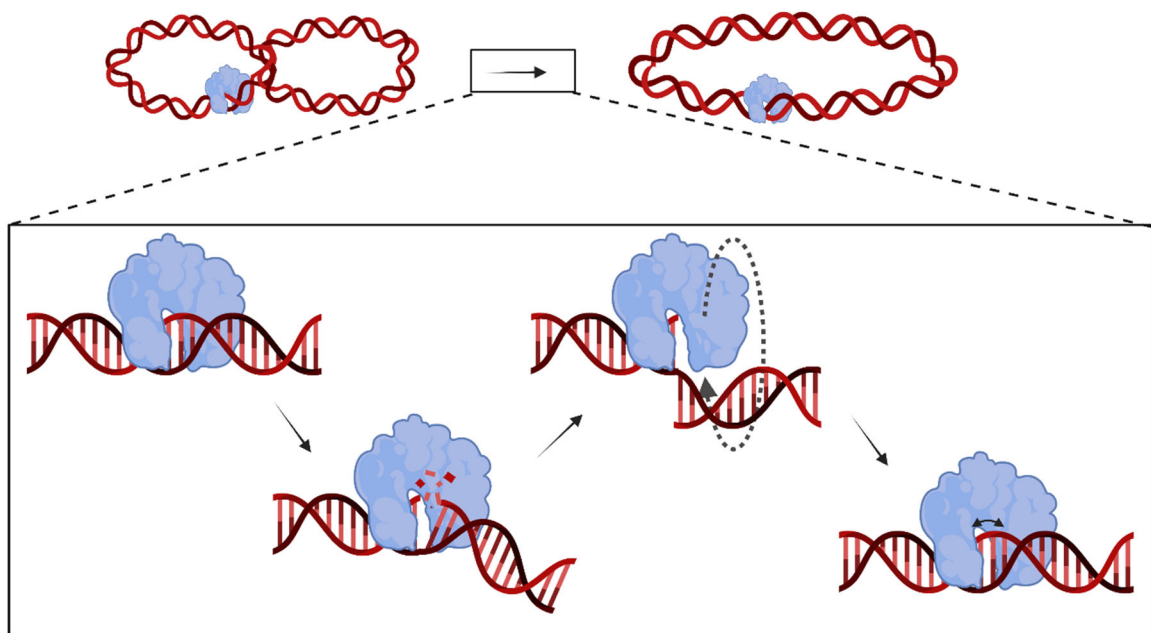


Figura 15. Relajación del ADN mediante rotación controlada por acción de la TopI. La enzima se une al ADN y escinde una de las hebras, formando el complejo de escisión transitorio enzima-ADN. A continuación, una de las hebras gira alrededor de la otra permitiendo la relajación de la tensión en la doble hélice. Por último, se produce la religación de la rotura del ADN, restaurando la integridad de la doble cadena.

Las TopII son enzimas multiméricas que escinden el ADN en el extremo 5' de las dos hebras del ácido nucleico con gasto de ATP, generando enlaces transitorios en esos extremos. Esto permite que otro dúplex de ADN pueda pasar por el corte formado y finalmente se produzca la religación^{183,192} (Figura 16). En función del tipo de intermediario covalente formado, se subdividen en tipo IIA y IIB.^{184,191,197}

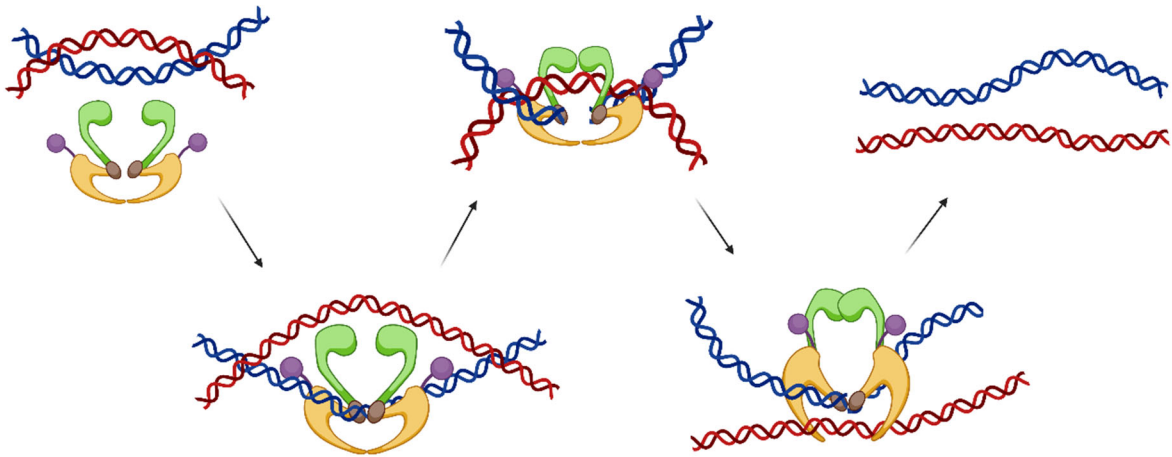


Figura 16. Mecanismo de desencadenamiento del ADN por la TopII. La enzima se une al ADN encadenado (dos dobles hélices enredadas) y se produce el corte de ambas hebras de uno de los dúplex (azul en la figura). La TopII forma un enlace covalente transitorio mientras la otra doble hélice (en rojo) pasa a través del corte producido gracias a la acción de la enzima. Finalizado el proceso, la TopII religa el ADN y se libera de la doble hélice.¹⁹⁸ Created with BioRender.com.

La formación del intermediario covalente – o complejo de escisión – por las Top es un proceso vulnerable, y por lo tanto una diana de intervención farmacológica. Existen numerosos inhibidores que pueden interactuar con esta diana y que se han clasificado como; i) inhibidores de clase I, también denominados venenos de topoisomerasas, que actúan estabilizando el complejo de escisión y provocan la rotura de una de las hebras del ADN (SSB por sus siglas en inglés- Single Strand Break)¹⁹⁶; ii) inhibidores de clase II, compuestos que interfieren directamente con la funcionalidad enzimática.^{199,200} Algunos de los venenos de las Top son los derivados camptotécnicos, topotecán, irinotecán y belotecán (inhibidores de TopIB) o doxorubicina, epirubicina o valrubicina (inhibidores de TopIIA), gracias a los cuales se confirmó la validez de las Top como dianas farmacológicas en diferentes procesos proliferativos celulares como el cáncer y enfermedades infecciosas y parasitarias.^{184,201} Por ejemplo, la camptotecina, un alcaloide de origen vegetal obtenido de *Camptotheca accuminata*, se empezó a utilizar en el tratamiento de varios tumores^{202–204} y tras su éxito, algunos de sus análogos mejorados se utilizan actualmente en la quimioterapia del cáncer.^{205–208}

Las topoisomerasas de *Leishmania* y otros kinetoplástidos son buenas dianas farmacológicas debido a las diferencias estructurales que presentan respecto a las topoisomerasas humanas. En la Figura 17 se muestran algunos ejemplos, con diferencias que afectan incluso a la cantidad de subunidades que presentan la enzimas homólogas.

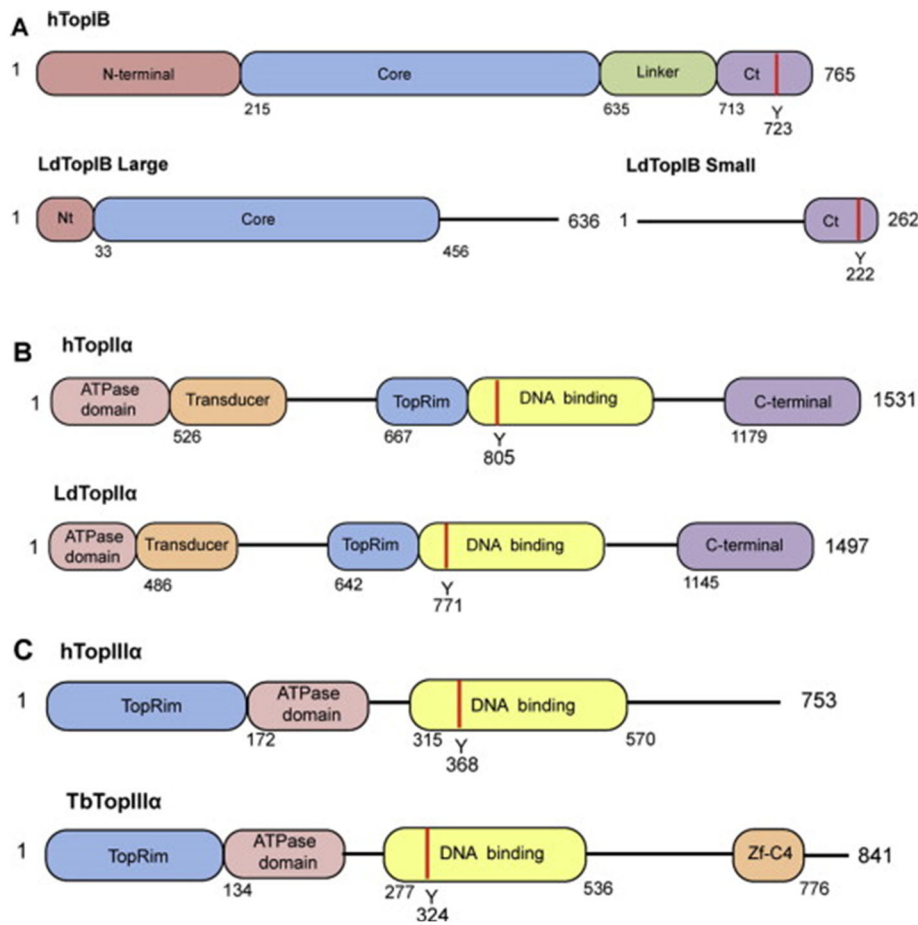


Figura 17.¹⁸³ Representaciones esquemáticas que muestran las diferencias existentes de los distintos tipos de Tops (TopIB, TopII y TopIII) de los tripanosomátidos y sus homólogos en humanos. **A.** TopIB humana (panel superior) y subunidades que conforman la TopIB en *L. donovani* (panel inferior). **B.** TopIIα humana (panel superior) y de *L. donovani* (panel inferior). **C.** TopIIIα humana (panel superior) y de *T. brucei* (panel inferior). La franja roja representa el residuo Tyr que permite la escisión del ADN.

Los tripanosomátidos presentan una TopIB heterodimérica inusual diferente al resto de las TopIB descritas, incluida la humana, ya que normalmente las TopIB están formadas por un único monómero.^{209–211} En *Leishmania*, los genes que codifican para las dos subunidades de la TopIB se localizan en cromosomas distintos, de forma que el gen de la subunidad grande – que codifica una proteína de 636 aminoácidos con un peso molecular de 73 kDa - se localiza en el cromosoma 34. Por su parte, el gen de la subunidad pequeña se encuentra en el cromosoma 4 y codifica un polipéptido de 262 aminoácidos con un peso molecular de 28 kDa que conserva el residuo Tyr conservado en el centro activo de todas las TopIB.²⁰⁹ Esta disposición no ocurre únicamente en *Leishmania*, sino que es característico de los tripanosomátidos.²¹² Gracias a estas diferencias, la enzima TopIB de estas especies es una diana interesante para el desarrollo de fármacos frente a estas enfermedades¹⁸², y ha sido

registrada por la OMS en su base de datos “TDR targets” para enfermedades tropicales desatendidas (<https://tdrtargets.org/>).

La generación de SSBs en células en fase S provoca que la horquilla de replicación choque con el complejo de escisión, generando roturas de doble cadena (DSBs por sus siglas en inglés- Double Strand Breaks) (Figura 18).^{213,214} Una vez se han producido estas roturas, los mecanismos de reparación requieren la alteración de la compactación del ADN para permitir el acceso de la maquinaria enzimática encargada de repararlos. En células eucariotas, esto se lleva a cabo mediante modificaciones post-traduccionales de las histonas involucradas en el empaquetamiento del ADN o reemplazándolas por alguna de sus variantes. En las células de mamífero, la generación de DSBs provoca la fosforilación de la variante H2AX de la histona H2A en el residuo Ser139, formando la variante γ -H2AX e iniciando una cascada de señalización implicada en los mecanismos de reparación del ADN.²¹⁵ Como respuesta al daño de doble cadena, también se ha identificado otro lugar de fosforilación de esta histona, correspondiente al residuo Thr142.²¹⁶ Esta señalización tiene lugar inmediatamente después del daño de doble hebra y se utiliza para cuantificarlo.²¹⁷

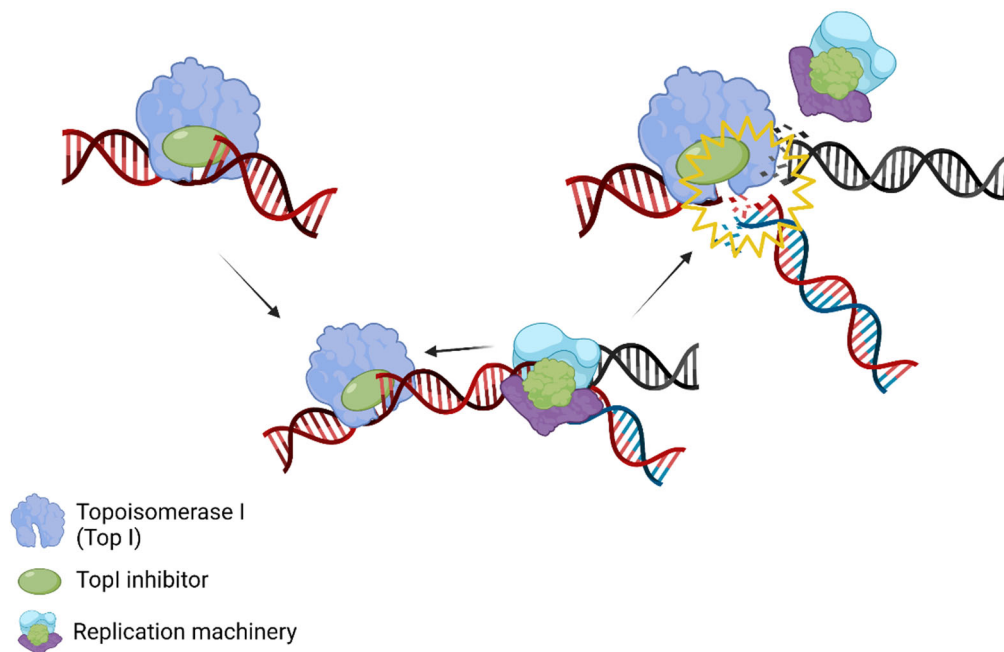


Figura 18. Progresión de los SSBs a DSBs por la estabilización del complejo de escisión por parte de venenos de las Top. Una vez el complejo de escisión es estabilizado impidiendo que la Top restaure la integridad del ADN, durante la fase S, la horquilla de replicación choca con el complejo enzima-inhibidor-ADN, provocando roturas de doble cadena. Created with BioRender.com.

Los inhibidores de la TopI inducen la fosforilación de la histona H2AX en células en fase S, mientras que los inhibidores de la TopII inducen la fosforilación en cualquiera de las fases del ciclo celular.²¹⁸ Las enzimas responsables de la fosforilación de la histona pertenecen a la familia de las fosfatidilinositol-3-quinasa, familia que incluye las proteínas quinasas

denominadas ataxia telangiectasia mutada (ATM), ataxia telangiectasia-Rad3 (ATR) y proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK). Se cree que la enzima que actúa en mayor medida en respuesta al daño de cadena simple que provoca el choque con la horquilla de replicación y que genera posteriormente el daño de doble cadena es la ATM, mientras que la ATR sería la enzima inducida en respuesta al daño de cadena sencilla de ADN que tiene lugar en los procesos de reparación por escisión de nucleótido.^{215,219} En los tripanosomátidos no se diferencian variantes de la H2A como ocurre en otros eucariotas, en los que se diferencian las variantes H2A1-H2A2, H2AZ y H2AX, localizándose un único gen H2A que tiene una homología alta con la variante H2AX de las células de mamífero, y carece del motivo SQ característico que se localiza en el lugar de fosforilación de la variante H2AX.²²⁰

La cuantificación de la histona fosforilada (γ H2AX) en respuesta a daño de doble cadena se ha utilizado en células de mamífero^{218,221,222}, y también en *T. brucei* y *L. infantum*, especies en las que las Thr130 y 128 son respectivamente los residuos fosforilados.^{223,224}

5. NANOTECNOLOGÍA FRENTE A *LEISHMANIA*

Aunque en su definición más estricta la nanotecnología se refiere a estructuras de tamaño variable entre 1 y 100 nm, comúnmente se incluyen otras estructuras que pueden llegar hasta varios cientos de nm desarrolladas mediante ingeniería ascendente o descendente de varios componentes individuales.²²⁵ Una de las aplicaciones de las nanopartículas (NPs) es la capacidad de dirigir fármacos a los órganos o células diana, lo cual resulta especialmente interesante en el tratamiento de enfermedades cuyos agentes infecciosos se localizan en nichos específicos dentro del hospedador. Las NPs presentan numerosas ventajas, ya que consiguen disminuir la toxicidad del fármaco, mejorar la eficacia, proteger al fármaco de la degradación, permiten modular la farmacocinética de los principios activos, aumentan la solubilización en soluciones acuosas, facilitan la absorción y distribución intracelular y nos permite el control de la liberación del fármaco del nanotransportador en el sitio diana.^{111,226-229}

En el caso de *Leishmania*, como ya se ha comentado en apartados anteriores, los parásitos se establecen en forma de amastigote en el interior de las células fagocíticas de los órganos diana. En el interior de la célula los parásitos se localizan en vacuolas parasitóforas (VPs)²³⁰ (Figura 19). Estos compartimentos parecen ser híbridos y contienen elementos del parásito y de la vía endocítica del hospedador.²³¹⁻²³³ Cuando los promastigotes de *Leishmania* son fagocitados por los macrófagos, el LPG actúa retrasando el reclutamiento de LAMP-1 (marcador de lisosomas tardíos y lisosomas), es decir, retrasa la fusión de estas vesículas ácidas con el fagolisosoma, permitiendo la supervivencia del parásito mientras el

promastigote se transforma en amastigote, que es más resistente a los oxidantes.^{234–237} Los amastigotes no poseen LPG y cuando infectan macrófagos, las VPs resultantes adquieren rápidamente marcadores como LAMP-1.^{234,235} En el interior de la VP, el amastigote regula la maquinaria presente en la membrana de la misma, así como la adquisición de nutrientes y elementos necesarios para su supervivencia y replicación en el macrófago.^{232,238,239} El parásito también posee mecanismos que permiten la evasión de algunas de las defensas que tiene el macrófago frente a las invasiones por patógenos, como por ejemplo el complejo NADPH oxidasa, situado en las membranas tanto plasmática como fagosomal, implicado en la producción de radicales superóxido.^{232,240}

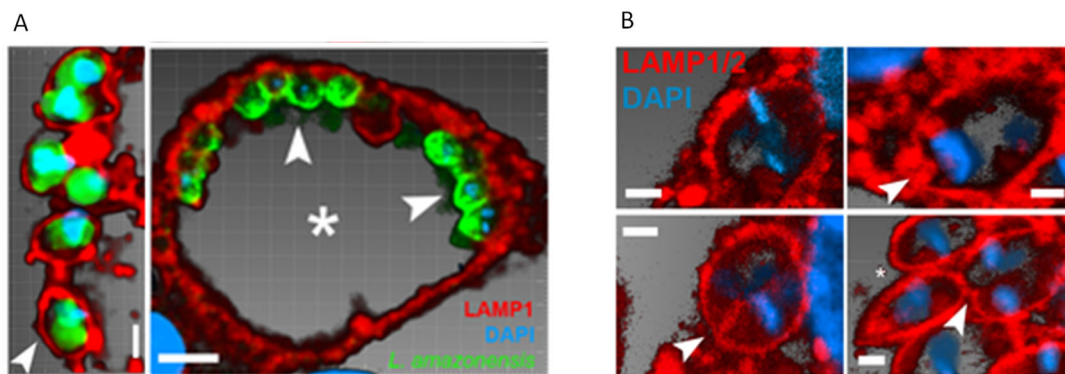


Figura 19. Modificada de Real y Mortara, 2012. **A.** LAMP-1 (en rojo) delimita las VPs de *L. amazonensis* en macrófagos derivados de médula ósea infectados (BMMs). En verde se muestra un anticuerpo frente a *L. amazonensis*. A las 2 horas post-infección (A, panel de la izquierda) los parásitos se encuentran en VPs individuales que, transcurridas 48 horas, se han transformado en vacuolas grandes (asterisco) que albergan un mayor número de parásitos (puntas de flecha) (A, panel de la derecha). **B.** LAMP1 y LAMP2 (en rojo) marcan las VPs de *L. major* 48 horas post-infección de BMMs. Las puntas de flecha indican surcos de fisión polarizados en el proceso de división de los amastigotes intracelulares. El asterisco señala parásitos individualizados.²⁴¹

Dado que el parásito se encuentra perfectamente adaptado para sobrevivir en la VP, una de las principales limitaciones de muchos fármacos es poder llegar hasta él a una concentración suficiente y de forma inalterada. El hecho de que las células que infecta *Leishmania* sean precisamente aquellas con mayor capacidad fagocítica - macrófagos, neutrófilos y monocitos - permite dirigir los nanotransportadores cargados de fármaco hacia las VPs gracias a su conexión con la vía endocítica de la célula hospedadora, reduciendo así su toxicidad.^{242,243}

Aunque el campo de la nanotecnología es muy amplio, algunas de las líneas de investigación actuales en la vehiculización de fármacos frente a *Leishmania* son la utilización de liposomas y otras NPs basadas en lípidos, NPs metálicas y NPs poliméricas (entre las que se encuentran los dendrímeros).¹¹¹

Liposomas y otras NPs basadas en lípidos

Los liposomas son vesículas esféricas de pequeño tamaño, formadas por una bicapa de colesterol y fosfolípidos, que se utilizan para la vehiculización de fármacos por su tamaño, baja toxicidad, biocompatibilidad y por la flexibilidad que presentan para cargar moléculas en ellos.^{111,242,244–246} Fueron descubiertos hace 50 años, aunque el número de formulaciones aprobadas es aún limitado.²⁴⁷ El ejemplo por excelencia de la utilización de liposomas en el tratamiento de la leishmaniasis es la anfotericina B liposomal, Ambisome® (Figura 20), cuyas primeras publicaciones aparecieron en la década de los 80^{248,249} aunque la FDA no aprobó su utilización frente a la LV hasta 1997.²⁵⁰ Otro fármaco que está siendo estudiado por su posible aplicación en forma liposomal para el tratamiento de la leishmaniasis es el SSG. Roychoudhury y colaboradores compararon el SSG en liposomas de fosfatidilcolina y estearilamina (PC-SA-SSG) y en liposomas de PC-colesterol (PC-Chol-SSG) y como control positivo anfotericina. La eficacia se comparó utilizando una cepa de *L. donovani* resistente a SSG, y utilizando ratones Balb/c infectados obtuvieron una mejor eficacia del PC-SA-SSG en monodosis respecto a la anfotericina B, además de favorecer la respuesta inmune Th1 y la expresión de macrófagos microbicidas.²⁵¹ El fármaco consiguió eliminar parásitos resistentes gracias a la capacidad del nanotransportador para aumentar la concentración del fármaco en el nicho de *Leishmania*.

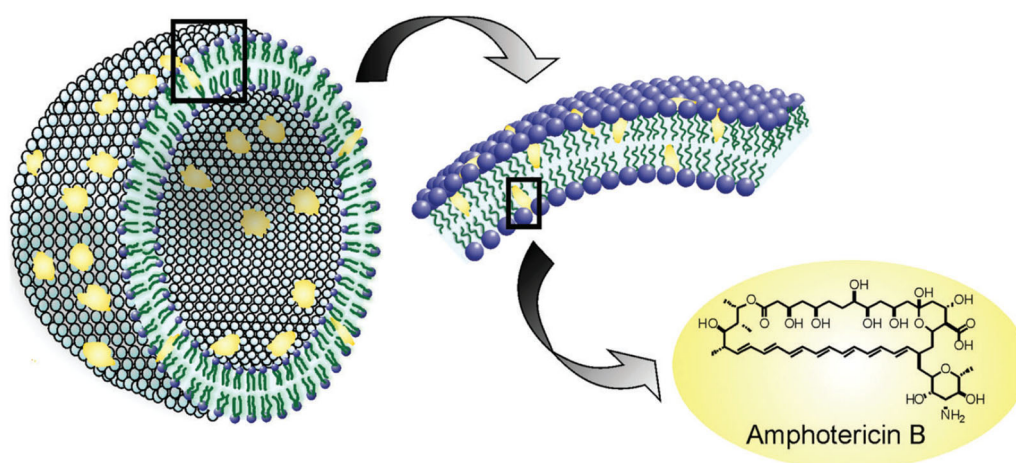


Figura 20.¹¹¹ Representación esquemática de la formulación liposomal de anfotericina B.

Las nanoemulsiones son partículas coloidales con tres componentes: líquido lipídico, fase acuosa y surfactante, formando dos capas inmiscibles.^{252,253} Kansal y colaboradores presentaron en 2012 unas nanocápsulas formadas por capas, con un núcleo formado por una nanoemulsión con doxorrubicina (NC-DOX) que se unió también a fosfatidilserina (PS) para lograr una mejora en la internalización por parte de los macrófagos.²⁵⁴ Se compararon con y

sin recubrimiento de PS, comprobando que tanto en una línea celular de macrófagos tumoral J774.1, como *in vivo* utilizando hámsteres infectados con *L. donovani*, la acumulación fue mayor al utilizarse las NPs con PS. La eficacia también fue superior, de modo que las PS-NCs-DOX inhibieron un 85,23% de la carga parasitaria en bazo, en comparación con un 72,88 y 42,85% que lograron inhibir las NPs sin PS y la DOX libre, respectivamente.²⁵⁴ Los liposomas son los nanotransportadores más utilizados, y presentan muchas ventajas, como posibilidad de ser cargados con fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, posibilidad de modificar su superficie, ser dirigidos al tejido en el que se encuentra el parásito, etc. La decoración de los liposomas con azúcares permite que los receptores de los macrófagos los reconozcan y se internalicen de modo más eficaz.²⁴² Por ejemplo, se ha demostrado que los liposomas decorados con manosa y acetil galactosamina 4-sulfatada son útiles en el tratamiento de la leishmaniasis.²⁵⁵ Pese a sus numerosas ventajas, estas NPs presentan algunas limitaciones, como toxicidad en caso de que el fármaco se libere en el torrente sanguíneo debido a inestabilidad.^{256,257} Las nanoemulsiones tienen como ventaja una mejor estabilidad fisicoquímica respecto a los liposomas.²⁵⁸

NPs metálicas y de óxido metálico

Este tipo de NPs se basan en la formación de agregados con materiales nobles en estado de valencia 0. A la eficacia del fármaco utilizado, se le añade que algunas de las propiedades inherentes a los metales nobles facilitan la eliminación de los parásitos, por ejemplo, la plata produce ROs.^{111,259,260} Entre las NPs metálicas más utilizadas se encuentran las de plata (Ag-NPs), de dióxido de titanio (TiO₂), de óxido de zinc (ZnO) y de óxido de magnesio (MgO).²⁶⁰⁻²⁶² La utilización de estas NPs bajo luz ultravioleta (UV) o infrarroja (IR) suele aumentar las propiedades leishmanicidas.^{260,261,263} Existen numerosos estudios mostrando buenos resultados al utilizar este tipo de NPs, por ejemplo, al combinar miltefosina con Ag-NPs se consigue reducir su IC₅₀ a la mitad.²⁶⁴ En cuanto a la seguridad de este tipo de NPs se han recopilado algunos datos contradictorios, por lo que son necesarios más estudios al respecto.²⁵³

NPs poliméricas

Se trata de NPs que suelen utilizar como base polímeros lineales de polietilenglicol (PEG), poli ácido láctico (PLA), poli ácido glicólico (PGA), poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) o polímeros naturales como gelatina, albúmina, quitosano y alginato.^{111,265} Existe una gran variedad de NPs poliméricas en cuanto a formas y tipos (Figura 21). Poseen numerosas ventajas: son biodegradables, biocompatibles, más estables que los liposomas y permiten conjugar más de un fármaco.¹¹¹ La unión del fármaco a la NP puede realizarse de forma no covalente en el interior de la NP (mediante adsorción, encapsulación, disolución o

empaquetamiento) o bien covalentemente (conjugado formando un profármaco).^{242,266} Posteriormente, la liberación del fármaco en el sitio diana puede producirse de distintas formas, mediante un cambio en la estructura del polímero (por degradación de la envoltura, de la estructura o de las cargas) o por la rotura del enlace que une el fármaco a la NP en el caso del profármaco.²⁶⁷

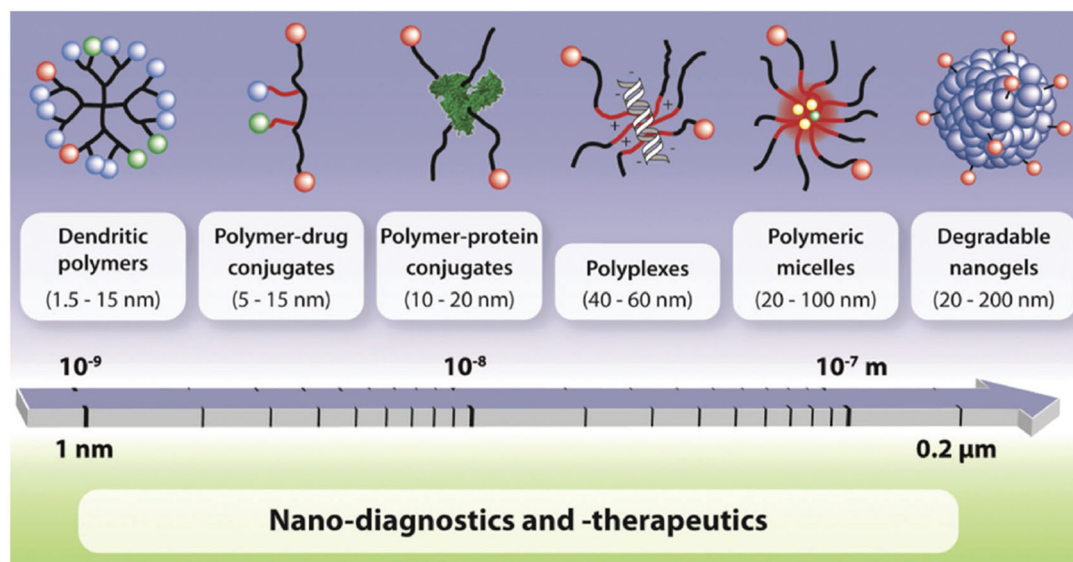


Figura 21.²⁶⁸ Nanotransportadores poliméricos ordenados de menor a mayor tamaño mostrando las distintas composiciones químicas que pueden presentar.

La eficacia de la anfotericina B se ha testado utilizando NPs de PLGA²⁶⁹ y NPs de PLGA decoradas con manosa²⁷⁰ o de PLGA combinado con PEG²⁷¹, obteniendo una eficacia elevada *in vivo* e *in vitro* frente a *Leishmania*. En los estudios además comprobaron que se estimulaba la respuesta defensiva del hospedador, aumentando la respuesta de linfocitos T CD8+ citotóxicos²⁶⁹ o la producción de citoquinas defensivas como IFN- γ u óxido nítrico (NO).²⁷⁰ El uso de PEG se ha explorado en combinación con este tipo de NPs porque mejora la solubilidad, la orientación y la biodisponibilidad de los fármacos conjugados.²⁷²

El objetivo de las NPs es conseguir que éstas liberen el fármaco en el entorno en el que se localiza el parásito, una vez las NPs llegan a la VP. Se trata de un campo en auge y en el que aún queda mucho por explorar. Otras líneas de investigación emergentes son la aplicación de nanotubos y otras estructuras basadas en carbono¹¹¹ o el empleo de estructuras plegadas de ADN, que también pueden ser fagocitadas por los macrófagos y llegar a colocalizar con el parásito en la VP, como hemos demostrado recientemente utilizando nanoflores de ADN y células de mamífero infectadas con *L. infantum* fluorescentes infrarrojos (Figura 22).²⁷³

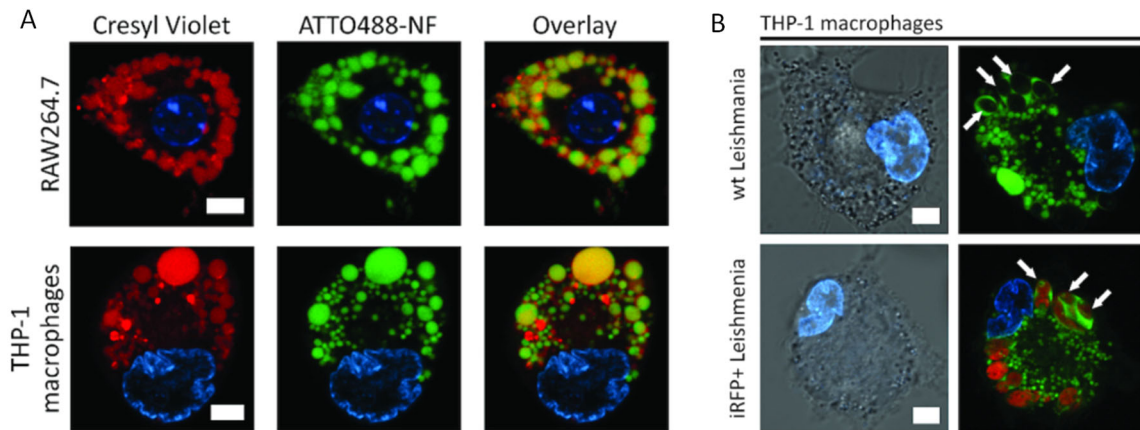


Figura 22.²⁷³ **A.** Colocalización de las nanoflores de ADN con cresil violeta, que tiñe endosomas tardíos y lisosomas, en líneas celulares de macrófagos murinos (RAW264.7) y humanos (THP-1). **B.** Células THP-1 infectadas con *L. infantum* WT (panel superior) y *L. infantum* iRFP (panel inferior) colocalizando en las VPs con las nanoflores (flechas). La nanopartícula puede visualizarse gracias a la incorporación de un nucleótido fluorescente ATTO488 en el proceso de síntesis.

6. HACIA UNA COMPRENSIÓN DE LA BIOLOGÍA DEL PARÁSITO. ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL EN *LEISHMANIA*.

"Now, here, you see, it takes all the running you can do, to keep in the same place"

Esta cita, perteneciente al libro "Alice through the looking glass", de Lewis Carrol, forma parte de un diálogo entre Alicia y la Reina Roja. La reina le dice a Alicia que, en su reino, para llegar a un lugar distinto, debe correr por lo menos el doble de rápido de lo que es capaz, o de lo contrario el reino avanzará igual de deprisa, permaneciendo siempre en el mismo lugar. La frase ha inspirado diversos símiles, entre ellos la Hipótesis de la Reina Roja₍₁₎ (*Los subíndices hacen referencia al Glosario en Anexo I*) (RQH por sus siglas en inglés – Red Queen Hypothesis). Esta hipótesis trata, junto a otras gestadas en la misma época, de resolver uno de los grandes enigmas a los que se ha enfrentado la biología evolutiva, que no es otro que determinar cuáles son las causas que han permitido la aparición, evolución y sobre todo el mantenimiento de la reproducción sexual como forma de reproducción casi universal en los organismos eucariotas, pese a su elevado coste.^{274–280} La reproducción sexual y el sexo se refieren aquí a los procesos en los que dos parentales combinan su material genético en el mismo núcleo y dan lugar a nuevos individuos genéticamente distintos a ellos.^{281,282} Cuando se habla de los costes del sexo se está refiriendo principalmente al "coste de la meiosis" y al "coste de los machos". El "coste de la meiosis" se refiere a la reducción de parentesco entre progenitor y generación filial en la reproducción sexual, debido a que cada parental aporta solamente la mitad de los genes, al contrario de lo que ocurre en la autofecundación.^{277,282–284} Por otro lado, el denominado "coste de los machos" hace referencia al hecho de que los

individuos que actúan como machos no contribuyen a la función reproductiva del grupo y, en poblaciones con proporción de sexos 1:1, la natalidad se puede reducir hasta la mitad.^{276,277,285} En una población en la que coexista la reproducción sexual y asexual, las hembras asexuales pueden desplazar a las sexuales al duplicar su tamaño mucho más rápidamente y tener por lo tanto mayor eficacia biológica(2) (aptitud) al no producir machos^{282,286} (Figura 23). Además, en la reproducción sexual de especies en las que se diferencian los sexos (por ejemplo macho/hembra), es necesario que se encuentren para reproducirse, con el gasto que implica encontrar pareja.²⁸² Otros problemas relacionados con el sexo son la posible necesidad de formar tipos celulares especiales (por ejemplo gametos), o en algunas especies el mantenimiento de genomas diploides.^{287,288}

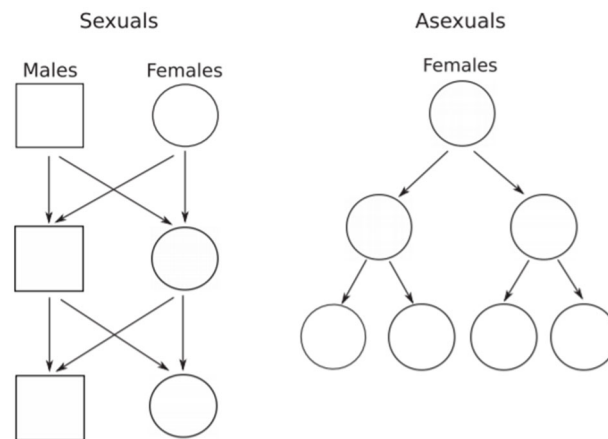


Figura 23.²⁸² Representación esquemática suponiendo que se diferencien dos sexos, en este caso hembras y machos, del coste de los machos en la reproducción sexual frente a la reproducción asexual. En la figura los machos están representados por cuadrados y las hembras por círculos.

La utilización del personaje de Lewis Carroll para nombrar la RQH procede de Van Valen²⁸⁰, que trataba de explicar las tasas de extinción constantes de los organismos marinos^{277,280}, sin embargo, adquirió un nuevo significado al utilizarse para estudiar las complejas relaciones parásito-hospedador y su co-evolución. La hipótesis explica, por un lado, cómo el parásito promueve la selección de la diversidad genética del hospedador y a la inversa, y por otro, cómo el parasitismo selecciona el sexo en esta relación. Los genotipos comunes en el hospedador serán seleccionados a la contra por los parásitos virulentos que co-evolucionan, de modo que aunque oscilen distintos genotipos del parásito y del hospedador a lo largo del tiempo, en un lapso de tiempo de miles de generaciones, permanecen constantes (correr para permanecer en el mismo lugar).^{277,289}

Las teorías sobre la ventaja evolutiva que proporciona el sexo se dividen en aquellas que postulan que la reproducción sexual permite purgar las mutaciones deletéreas y las que destacan la mayor variabilidad genética que permite el sexo y la recombinación(3), así como

las ventajas que proporcionan en la adaptación a ambientes cambiantes.²⁷⁴ Las primeras teorías se centran en destacar las ventajas del sexo y la recombinación para aliviar los problemas que aparecen debido a procesos como la interferencia de Hill-Robertson⁽⁴⁾ al separar grupos de loci vinculados⁽⁵⁾, y el trinquete de Muller⁽⁶⁾, al evitar la acumulación de mutaciones deletéreas debido a este fenómeno.^{274,290-294} La interferencia de Hill-Robertson se produce cuando se asocian alelos ventajosos con alelos deletéreos debido al azar^{291,295}, lo cual se puede manifestar con otros fenómenos como la selección de fondo⁽⁷⁾ o el trinquete de Muller.^{282,293,296} La reproducción sexual puede así disminuir estos efectos, evitando el efecto de Hill-Robertson y disminuyendo la probabilidad de que mutaciones deletéreas queden fijadas en una población.^{293,297}

Entre las segundas teorías que postulan el sexo y la recombinación como ventajas para la adaptación, el modelo de la lotería de Williams⁽⁸⁾ describía el sexo como una estrategia de cobertura de apuestas^{275,277}, de modo que una descendencia menor pero variable sería “como comprar apuestas con números distintos” mientras la reproducción asexual sería “comprar muchas apuestas del mismo número”. En ciertas circunstancias, por ejemplo un ambiente cambiante, en el grupo sexual podría existir algún genotipo ventajoso (“un número ganador”), que en la reproducción asexual podría no darse al tener solamente una oportunidad (“o un único número en la apuesta”).²⁸² La migración a nuevos y distintos entornos también podría verse beneficiado por el sexo y podría ser un factor capaz de seleccionar este tipo de reproducción, ya que la recombinación y el sexo pueden favorecer la propagación de alelos beneficiosos y eliminar aquellos genotipos que no se adaptan al nuevo ambiente.²⁷⁷ Una vez se han adaptado al nuevo entorno, parece que el sexo deja de seleccionarse, es decir, es necesario un cambio constante del ambiente para su mantenimiento.^{276,277} Precisamente aquí entra en juego la co-evolución hospedador-parásito, que proporcionaría un cambio ambiental constante que puede mantener el sexo a largo plazo.²⁷⁷

Como críticas a estas teorías que básicamente consideran que la reproducción sexual se mantiene gracias a factores bióticos, algunos autores han defendido que los factores abióticos también pueden ser importantes impulsores de la evolución y pueden tener un papel destacado en el mantenimiento de la reproducción sexual.²⁹⁸ Todo esto se complica más si diferenciamos entre especies haploides y diploides, ya que, al considerar modelos haploides en el estudio de la reproducción sexual, la ventaja de ésta sobre la reproducción asexual disminuye a medida que el tamaño de la población aumenta. Sin embargo, si consideramos las poblaciones diploides, la reproducción sexual sigue presentando ventajas respecto a la asexual aun en poblaciones de tamaño infinito²⁷⁴, lo que explica la persistencia del sexo en poblaciones de gran tamaño, en las que efectos como el trinquete de Muller o el efecto Hill-

Robertson no son tan importantes.^{274,293,295} Por otro lado, la diploidía a menudo no presenta ventajas en la aptitud de los individuos sin reproducción sexual.²⁷⁴

Dentro de la RQH está muy estudiado el papel de los parásitos en el mantenimiento del sexo en poblaciones naturales de hospedadores que también se reproducen mediante reproducción asexual, ya que los parásitos pueden imponer una selección negativa dependiente de la frecuencia que favorecería a los genotipos menos frecuentes del hospedador.²⁹⁹ Sin embargo, este papel no se ha estudiado tanto a la inversa, es decir, si la dinámica hospedador-parásito puede tener un efecto de mantenimiento de la capacidad de reproducción sexual en las poblaciones de parásitos.^{300,301} Dado que es conocido que muchas especies de parásitos mantienen la reproducción sexual (obligatoria u ocasional) como parte de su ciclo biológico, la cuestión parece relevante.^{301,302} Entre los pocos estudios que existen, se ha visto una ventaja del sexo en los parásitos que se enfrentan al sistema inmune de sus hospedadores.³⁰⁰ Parece que, de forma aislada, el antagonismo hospedador-parásito puede no ser suficiente para explicar el mantenimiento del sexo, pero combinado con la acumulación de mutaciones deletéreas²⁹³ y con la interacción con el sistema inmune del hospedador, las ventajas del sexo superan los costes asociados.^{300,301} Esto explicaría que es más común que se haya descubierto reproducción sexual en especies parásitas que en especies cercanas de vida libre.^{301,303} No obstante, la mayor parte de estas especies eucariotas parásitas, no usan la reproducción sexual de forma exclusiva, sino que a la reproducción asexual se une una etapa sexual, que puede ser opcional o formar parte de su ciclo biológico (Figura 24).

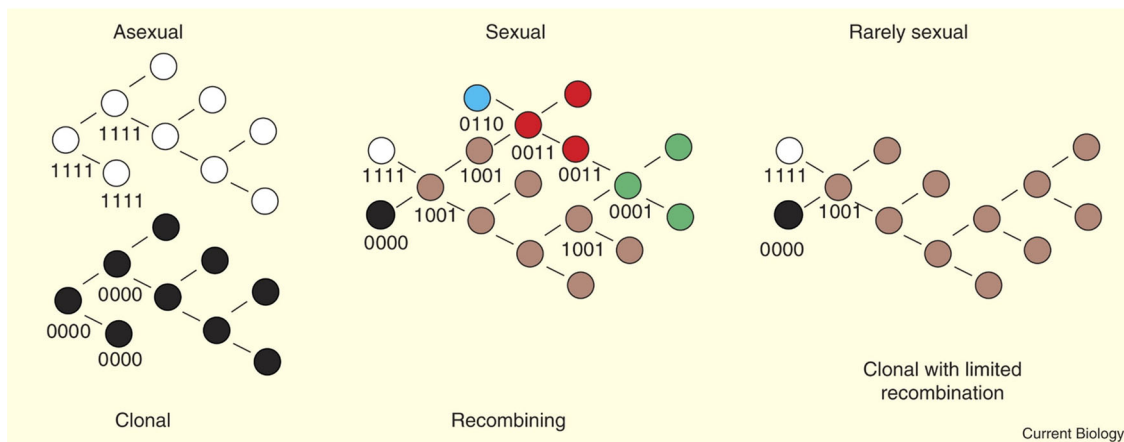


Figura 24.³⁰⁴ Tipos de poblaciones clonales o recombinantes, o clonal con una recombinación limitada. Los beneficios potenciales del sexo permiten purgar el genoma de mutaciones deletéreas y generar diversidad, mientras la reproducción sexual permite una rápida expansión.

En los parásitos, la co-evolución con el hospedador está íntimamente ligada con la evolución de su virulencia, definida como la disminución de aptitud del hospedador por culpa del parásito, lo que depende en gran medida de la tasa y el modo de transmisión, de la dinámica del parásito en el hospedador y de la tasa y el modo de replicación del parásito.^{305,306} La

virulencia no es algo propio del parásito, sino que va a ser el resultado de la interacción parásito-hospedador, de forma que de nuevo, las oscilaciones nos llevarían a una constante a lo largo del tiempo, confirmando la RQH.³⁰² El éxito del parasitismo es un equilibrio que permite que las necesidades del hospedador estén más o menos satisfechas mientras se explotan sus recursos por parte del parásito y se consigue la mayor eficiencia de replicación y transmisión al mismo tiempo.³⁰⁷ El sexo tiene por lo tanto un importante papel en la virulencia, así como en el rango de hospedadores del parásito y por lo tanto, la reproducción sexual tiene consecuencias en la epidemiología de las enfermedades que provocan estas especies.^{288,308}

Tras multitud de enfoques y teorías para tratar de determinar cuál es la causa que mantiene el sexo en las poblaciones, la biología evolutiva fue derivando hacia un enfoque pluralista⁽⁹⁾ que pudiera explicar el sexo y la recombinación mediante un conjunto de factores.²⁷⁸ Howard y Lively, en 1994, trataron de explicar el mantenimiento del sexo mediante dos mecanismos independientes pero que juntos explicaban mejor el sexo que ambos por separado: la RQH y el trinquete de Muller.³⁰¹ Posteriormente, West publicó en 1999 un interesante artículo abordando esta idea pluralista para explicar el sexo y la recombinación^{279,309} y desde entonces se ha generalizado la idea de que no es posible resolver este enigma de la biología evolutiva desde una única teoría.²⁷⁸

El conocimiento de la biología, y en particular de los ciclos biológicos, incluyendo las relaciones parásito-hospedador y los distintos tipos de reproducción que se pueden alternar en estas especies de parásitos, es un paso importante en el conocimiento de las enfermedades que provocan, su transmisión y su tratamiento, y sin embargo, muchas de estas cuestiones son aún un misterio.²⁸⁸ La evolución del sexo parece estar íntimamente ligada con el origen de los eucariotas, ya que se considera que los eucariotas tienen un ancestro sexual común.³¹⁰⁻³¹² Las teorías actuales postulan que el sexo fue posterior al origen de la recombinación, ya que esta última tiene lugar en especies no sexuales.^{310,313} Pese a esta universalidad del sexo en las especies eucariotas, no siempre todas han sido consideradas sexuales. Muchos organismos unicelulares eucariotas han sido históricamente considerados asexuales, incluidos muchos patógenos y parásitos. El estudio de la reproducción de estos organismos tiene dificultades añadidas debido a que puede ser, en palabras de algunos autores raro, furtivo y críptico.²⁸¹ Raro se refiere al hecho de que estos parásitos normalmente pueden reproducirse de forma asexual y raramente de forma sexual, y muchas especies pueden completar su ciclo biológico únicamente mediante reproducción asexual.²⁸⁸ Furtivo se refiere a que puede ser difícil observar debido a su baja frecuencia y al lugar en el que se produce y críptico hace referencia a que la reproducción sexual podría ser observada pero difícil de reconocer.²⁸¹ El estudio de la reproducción en organismos unicelulares que son

capaces de reproducirse asexual y sexualmente permite mejorar el estudio de los procesos asexuales y sexuales y determinar las ventajas que una estrategia puede tener frente a la otra.²⁷⁴ Por supuesto, será más fácil identificar el ciclo meiótico si éste es obligatorio, como en el caso de *Plasmodium*, que además presenta estadios sexuales morfológicamente distintos, que si estudiamos especies que no tienen una etapa sexual obligatoria²⁸⁸ (Figura 25).

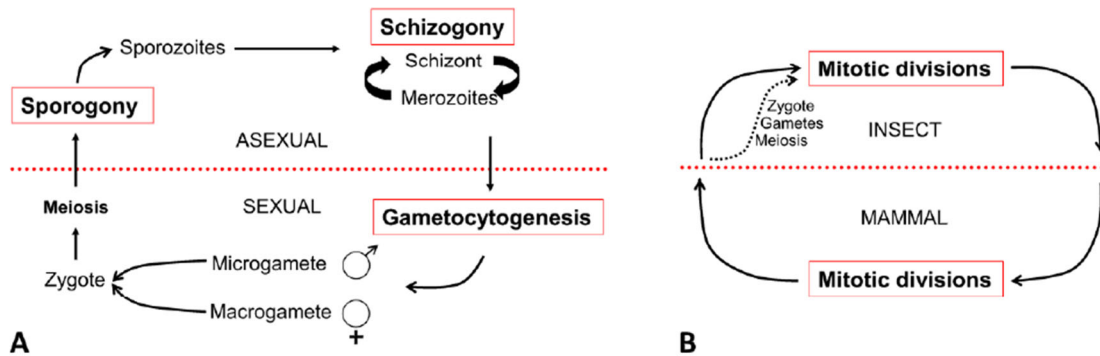


Figura 25. Esquema que representa los ciclos biológicos del grupo Apicomplexa (*Plasmodium*, *Eimeria* y *Toxoplasma*) (panel A) y de *Trypanosoma* (panel B). **A.** El grupo Apicomplexa tiene diferenciación sexual (gametocitogénesis) en el interior de las células del hospedador desarrollándose como gametocitos masculinos o femeninos. Los gametos forman una célula diploide que sufre meiosis y da lugar a nuevos esporozitos infecciosos. En estos parásitos se diferencia una etapa asexual y una etapa sexual, ambas obligadas. **B.** El ciclo de vida de *T. brucei* y de otros tripanosomátidos consta de dos hospedadores, y las especies se mantienen diploides la mayor parte del tiempo. Opcionalmente, *T. brucei* puede dar lugar a gametos haploides en el insecto vector para realizar un ciclo sexual meiótico.³¹⁴

¿Cómo podemos detectar entonces si estos organismos tienen una fase sexual en su ciclo biológico? Según diferentes autores, existen tres formas principales de identificarlo.

La primera de ellas es la observación directa del apareamiento *in vivo* o *in vitro*, método infalible pero también complicado por lo críptico que puede ser.^{281,288} Esto incluiría la identificación de los gametos haploides diferenciándolos de las células parentales, o la fusión de los citoplasmas (singamia/plasmogamia) o de los núcleos (cariogamia). Entre los protozoos parásitos, la reproducción se ha visto de una forma más o menos clara *in vitro* en el caso de *T. brucei*³¹⁵, y en el caso de *Leishmania* se sugirió hace mucho tiempo la fusión de dos promastigotes *in vitro*, aunque sin posteriores estudios que lo confirmaran.³¹⁶ Esta primera forma está relacionada con la obtención de híbridos en el laboratorio, de lo que se hablará más adelante.

El segundo método que permite obtener datos sobre la frecuencia de reproducción sexual en una especie o población es el uso de herramientas de genética poblacional, aunque las

Conclusiones de estos estudios tienen que ser tomadas con mucha cautela. Como se explicaba antes, el sexo rompe con los equilibrios de ligamiento entre loci mediante recombinación y reordenamiento cromosómico, sin embargo, la reproducción asexual y también la autofecundación(10), el sexo sin cruzamiento o la endogamia(11), pueden tener consecuencias similares, por lo que no siempre se puede descartar la reproducción sexual midiendo determinados parámetros en la población.²⁸⁸ En la década de los 90, Tibayrenc y colaboradores propusieron un modelo de reproducción clonal estricta debido a que en *Leishmania*, *Trypanosoma* y otros protozoos parásitos no se detectaba segregación(12) ni recombinación, que son las dos características más evidentes de reproducción sexual.^{317,318} Estas conclusiones se obtuvieron a partir de la heterocigosidad(13) constante observada en las poblaciones y mediante el análisis del equilibrio Hardy-Weinberg(14), cuya desviación indicaba una tendencia a la clonalidad.³¹⁹⁻³²¹ Esta desviación podría deberse al aumento estable de la heterocigosidad debido a la ausencia de recombinación, además, las poblaciones mostraban fuerte desequilibrio de ligamiento(15), baja tasa de genotipos recombinantes y asociación entre marcadores genéticos no relacionados³²², por lo que la explicación de la teoría clonal como modo de reproducción era plausible.

En paralelo a estos estudios, Tait y colaboradores ya cuestionaban la teoría clonal estricta utilizando marcadores isoenzimáticos en *T. brucei*³²³, demostrando la ploidía de estas especies y detectando que la heterocigosidad era elevada en algunas poblaciones.³²³⁻³²⁶ Además, la baja heterocigosidad en *Leishmania* podía deberse a que estos parásitos son aneuploides(16) de forma generalizada y toleran variaciones en el número de cromosomas.³²⁶⁻³²⁸ Así, la teoría clonal estricta se flexibilizó a un modelo de evolución predominantemente clonal(17) (PCE por sus siglas en inglés –Predominant Clonal Evolution) que postulaba que a pesar de que el modo de reproducción predominante de estos organismos unicelulares es la reproducción asexual, existe recombinación genética esporádica que no es lo suficientemente fuerte como para romper el umbral de clonalidad que permitiría ver sus efectos en la población.^{329,330} Los episodios de recombinación podrían dar lugar a grupos genéticamente estables denominados quasi-clados(18).³³¹ Entre las críticas a este modelo encontramos que algunos autores defienden que el desequilibrio de ligamiento no es buen indicador de la presencia de reproducción sexual en una población³³² y que los muestreos inadecuados pueden dar lugar a sesgos y conclusiones erróneas sobre el efecto Wahlund(19).^{319,333,334} Otros autores consideran que la elevada diversidad genética presente en estas especies es difícilmente explicable mediante el modelo PCE.³³⁵ Por otro lado, la existencia de híbridos de distintas especies de *Leishmania* empezó a estar ampliamente descrito³³⁶⁻³³⁹ incluso entre especies alejadas de *Leishmania* y causantes de distinto tropismo patogénico.³⁴⁰

El tercer método con el que podemos inferir reproducción sexual en una especie es la identificación en sus genomas de los genes específicos de meiosis y su funcionalidad en el ciclo sexual. En *T. brucei*³⁴¹ se ha visualizado la expresión de los genes codificantes de las proteínas implicadas en la introducción de roturas de doble cadena en el ADN, el ensamblaje del complejo sinaptonémico y la recombinación homóloga en las glándulas salivares de la mosca tsé-tsé (Figura 26A, 26B).^{311,342} Recientemente, un estudio de Hofstatter y Lahr ha recopilado datos que indican que la maquinaria meiótica se encuentra básicamente en todos los grupos de eucariotas, incluyendo genes que codifican para proteínas implicadas en la plasmogamia y cariogamia (Figura 27A, 27B). Considerando además que el ancestro común de los eucariotas era capaz de realizar reproducción sexual, estos autores afirman que debe suponerse que todo eucariota es capaz de realizar sexo, y que los linajes eucariotas asexuales podrían ser el resultado de una pérdida secundaria de éste.³⁴² Otro aspecto a considerar en el estudio de la reproducción sexual en estos parásitos es la identificación de los gametos, que aunque es posible midiendo cambios en la ploidía³¹⁵, puede ser complicado debido a la forma que adquieren y a la variedad de intermediarios meióticos que podrían coexistir en estas especies³⁴³, además de otros factores, como la aneuploidía en *Leishmania* o *Trypanosoma*.³⁴⁴⁻³⁴⁶

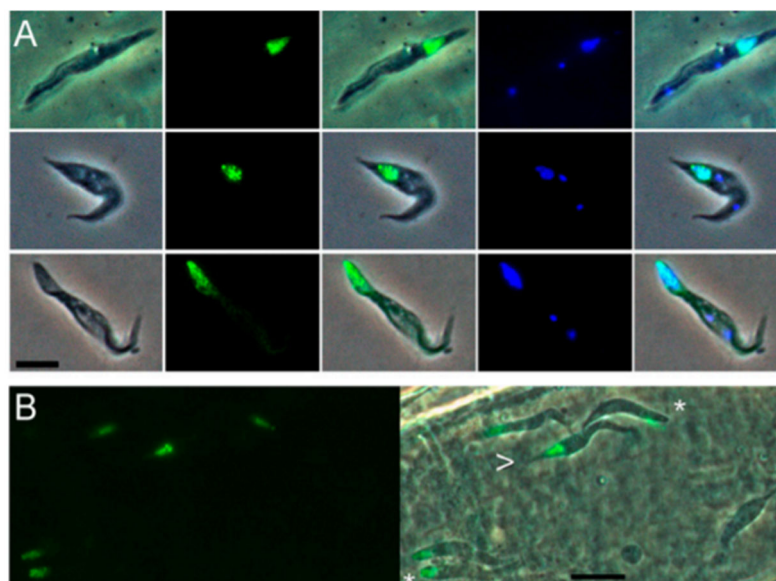


Figura 26³⁴¹. Expresión de los genes específicos de meiosis fusionados a la proteína fluorescente amarilla (YFP). **A.** Expresión de genes específicos de meiosis fusionados a YFP en tripanosomas fijados en exudado salival de moscas tsé-tsé. El panel superior muestra la expresión del gen MND1, el panel central del gen DMC1 y el panel inferior muestra la expresión del gen HOP1. **B.** Tripanosomas localizados en el interior de una glándula salival de mosca tsé-tsé mostrando la expresión del gen HOP1. Los tripanosomas fluorescentes tienen una parte posterior roma (señalado con el asterisco) o puntiaguda (indicado con la flecha).

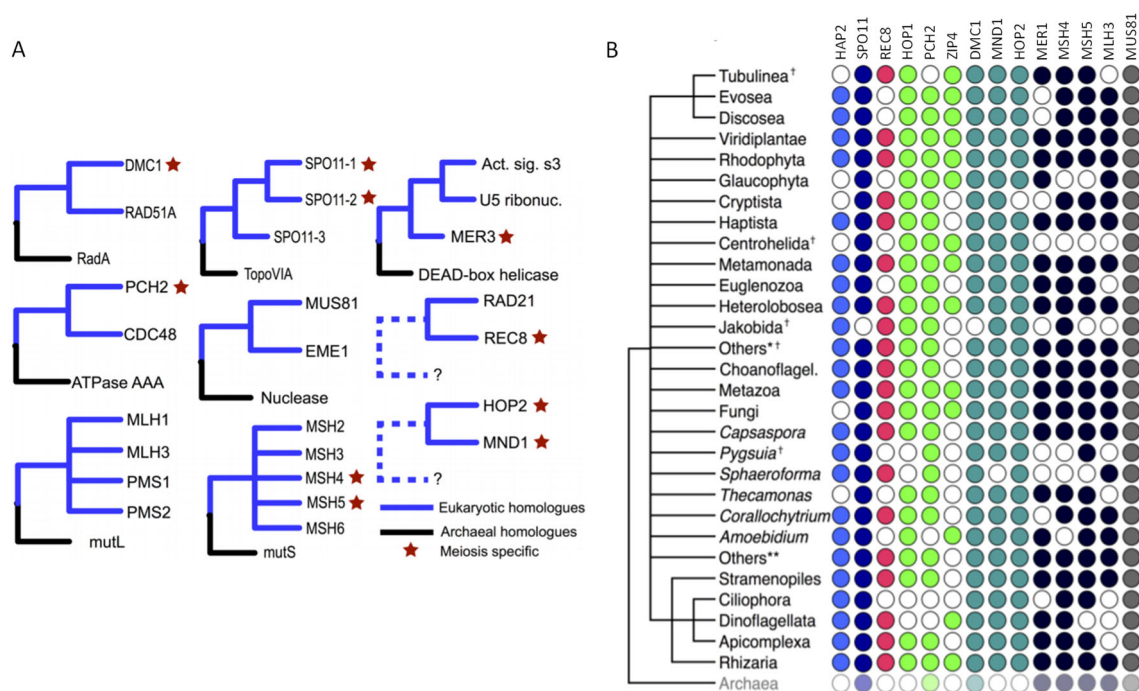


Figura 27³⁴². **A.** Filogenias simplificadas de las proteínas meióticas de los eucariotas, las cuales comparten un patrón evolutivo similar, con un origen ancestral de las arqueas **B**³⁴². Distribución de las proteínas específicas de meiosis y de la proteína de la plasmogamia (HAP2) en los supergrupos eucarióticos.

Entre las pruebas más importantes para la demostración de cruzamiento de estos protozoos se encuentran los cruces experimentales de laboratorio, ya que ofrecen un ambiente controlado en el que comprobar si la progenie híbrida recién formada reúne características de ambos parentales y puede ayudar a resolver enigmas como la generación de gametos o las características de los procesos sexuales. Antes de las primeras pruebas de intercambio genético en el laboratorio en *Leishmania*, ya se habían realizado numerosos cruces exitosos en *Trypanosoma*^{347–353}, incluyendo cruces entre distintas cepas de *T. brucei* y presencia de híbridos poliploides³⁴⁷, utilización de proteínas fluorescentes como apoyo para el estudio del intercambio genético como la proteína fluorescente verde (GFP)³⁵⁰ o parentales que expresaban GFP y la proteína fluorescente roja (RFP) con el fin de obtener híbridos fenotípicamente detectables de color amarillo³⁵² y cruzamientos intraclonales.³⁵³ A estas alturas, en *Trypanosoma* se consideraba ya probada la existencia de reproducción sexual de tipo meiótico^{351,352} y poco después, se lograba el primer cruce experimental de *Leishmania* entre dos cepas parentales de *L. major*.³⁵⁴ En 2011 se publicó el ciclo meiótico de *T. brucei* describiendo la expresión secuencial de genes específicos de meiosis.³⁴¹ En 2014, los trabajos de Peacock y colaboradores permitieron resolver algunas cuestiones sobre los tipos de apareamiento y las diferencias en la tasa de éxito de cruces intraclonales y entre distintas cepas de *T. brucei*³⁵⁵ y sobre la producción de gametos haploides. Igualmente, se pudo

observar la fusión *ex vivo* y posterior generación de híbridos entre tripanosomas procedentes de glándulas salivares de mosca.³¹⁵

Recientemente, un complejo trabajo ha tratado de describir la producción de gametos e intermediarios meióticos que aparecen en el ciclo sexual de *T. brucei*, incluyendo productos de la meiosis I y distintos tipos de gametos (con variaciones en el número de núcleos y de kinetoplastos) (Figura 27).³⁴³

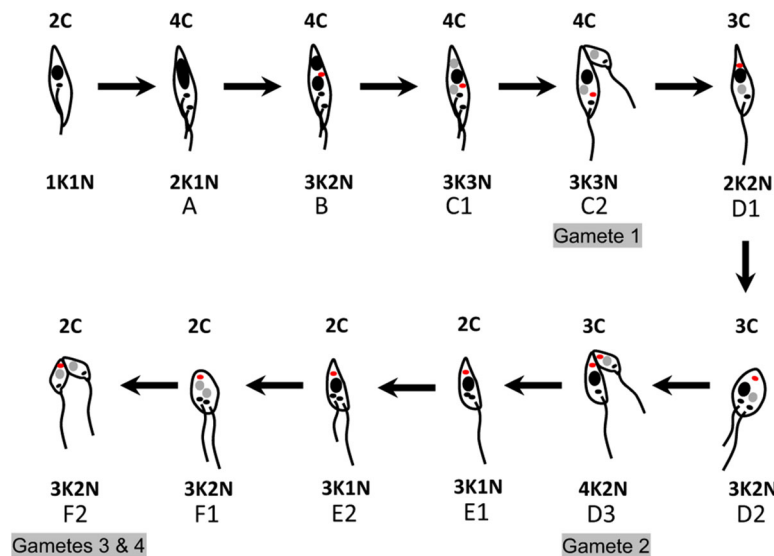


Figura 28.³⁴³ Producción secuencial de intermediarios meióticos y gametos según Peacock y colaboradores. Los núcleos se representan en negro (4C o 2C) o en gris (1C). Los kinetoplastos asociados a un flagelo se muestran en negro y los no asociados a flagelo se muestran en rojo. 1C, 2C, 3C y 4C se refieren a la cantidad de ADN total presente en un núcleo o una célula. N y K debajo de cada dibujo indica el número de kinetoplastos (K) y núcleos (N). La secuencia sería la siguiente: a partir de un tripanosoma normal (1 núcleo 2C diploide, 1 kinetoplasto) se forma un divisor meiótico (A) con 2 kinetoplastos y 1 núcleo replicado 4C que da lugar a los intermediarios C1 y C2 mediante una reducción convencional (intermediario B). C1 y C2 son intermediarios meióticos con múltiples kinetoplastos y 3 núcleos (1 núcleo 2C y 2 núcleos 1C, por lo que el contenido total de ADN sigue siendo aquí 4C). Al dividirse C1 para formar C2, se produce un gameto con núcleo 1C y 1 o más kinetoplastos. La célula resultante (D1) es un intermediario que posee 2 núcleos (un núcleo 2C y un núcleo 1C), es decir, es una célula 3C con un número variable de kinetoplastos. En este punto se forma un nuevo flagelo para la producción de un segundo gameto en el paso D2 a D3. El gameto formado tiene un núcleo 1C y 2 kinetoplastos y la célula resultante tiene un núcleo 2C (intermediario E1) en la que se forma un nuevo flagelo dando lugar al intermediario E2. Por último, la división del núcleo de E2 da lugar al intermediario F1, con 2 o 3 kinetoplastos y 2 núcleos 1C, de modo que en la siguiente etapa se produce la formación de dos tipos de gametos (F2) con núcleo 1C y 1 o 2 kinetoplastos si F1 era 3K2N (2K1N y 1K1N) o dos gametos 1K1N si F1 era 2K2N.

En *Leishmania*, tras el trabajo de Akopyants y colaboradores en 2009 que demostraba intercambio genético en moscas infectadas con parásitos de *L. major* por primera vez, se han sucedido numerosas pruebas que demuestran que estos procesos tienen lugar en *Leishmania*, tanto intraclonalmente³⁵⁶, como entre cepas de la misma especie^{354,357-359} y entre distintas especies.³⁶⁰ Para ello, se han utilizado combinaciones de especies y vectores permisivos y

no permisivos³⁵⁸ y proteínas fluorescentes para identificar los híbridos amarillos resultantes del cruzamiento de parentales que expresan proteínas fluorescentes rojas y verdes.^{356,357} La secuenciación genómica ha permitido demostrar que los híbridos de *Leishmania* formados son coherentes con una reproducción sexual de tipo meiótico en la que los híbridos de la generación F1 son heterocigotos para la mayor parte de los marcadores homocigotos parentales, con algunas excepciones que podrían deberse a pérdida de heterocigosidad o cambios en la ploidía.^{359,361} En el trabajo presentado por Inbar y colaboradores se demostró además la capacidad de cruzamiento de los híbridos intraespecíficos obtenidos, mientras que los híbridos interespecíficos fueron estériles.³⁵⁹ Recientemente se demostró por primera vez que *Leishmania* es capaz de realizar intercambio genético *in vitro* en el laboratorio, sin necesidad del insecto vector, utilizando dos cepas de *L. tropica*³⁶², y se ha abierto la puerta a la posibilidad de que también pueda producirse intercambio genético entre amastigotes que se encuentran dentro de la misma vacuola parasitófora en especies del complejo *L. mexicana*.³⁶³

Otra de las incógnitas que se ha tratado de resolver mediante los cruces de laboratorio es como se produce la herencia del kinetoplasto, ya que el genoma mitocondrial se hereda de forma uniparental en muchas especies eucariotas.³⁶⁴⁻³⁶⁶ Los primeros análisis de herencia de maxicírculos en *T. brucei* indicaban que la herencia era uniparental.³⁶⁷⁻³⁶⁹ mientras se comprobaba que en el caso de los minicírculos se encontraba una mezcla de genotipos parentales.^{370,371} Más tarde se identificaron algunos cruces en *Trypanosoma* que contenían mezcla de maxicírculos, especialmente al analizar etapas de crecimiento tempranas en la progenie híbrida obtenida.^{352,371,372} Esta aparente contradicción puede explicarse debido a deriva genética⁽²⁰⁾ que podría actuar mucho más rápido y fácilmente en el caso de los maxicírculos, al ser un número pequeño de moléculas, de modo que las sucesivas rondas de propagación clónica dejarían fijado por azar en relativamente pocas generaciones uno de los genotipos parentales, lo que no ocurre con los minicírculos por ser mucho más abundantes.^{372,373} En *Leishmania*, aunque la herencia uniparental del maxicírculo sí se ha comprobado³⁶⁰, no se han analizado híbridos en etapas tempranas tras el cruzamiento ni se había explorado hasta ahora la herencia de los minicírculos en la progenie híbrida.

6.1. Glosario

1. **Hipótesis de la reina roja (Red Queen Hypothesis):** Hipótesis que describe como la coevolución antagónica parásito-hospedador (oscilaciones de las frecuencias genotípicas de ambos) mantiene la diversidad. La presión ejercida por los parásitos en los hospedadores contribuye al mantenimiento del sexo, al seleccionar los genotipos menos comunes que pueden aparecer fácilmente por sexo/recombinación, lo que también tiene lugar en sentido contrario.^{277,280,289}
2. **Eficacia biológica (Aptitud):** La aptitud se refiere a la capacidad de los organismos, poblaciones o especies, para sobrevivir y reproducirse en el entorno en el cual se desarrollan, consiguiendo aportar sus genes a la siguiente generación.³⁷⁴
3. **Recombinación:** Producción de nuevas combinaciones de alelos o genotipos mediante cruzamiento o conversión génica. La recombinación meiótica se refiere al intercambio de genes entre los pares de cromosomas homólogos, lo que rompe los desequilibrios de ligamiento entre loci.^{281,295}
4. **Efecto o interferencia Hill-Robertson:** La selección que actúa en un locus interfiere con la selección que actúa en un segundo locus vinculado, en una población de tamaño finito. La recombinación puede romper esta interferencia y mejorar la respuesta a la selección.^{282,295}
5. **Loci vinculados:** los loci vinculados o ligados, son aquellos que tienden a heredarse de forma conjunta debido al lugar cercano en el que se encuentran dentro del mismo cromosoma.²⁹⁵
6. **Trinquete de Muller:** los linajes asexuales sin recombinación con un tamaño de población finito acumularán mutaciones deletéreas (en forma de trinquete), de forma irreversible, terminando con su extinción. Es una consecuencia de la reproducción asexual.²⁹³
7. **Selección de fondo:** proceso mediante el cual las mutaciones deletéreas recurrentes pueden afectar a la diversidad genética de los loci cercanos (vinculados), al actuar la selección contra los alelos deletéreos, disminuyendo el tamaño efectivo de la población.³⁷⁵
8. **Modelo de la lotería de Williams:** la producción de una descendencia genéticamente variable se ve favorecida en entornos abióticos cambiantes. El sexo sería una estrategia de cobertura de apuestas, en la cual la producción de descendencia variable se asocia a una mayor aptitud media.²⁷⁷

9. **Enfoque pluralista:** El enfoque pluralista para explicar el mantenimiento de la reproducción sexual considera que son múltiples los factores o hipótesis que ocurren de forma no competitiva y simultánea los que permiten el mantenimiento del sexo en las poblaciones.²⁷⁸
10. **Autofecundación:** modo de reproducción en la cual un individuo autofecunda sus propios gametos femeninos con sus propios gametos masculinos, dando lugar a una progenie con baja heterocigosidad en la mayoría de loci.³⁷⁶
11. **Endogamia:** apareamiento que tiene lugar entre individuos relacionados genéticamente (emparentados por ascendencia) y que es más probable en poblaciones de pequeño tamaño. Las consecuencias a nivel de genética poblacional pueden ser similares a las que tienen lugar en poblaciones asexuales.³⁷⁶
12. **Segregación:** separación de cada locus de su homólogo de forma que quede un alelo para cada gen. La segregación también rompe con los desequilibrios de ligamiento entre loci.²⁹⁵
13. **Heterocigosidad:** proporción de heterocigotos en una población o muestra. A menudo el concepto es utilizado como medida de diversidad genética, y de forma menos frecuente también puede referirse a la proporción de loci heterocigotos que presenta un individuo en su genoma.³³⁴
14. **Equilibrio Hardy-Weinberg:** equilibrio alcanzado por una población panmíctica con generaciones no superpuestas, que no está sujeto a deriva genética, selección, mutación o migraciones. En estas condiciones la población se encuentra en un equilibrio alélico y genotípico p_i^2 y $2 p_i (1 - p_i)$ para todos los alelos i y todas las generaciones en esas condiciones. El equilibrio Hardy-Weinberg se alcanza en una sola generación en estas condiciones.³³⁴
15. **Desequilibrio de ligamiento (LD):** el equilibrio de ligamiento entre todos los loci solamente se alcanza tras varias generaciones de la población en equilibrio Hardy-Weinberg, incluso en el caso de loci no ligados. El LD ocurre cuando sus haplotipos combinados no están en las frecuencias iguales al producto de sus frecuencias alélicas. Para dos loci A y B, cada uno con los alelos 1 y 2 en las frecuencias p_1 y p_2 , o q_1 y q_2 respectivamente, los loci se encuentran en equilibrio de enlace si el haplotipo A1_B1 se presenta en una frecuencia p_1q_1 en la población; la desviación de esa frecuencia indica LD. Las fuerzas evolutivas producen y mantienen el LD (deriva, migración, sistemas reproductivos).³³⁴

16. **Aneuploidía:** cambios en el número de cromosomas en un genoma. En *Leishmania* y otros protozoos parásitos, la aneuploidía es generalizada.^{344,376}
17. **Modelo de evolución predominantemente clonal (PCE):** Modelo propuesto por Tibayrenc y colaboradores para explicar el modo de reproducción de multitud de especies, entre ellas los tripanosomátidos, que indica que estas especies se reproducen mayoritariamente mediante reproducción sexual, y aunque puedan tener acceso a algún tipo de reproducción sexual, los efectos derivados de la misma no son capaces de romper el umbral de clonalidad que permitiría que tuviese efectos en la población.^{317,330}
18. **Quasi-clados:** subdivisiones genéticas difuminadas debido al intercambio genético ocasional. Las poblaciones naturales de patógenos tienden a diferenciarse en subdivisiones genéticas estables en el espacio y el tiempo, pero debido a que se produce recombinación de forma ocasional, el término clado no es correcto porque entre verdaderos clados no existe recombinación).^{377,378}
19. **Efecto Wahlund:** fenómeno que tiene lugar cuando en un estudio de genética poblacional el muestreo se compone de individuos que pertenecen a subpoblaciones diferenciadas genéticamente, lo que tiene como consecuencia una pérdida de heterocigosidad en comparación con la heterocigosidad esperada bajo el supuesto de combinación aleatoria de gametos.³⁷⁶
20. **Deriva genética:** mecanismo evolutivo que se refiere a las fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas que se dan de una generación a la siguiente debido a sucesos aleatorios, lo que puede dar lugar a la desaparición de ciertos rasgos en una población o a cambios en su frecuencia. Los efectos de la deriva genética son más pronunciados en poblaciones de pequeño tamaño.^{281,373}

Referencias

1. Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: Seven or nine? *BioSystems*. 1981;14(3-4): 461-481. doi:10.1016/0303-2647(81)90050-2
2. D'ávila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HLC, Morelli KA, Grybchuk-Ieremenko A, et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(8): 956-965. doi:10.1590/0074-02760150253
3. Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(Pt 5): 1861-1875. doi:10.1099/ijs.0.63081-0
4. Jensen RE, Englund PT. Network news: The replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66: 473-491. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150057
5. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med*. 2005;4(6): 623-647. doi:10.2174/1566524043360096
6. Lin RH, Lai DH, Zheng LL, Wu J, Lukeš J, Hide G, et al. Analysis of the mitochondrial maxicircle of *Trypanosoma lewisi*, a neglected human pathogen. *Parasit Vectors*. 2015;8: 665. doi:10.1186/s13071-015-1281-8
7. Stuart K, Panigrahi AK. RNA editing: Complexity and complications. *Mol Microbiol*. 2002;45(3): 591-596. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03028.x
8. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5: 276. doi:10.1186/1756-3305-5-276
9. Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Biol Sci*. 1977;199(1135): 309-320. doi:10.1098/rspb.1977.0141
10. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017;6: 750. doi:10.12688/f1000research.11120.1
11. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, et al. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. *Curr Trop Med Rep*. 2021; 1-12. doi:10.1007/s40475-021-00232-7
12. World Health Organization (WHO). Report on the interregional meeting on leishmaniasis among neighbouring endemic countries in the Eastern Mediterranean, African and European regions, Amman, Jordan 23-25 September 2018.
13. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*. 2017;7(9): 170165. doi:10.1098/rsob.170165
14. Lacomble S, Vaughan S, Gadelha C, Morpew MK, Shaw MK, McIntosh JR, et al. Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 8): 1081-1090. doi:10.1242/jcs.045740
15. Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007;37(10): 1063-1075. doi:10.1016/j.ijpara.2007.03.008
16. Gluenz E, Ginger ML, McKean PG. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(4): 473-479. doi:10.1016/j.mib.2010.05.008

17. Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, et al. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. PLoS Genet. 2014;10(1): e1004092. doi:10.1371/journal.pgen.1004092
18. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 2003;33(10): 1027-1034. doi:10.1016/S0020-7519(03)00142-5
19. Real F, Mortara RA, Rabinovitch M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: Live imaging of coinfecting macrophages. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(12): e905. doi:10.1371/journal.pntd.0000905
20. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends Microbiol. 1998;6(10): 392-401. doi:10.1016/S0966-842X(98)01324-9
21. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet Parasitol. 2012;190(1-2): 268-271. doi:10.1016/j.vetpar.2012.05.006
22. Pennisi MG, Persichetti MF. Feline leishmaniasis: Is the cat a small dog? Vet Parasitol. 2018;251: 131-137. doi:10.1016/j.vetpar.2018.01.012
23. Mhadhbi M, Sassi A. Infection of the equine population by *Leishmania* parasites. Equine Vet J. 2020;52(1): 28-33. doi:10.1111/evj.13178
24. Mule SN, Saad JS, Fernandes LR, Stolf BS, Cortez M, Palmisano G. Protein glycosylation in: *Leishmania* spp. Mol Omics. 2020;16(5): 407-424. doi:10.1039/d0mo00043d
25. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. Immunobiology. 2008;213(3-4): 183-91. doi:10.1016/j.imbio.2007.11.010
26. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? Trends Microbiol. 2003;11(5): 210-4. doi:10.1016/S0966-842X(03)00075-1
27. Kupani M, Pandey RK, Mehrotra S. Neutrophils and visceral leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. J Cell Physiol. 2021;236(4): 2255–2267. doi:10.1002/jcp.30029
28. Chaves MM, Lee SH, Kamenyeva O, Ghosh K, Peters NC, Sacks D. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. PLoS Pathog. 2020;16(11): e1008674. doi:10.1371/journal.ppat.1008674
29. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. Trends Parasitol. 2016;32(5): 392-401. doi: 10.1016/j.pt.2016.02.003
30. Barak E, Amin-Spector S, Gerliak E, Goyard S, Holland N, Zilberstein D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: Analysis of signal perception and response. Mol Biochem Parasitol. 2005;141(1): 99-108. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.02.004
31. Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Pérez-Pertejo Y, Iborra S, Balaña-Fouce R, Reguera RM. Bioluminescent imaging identifies thymus, as overlooked colonized organ, in a chronic model of *Leishmania donovani* mouse visceral leishmaniasis. ACS Infect Dis. 2021;7(4): 871-883. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00864
32. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunol Cell Biol. 2007;85(2): 138-147. doi:10.1038/sj.icb7100011
33. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and

- transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 2002;124(Pt 5): 495-507. doi: 10.1017/S0031182002001439
34. Serafim TD, Coutinho-Abreu I V., Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol*. 2018;3(5): 548-555. doi:10.1038/s41564-018-0125-7
 35. Telleria EL, Martins-Da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Cseko YM. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*. 2018;145(10): 1336-1353. doi:10.1017/S0031182018001014
 36. Volf P, Myskova J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*. 2007;23(3): 91-92. doi:10.1016/j.pt.2006.12.010
 37. Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull*; 2006;75-76: 115-130. doi:10.1093/bmb/ldl003
 38. González U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID, et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*; 2015;2015(8): CD008736. doi:10.1002/14651858.CD008736.pub2
 39. Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2012;34(12): 551-561. doi:10.1111/pim.12007
 40. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. 2019. doi:10.37774/9789275320631
 41. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*; 2012;7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
 42. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151): 951-970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
 43. World Health Organization (WHO). SEA-CD-239 Distribution: General regional strategic framework for elimination of kala-azar from the South-East Asia region (2011-2015) Regional Office for South-East Asia. 2012.
 44. Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Holcomb EA, Cipriano N, Cox B, Satoskar AR. Mechanisms of immunopathogenesis in cutaneous leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11: 685296. doi:10.3389/fcimb.2021.685296
 45. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2007;25(2): 203-211. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.05.008
 46. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1): 82. doi:10.1186/s13071-017-2028-5
 47. Kariyawasam UL, Selvapandiyan A, Rai K, Wani TH, Ahuja K, Beg MA, et al. Genetic diversity of *Leishmania donovani* that causes cutaneous leishmaniasis in Sri Lanka: A cross sectional study with regional comparisons. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1): 791. doi:10.1186/s12879-017-2883-x
 48. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 2000;165(2): 969-977. doi:10.4049/jimmunol.165.2.969
 49. Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarêncio J, Barral-Netto M, Barral A. Cellular analysis

- of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: Insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5): 854-859. doi:10.4269/ajtmh.2007.77.854
50. Normohamadpur P, Ghaedi F. An atypical presentation of disseminated mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Iran. *Iran J Parasitol.* 2018;13: 156-160.
 51. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr.* 2021;S0001-7310(21)00108-3. doi:10.1016/j.ad.2021.02.008
 52. Blum J, Lockwood DNJ, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, et al. Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Re-evaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis. *Int Health.* 2012;4(3): 153-163. doi:10.1016/j.inhe.2012.06.004
 53. Sarmiento VA, Falcão GGVSC, Lins-Kusterer L, Leite-Ribeiro PM. Orofacial manifestations of mucocutaneous leishmaniasis: A case series from Brazil. *F1000Res.* 2020;8:756. doi:10.12688/f1000research.19056.4
 54. Calvopina M, Armijos RX, Marco JD, Uezato H, Kato H, Gomez EA, et al. *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. *BMC Infect Dis.* 2006;6: 139. doi:10.1186/1471-2334-6-139
 55. Hotez PJ. The rise of leishmaniasis in the twenty-first century. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018;112(9): 421-422. doi:10.1093/trstmh/try075
 56. Cota GF, De Sousa MR, Fereguetti TO, Saleme PS, Alvarisa TK, Rabello A. The cure rate after placebo or no therapy in American cutaneous leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2016;11(2): e0149697. doi:10.1371/journal.pone.0149697
 57. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(1): 79-99. doi:10.1016/j.idc.2018.10.005
 58. Sundar S, Singh OP. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Mol Diagn Ther.* 2018;22(4): 443-457. doi:10.1007/s40291-018-0343-y
 59. Sangenis LHC, Lima SR de A, de Mello CX, Cardoso DT, Mello JN, do Espírito Santo MCC, et al. Expansão da Leishmaniose Visceral no estado do Rio de Janeiro, Brasil: Relato do primeiro caso autóctone no município de Volta Redonda e a dificuldade de diagnóstico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56(3): 271-274. doi:10.1590/S0036-46652014000300015
 60. Ghimire PG, Ghimire P, Adhikari J, Chapagain A. A case report of visceral leishmaniasis and malaria co-infection with pancytopenia and splenomegaly- A diagnostic challenge. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1): 849. doi:10.1186/s12879-019-4478-1
 61. Islam S, Bhuiyan MAA, Bern C. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in Mymensingh, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(2): 193-194. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0128
 62. Engwerda CR, Kaye PM. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today.* 2000;21(2): 73-78. doi:10.1016/S0167-5699(99)01549-2
 63. Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El Hassan IM, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(2): 87-98. doi:10.1016/S1473-3099(03)00517-6
 64. World Health Organization (WHO). Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. ISBN: 978-92-4-002707-7
 65. Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Ortiz Genovese G, Milani B, et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2012;17(4): 493-510. doi:10.1517/14728214.2012.748036
 66. Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CHV. Leishmaniasis-HIV coinfection: Current challenges. *HIV AIDS.* 2016;8: 147-156. doi:10.2147/HIV.S93789

67. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. *HIV AIDS*. 2018;10: 193-201. doi:10.2147/HIV.S143929
68. Miró G, López-Vélez R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Vet Parasitol*. 2018;254: 151-159. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.002
69. Martín-Sánchez J, Rodríguez-Granger J, Morillas-Márquez F, Merino-Espinosa G, Sampedro A, Aliaga L, et al. Leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Integration of human, animal and environmental data through a One Health approach. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67(6): 2423-2434. doi:10.1111/tbed.13580
70. Aguado M, Espinosa P, Romero-Maté A, Tardío JC, Córdoba S, Borbujo J. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(4): 334-342. doi:10.1016/j.adengl.2013.03.005
71. Galán-Puchades MT, Gómez-Samblás M, Suárez-Morán JM, Osuna A, Sanxis-Furió J, Pascual J, et al. Leishmaniasis in Norway rats in Sewers, Barcelona, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(6): 1222-1224. doi:10.3201/eid2506.181027
72. Desjeux P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 1996;14(5): 417-423. doi:10.1016/0738-081X(96)00057-0
73. Elnaiem DEA. Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *J Vector Ecol*. 2011;36 Suppl 1: S23-31. doi:10.1111/j.1948-7134.2011.00109.x
74. Saghafipour A, Vatandoost H, Zahraei-Ramazani AR, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Jooshin MK, et al. Control of zoonotic cutaneous leishmaniasis vector, *Phlebotomus papatasi*, using attractive toxic sugar baits (ATSB). *PLoS One*. 2017;12(4): e0173558. doi:10.1371/journal.pone.0173558
75. Selvapandiyan A, Croft SL, Rijal S, Nakhasi HL, Ganguly NK. Innovations for the elimination and control of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(9): e0007616. doi:10.1371/journal.pntd.0007616
76. Zijlstra EE, Alves F, Rijal S, Arana B, Alvar J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Indian subcontinent: A threat to the South-East Asia Region Kala-azar Elimination Programme. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11): e0005877. doi:10.1371/journal.pntd.0005877
77. World Health Organization (WHO). Regional strategic framework for elimination of kala-azar from the South-East Asia Region. 2005.
78. Dinesh DS, Das ML, Picado A, Roy L, Rijal S, Singh SP, et al. Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* in visceral leishmaniasis endemic districts in India and Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10): e859. doi:10.1371/journal.pntd.0000859
79. Picado A, Dash AP, Bhattacharya S, Boelaert M. Vector control interventions for Visceral Leishmaniasis elimination initiative in South Asia, 2005-2010. *Indian J Med Res*. 2012;136(1): 22–31.
80. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: New approaches to disease control. *BMJ*. 2003;326(7385): 377-382. doi:10.1136/bmj.326.7385.377
81. Beier JC, Müller GC, Gu W, Arheart KL, Schlein Y. Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles* malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. *Malar J*. 2012;11: 31. doi:10.1186/1475-2875-11-31
82. Müller GC, Schlein Y. Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. *J Vector Ecol*. 2011;36 Supple 1: S64-70. doi:10.1111/j.1948-7134.2011.00113.x

83. Qualls WA, Müller GC, Revay EE, Allan SA, Arheart KL, Beier JC, et al. Evaluation of attractive toxic sugar bait (ATSB)-Barrier for control of vector and nuisance mosquitoes and its effect on non-target organisms in sub-tropical environments in Florida. *Acta Trop.* 2014;131: 104-110. doi:10.1016/j.actatropica.2013.12.004
84. World Health Organization (WHO). Global strategic framework for integrated vector management. 2004.
85. Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, et al. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(12): 1–4. doi:10.3201/eid2512.190164
86. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136(14): 1915-1934. doi:10.1017/S0031182009991156
87. Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(2): 125-130. doi:10.4269/ajtmh.1996.55.125
88. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 2017;12: 25-40. doi:10.2147/DDDT.S146521
89. Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods.* 2015;422: 1-12. doi:10.1016/j.jim.2015.03.017
90. Reed SG, Coler RN, Campos-Neto A. Development of a Leishmaniasis vaccine: The importance of MPL. *Expert Rev Vaccines.* 2003;2(2): 239-252. doi:10.1586/14760584.2.2.239
91. Ali N, Nakhasi HL, Valenzuela JG, Reis AB. Targeted immunology for prevention and cure of VL. *Front Immunol.* 2014;5: 660. doi:10.3389/fimmu.2014.00660
92. Moll H, Berberich C. Dendritic cell-based vaccination strategies: Induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology.* 2001;204(5): 659-666. doi:10.1078/0171-2985-00105
93. Araújo MSS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Magalhães CP, Carvalho AT, Andrade MC, et al. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;141(1-2): 64-75. doi:10.1016/j.vetimm.2011.02.007
94. Taslimi Y, Zahedifard F, Rafati S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology.* 2018;145(4): 497-507. pp. 497–507. doi:10.1017/S003118201600216X
95. Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(21): 8965-8977. doi:10.1007/s00253-020-10856-w
96. Choudhury R, Das P, De T, Chakraborti T. 115kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN- γ induced down-regulation of TNF- α mediated MMP-9 activity. *Immunobiology.* 2013;218(1): 114-126. doi:10.1016/j.imbio.2012.02.008
97. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 2008;26(14): 1709-1724. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.023
98. Mahdavi M, Ebtekar M, Khorram Khorshid HR, Azadmanesh K, Hartoonian C, Hassan ZM. ELISPOT analysis of a new CTL based DNA vaccine for HIV-1 using GM-CSF in DNA prime/peptide boost strategy: GM-CSF induced long-lived memory responses. *Immunol Lett.* 2011;140(1-2): 14–20. doi:10.1016/j.imlet.2011.05.005
99. Osman M, Mistry A, Keding A, Gabe R, Cook E, Forrester S, et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(5): e0005527.

- doi:10.1371/journal.pntd.0005527
100. Moafi M, Sherkat R, Taleban R, Rezvan H. *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of literature. *Int J of Prev Med*. 2019;10: 95. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18
 101. Teixeira MCA, de Sá Oliveira GG, Santos POM, Bahiense TC, da Silva VMG, Rodrigues MS, et al. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(2): 182-189. doi:10.1590/S0074-02762011000200011
 102. De Luca PM, Macedo ABB. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Front Immunol*. 2016;7: 151. doi:10.3389/fimmu.2016.00151
 103. Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. *Prev Vet Med*. 2014;117(1): 7-18. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.06.015
 104. Starita C, Gavazza A, Lubas G. Hematological, biochemical, and serological findings in healthy canine blood donors after the administration of CaniLeish[®] vaccine. *Vet Med Int*. 2016;2016: 4601893. doi:10.1155/2016/4601893
 105. Daneshvar H, Coombs GH, Hagan P, Phillips RS. *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: Attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. *J Infect Dis*. 2003;187(10): 1662-1668. doi:10.1086/374783
 106. Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, Ashman JA, et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2011;29(19): 3531-3537. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.096
 107. NCT01011309. A Study of the Efficacy and Safety of the LEISH-F2 + MPL-SE vaccine for treatment of cutaneous leishmaniasis. In: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309>. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2011
 108. Christiaansen AF, Dixit UG, Coler RN, Marie Beckmann A, Reed SG, Winokur PL, et al. CD11a and CD49d enhance the detection of antigen-specific T cells following human vaccination. *Vaccine*. 2017;35(33): 4255-4261. doi:10.1016/j.vaccine.2017.06.013
 109. Regina-Silva S, Feres AMLT, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM, et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*. 2016;34(19): 2233-2239. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.019
 110. Coler RN, Duthie MS, Hofmeyer KA, Guderian J, Jayashankar L, Vergara J, et al. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clin Transl Immunol*. 2015;4(4): e35. doi:10.1038/cti.2015.6
 111. Gutiérrez V, Seabra AB, Reguera RM, Khandare J, Calderón M. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. *Chem Soc Rev* 2016;45(1): 152-168. doi:10.1039/c5cs00674k
 112. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009;14(7): 2317-2336. doi:10.3390/molecules14072317
 113. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496): 1561-1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
 114. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(2): 237-252. doi:10.1517/14656566.2015.973850
 115. Barbosa Gomes de Carvalho YM, Shanmugam S, Batista MS, Serafini MR, Araújo AADS,

- Quintans Júnior LJ. Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape. *Expert Opin Ther Pat.* 2020;30(8): 633-641. doi:10.1080/13543776.2020.1789100
116. de Oliveira ALL, Brustoloni YM, Fernandes TD, Dorval MEC, da Cunha RV, Bóia MN. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: A report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Trop Doct.* 2009;39(3): 180-182. doi:10.1258/td.2008.080369
 117. Chappuis F, Alirol E, Worku DT, Mueller Y, Ritmeijer K. High mortality among older patients treated with pentavalent antimonials for visceral leishmaniasis in East Africa and rationale for switch to liposomal amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1): 455-456. doi:10.1128/AAC.01298-10
 118. Mueller Y, Mbulamberi DB, Odermatt P, Hoffmann A, Loutan L, Chappuis F. Risk factors for in-hospital mortality of visceral leishmaniasis patients in eastern Uganda. *Trop Med Int Heal.* 2009;14(8): 910-917. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02305.x
 119. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Rabello A. Efficacy of anti-*Leishmania* therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: A systematic review with indirect comparison. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5): e2195. doi:10.1371/journal.pntd.0002195
 120. Uzun S, Durdu M, Culha G, Allahverdiyev AM, Memisoglu HR. Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: Recent experience in Turkey. *J Parasitol.* 2004;90(4): 853-859. doi:10.1645/GE-185R
 121. Arboleda M, Barrantes S, Úsuga LY, Robledo SM. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate: A case series. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019;52: e20180211. doi:10.1590/0037-8682-0211-2018
 122. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels R. Low-dose liposomal amphotericin B in refractory Indian visceral leishmaniasis: A multicenter study. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2): 143-146. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.143
 123. Warnock DW. Amphotericin B: An introduction. *J Antimicrob Chemother.* 1991;28 Suppl B: 27-38. doi:10.1093/jac/28.suppl_b.27
 124. Sundar S, Singh B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Ther Targets.* 2018;22(6): 467-486. doi:10.1080/14728222.2018.1472241
 125. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(7): 2234-2239. doi:10.1073/pnas.1117280109
 126. Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol.* 2014;4(1): 4-9. doi:10.4103/2229-5070.129142
 127. Sundar S, Chakravarty J, Rai VK, Agrawal N, Singh SP, Chauhan V, et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: Response to 15 daily versus alternate-day infusions. *Clin Infect Dis.* 2007;45(5): 556-561. doi:10.1086/520665
 128. Sundar S, Singh A, Singh OP. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. *J Trop Med.* 2014;2014: 646932. doi:10.1155/2014/646932
 129. Pandey BD, Pun SB, Kaneko O, Pandey K, Hirayama K. Case report: Expansion of visceral leishmaniasis to the western hilly part of Nepal. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(1): 107-108. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0291
 130. Soto J, Arana BA, Tolado J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9): 1266-1272. doi:10.1086/383321
 131. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de vries PJ. Miltefosine: A review of its

- pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11): 2576-2597. doi:10.1093/jac/dks275
132. Pinto-Martinez AK, Rodriguez-Durán J, Serrano-Martin X, Hernandez-Rodriguez V, Benaim G. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca^{2+} channel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(1): e01614-17. doi:10.1128/AAC.01614-17
 133. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4): 1425-1430. doi:10.1128/AAC.01123-06
 134. Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4): 1327-1332. doi:10.1128/AAC.01415-06
 135. Kip AE, Schellens JHM, Beijnen JH, Dorlo TPC. Clinical pharmacokinetics of systemically administered antileishmanial drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2018;57(2): 151-176. doi:10.1007/s40262-017-0570-0
 136. Srivastava S, Mishra J, Gupta AK, Singh A, Shankar P, Singh S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasit Vectors.* 2017;10(1): 1-11. doi:10.1186/s13071-017-1969-z
 137. Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4): 543-550. doi:10.1093/cid/cis474
 138. Prajapati VK, Mehrotra S, Gautam S, Rai M, Sundar S. *In vitro* antileishmanial drug susceptibility of clinical isolates from patients with indian visceral Leishmaniasis - Status of newly introduced drugs. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(4): 655-657. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0022
 139. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira R V., Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 2011;118(2): 87-96. doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.007
 140. Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2019;20(10): 1251-1265. doi:10.1080/14656566.2019.1609940
 141. Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(7): 653-660. doi:10.1016/j.trstmh.2008.09.008
 142. Sinha PK, Jha TK, Thakur CP, Nath D, Mukherjee S, Aditya AK, et al. Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *J Trop Med.* 2011;2011: 645203. doi:10.1155/2011/645203
 143. Hailu A, Musa A, Wasunna M, Balasegaram M, Yifru S, Mengistu G, et al. Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: A multicentre, open-label, randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(10): e709. doi:10.1371/journal.pntd.0000709
 144. Pearson RD, Hewlett EL. Pentamidine for the treatment of *Pneumocystis carinii pneumonia* and other protozoal diseases. *Ann Intern Med.* 1985;103(5): 782-786. doi:10.7326/0003-4819-103-5-782
 145. Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 1998;30(4): 435-443. doi:10.1016/S0306-3623(97)00268-1
 146. Charney W, Rose L, Quinlan P. Pentamidine. In: Charney W, editor. *Handbook of Modern Hospital Safety.* CRC Press; 2009. pp. 15-24.

147. Diro E, Edwards T, Ritmeijer K, Fikre H, Abongomera C, Kibret A, et al. Long term outcomes and prognostics of visceral leishmaniasis in HIV infected patients with use of pentamidine as secondary prophylaxis based on CD4 level: A prospective cohort study in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(2): E0007132 doi:10.1371/journal.pntd.0007132
148. Braga SS. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing. *Eur J Med Chem*. 2019;183: 111660. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111660
149. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: Potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;126(2): 129-142. doi:10.1016/S0166-6851(02)00280-3
150. Pandharkar T, Zhu X, Mathur R, Jiang J, Schmittgen TD, Shaha C, et al. Studies on the antileishmanial mechanism of action of the arylimidamide DB766: Azole interactions and role of CYP5122A1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8): 4682-4689. doi:10.1128/AAC.02405-14
151. Galvão EL, Rabello A, Cota GF. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(10): e0186117. doi:10.1371/journal.pone.0186117
152. Schwarz P, Cornely OA, Dannaoui E. Antifungal combinations in Mucorales: A microbiological perspective. *Mycoses*. 2019;62(9) 746-760. doi:10.1111/myc.12909
153. Biswas C, Sorrell TC, Djordjevic JT, Zuo X, Jolliffe KA, Chen SCA. *In vitro* activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(12): 2842-2846. doi:10.1093/jac/dkt282
154. Berman J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res*. 2006;123(3): 289–294.
155. Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med*. 2002;346(12): 891-895. doi:10.1056/nejmoa011882
156. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs*. 2013;73(17): 1863-1888. doi:10.1007/s40265-013-0133-0
157. Musa A, Khalil E, Hailu A, Olobo J, Balasegaram M, Omollo R, et al. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in east africa: A randomised controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6): e1674. doi:10.1371/journal.pntd.0001674
158. Hendrickx S, Van den Kerkhof M, Mabile D, Cos P, Delputte P, Maes L, et al. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5): e0005620. doi:10.1371/journal.pntd.0005620
159. Pan American Health Organization (PHAO), World Health Organization (WHO). Leishmaniasis in the Americas: treatment recommendation. 2015.
160. Caridha D, Vesely B, van Bocxlaer K, Arana B, Mowbray CE, Rafati S, et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist*. 2019;11: 106-117. doi:10.1016/j.ijpddr.2019.06.003
161. Gonçalves SVCB, Costa CHN. Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: An efficacy and safety study. *An Bras Dermatol*. 2018;93(3): 347-355. doi:10.1590/abd1806-4841.20186415

162. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(9): 581-596. doi:10.1016/S1473-3099(07)70209-8
163. Cardona-Arias JA, Darío Vélez I, López-Carvajal L. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis: A meta-analysis of controlled clinical trials. *PLoS One.* 2015;10(5): e122569. doi:10.1371/journal.pone.0122569
164. Valencia BM, Miller D, Witzig RS, Boggild AK, Llanos-Cuentas A. Novel low-cost thermotherapy for cutaneous leishmaniasis in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5): e2196. doi:10.1371/journal.pntd.0002196
165. Negera E, Gadisa E, Hussein J, Engers H, Kuru T, Gedamu L, et al. Treatment response of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania aethiopica* to cryotherapy and generic sodium stibogluconate from patients in Silti, Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(8): 496-503. doi:10.1016/j.trstmh.2012.02.006
166. Mosleh IM, Geith E, Natsheh L, Schönian G, Abotteen N, Kharabsheh S. Efficacy of a weekly cryotherapy regimen to treat *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(4): 617-624. doi:10.1016/j.jaad.2007.12.032
167. Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2005;21(11): 508-512. doi:10.1016/j.pt.2005.08.026
168. Sundar S, Murray HW. Effect of treatment with interferon- γ alone in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1995;172(6): 1627-1629. doi:10.1093/infdis/172.6.1627
169. Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, et al. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(4): 469-472. doi:10.1016/S0035-9203(03)90093-9
170. Mayrink W, De Carvalho Botelho AC, Magalhães PA, Batista SM, Lima A de O, Genaro O, et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(1): 14-21. doi:10.1590/S0037-86822006000100003
171. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve RD productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3): 203-214. doi:10.1038/nrd3078
172. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1): 41-58. doi:10.1038/nrd.2018.168
173. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8): 673-683. doi:10.1038/nrd1468
174. Balaña-Fouce R, Pérez Pertejo MY, Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Reguera RM. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today.* 2019;24(5): 1209-1216. doi:10.1016/j.drudis.2019.03.007
175. Bustamante C, Ochoa R, Asela C, Muskus C. Repurposing of known drugs for leishmaniasis treatment using bioinformatic predictions, *in vitro* validations and pharmacokinetic simulations. *J Comput Aided Mol Des.* 2019;33(9): 845-854. doi:10.1007/s10822-019-00230-y
176. Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, et al. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature.* 2009;462(7270): 175-181. doi:10.1038/nature08506
177. Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Dos Santos Faioes V, Martins TP, Silva RL, Leon LL, et al. Leishmaniasis treatment: Update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci.* 2018;23: 967-996. doi:10.2741/4629

178. Jain V, Jain K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today*. 2018;23(1): 161-170. doi:10.1016/j.drudis.2017.09.006
179. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(9): 727-730. doi:10.1038/nrd892
180. Lakhdar-Ghazal F, Blonski C, Willson M, Michels P, Perie J. Glycolysis and proteases as targets for the design of new anti-trypanosome drugs. *Curr Top Med Chem*. 2005;2(5): 439-456. doi:10.2174/1568026024607472
181. Jones NG, Catta-Preta CMC, Lima APCA, Mottram JC. Genetically validated drug targets in *Leishmania*: current knowledge and future prospects. *ACS Infect Dis*. 2018;4(4): 467-477. doi:10.1021/acsinfecdis.7b00244
182. Reguera RM, Elmahallawy EK, García-Estrada C, Carbajo-Andrés R, Balaña-Fouce R. DNA Topoisomerases of *Leishmania Parasites*; Druggable Targets for Drug Discovery. *Curr Med Chem*. 2018;26(32): 5900-5923. doi:10.2174/0929867325666180518074959
183. Balaña-Fouce R, Álvarez-Velilla R, Fernández-Prada C, García-Estrada C, Reguera RM. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014;4(3): 326-337. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.07.006
184. Balaña-Fouce R, Redondo CM, Pérez-Pertejo Y, Díaz-González R, Reguera RM. Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I. *Drug Discov Today*. 2006;11(15-16): 733-740. doi:10.1016/j.drudis.2006.06.014
185. Franklin RE, Gosling RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*. 1953;171(4356): 740-741. doi:10.1038/171740a0
186. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356): 737-738. doi:10.1038/171737a0
187. Travers A, Muskhelishvili G. DNA structure and function. *FEBS J*. 2015;282(12): 2279-2295. doi:10.1111/febs.13307
188. Vologodskii A V., Levene SD, Klenin K V., Frank-Kamenetskii M, Cozzarelli NR. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J Mol Biol*. 1992;227(4): 1224-1243. doi:10.1016/0022-2836(92)90533-P
189. Fuller FB. Decomposition of the linking number of a closed ribbon: A problem from molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(8): 3557-3561. doi:10.1073/pnas.75.8.3557
190. Seol Y, Neuman KC. The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology. *Biophys Rev*. 2016;8(Suppl 1): 101-111. doi:10.1007/s12551-016-0240-8
191. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(6): 430-440. doi:10.1038/nrm831
192. Champoux JJ. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2001;70: 369-413. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.369
193. Champoux JJ, Dulbecco R. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(1): 143-146. doi:10.1073/pnas.69.1.143
194. Wang JC. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω . *J Mol Biol*. 1971;55(3): 523-533. doi:10.1016/0022-2836(71)90334-2
195. Bush NG, Evans-roberts K, Maxwell A. Macromolecules DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus*. 2015;6(2): 1-34. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014

196. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010;17(5): 421-433. doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012
197. McKie SJ, Maxwell A, Neuman KC. Mapping DNA topoisomerase binding and cleavage genome wide using next-generation sequencing techniques. *Genes (Basel).* 2020;11(1): 92. doi:10.3390/genes11010092
198. Piskadlo E, Oliveira RA. A topology-centric view on mitotic chromosome architecture. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12): 2751. doi:10.3390/ijms18122751
199. Capranico G, Zagotto G, Palumbo M. Development of DNA topoisomerase-related therapeutics: A short perspective of new challenges. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2004;4(4): 335-345. doi:10.2174/1568011043352885
200. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(19): 789-802. doi:10.1038/nrc1977
201. Baglini E, Salerno S, Barresi E, Robello M, Da Settimo F, Taliani S, et al. Multiple Topoisomerase I (TopoI), Topoisomerase II (TopoII) and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (TDP) inhibitors in the development of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2021;156: 105594. doi:10.1016/j.ejps.2020.105594
202. Sriram D, Yogeewari P, Thirumurugan R, Ratan Bal T. Camptothecin and its analogues: A review on their chemotherapeutic potential. *Nat Prod Res.* 2005;19(4): 393-412. doi:10.1080/14786410412331299005
203. Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *Lancet.* 2003;361(9176): 2235-2242. doi:10.1016/S0140-6736(03)13780-4
204. Adams DJ. The impact of tumor physiology on camptothecin-based drug development. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005;5(1): 1-13. doi:10.2174/1568011053352596
205. Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: A review of the *in vivo* literature. *Mol Pharm.* 2010;7(2): 307-349. doi:10.1021/mp900243b
206. Zou J, Li S, Chen Z, Lu Z, Gao J, Zou J, et al. A novel oral camptothecin analog, gimatecan, exhibits superior antitumor efficacy than irinotecan toward esophageal squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death Dis.* 2018;9(6): 661. doi:10.1038/s41419-018-0700-0
207. Khaiwa N, Maarouf NR, Darwish MH, Alhamad DWM, Sebastian A, Hamad M, et al. Camptothecin's journey from discovery to WHO Essential Medicine: Fifty years of promise. *Eur J Med Chem.* 2021/223: 113639. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113639
208. Xiao Z, Zhuang B, Zhang G, Li M, Jin Y. Pulmonary delivery of cationic liposomal hydroxycamptothecin and 5-aminolevulinic acid for chemo-sonodynamic therapy of metastatic lung cancer. *Int J Pharm.* 2021;601: 120572. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120572
209. Villa H, Marcos ARO, Reguera RM, Balaña-Fouce R, García-Estrada C, Pérez-Pertejo Y, et al. A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2003;278(6): 3521-3526. doi:10.1074/jbc.M203991200
210. Bodley AL, Chakraborty AK, Xie S, Burri C, Shapiro TA. An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13): 7539-7544. doi:10.1073/pnas.1330762100
211. Brata Das B, Sen N, Ganguly A, Majumder HK. Reconstitution and functional characterization of the unusual bi-subunit type I DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*. *FEBS Lett.* 2004;565(1-3): 81-88. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.078
212. Reguera RM, Redondo CM, Gutierrez de Prado R, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R. DNA

- topoisomerase I from parasitic protozoa: A potential target for chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1759(3-4): 117-131. doi:10.1016/j.bbaexp.2006.03.006
213. Nyamuswa G, Silber R. Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40DNA replication system. *Cancer Res*. 1993;53(24): 5908–5914.
214. Pommier Y, Sun Y, Huang SYN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(11): 703-721. doi:10.1038/nrm.2016.111
215. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(17): 5678-5694. doi:10.1093/nar/gkn550
216. Singh N, Basnet H, Wiltshire TD, Mohammad DH, Thompson JR, Héroux A, et al. Dual recognition of phosphoserine and phosphotyrosine in histone variant H2A.X by DNA damage response protein MCPH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(36): 14381-14386. doi:10.1073/pnas.1212366109
217. Rothkamm K, Löbrich M. Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (review). *International journal of oncology*. 2002;21(2): 433–440. doi:10.3892/ijo.21.2.433
218. Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry A*. 2004;58(2): 99-110. doi:10.1002/cyto.a.20018
219. Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Wang B, Liu Q, et al. Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J Biochem*. 2014;156(2): 85-95. doi:10.1093/jb/mvu021
220. Alsford S, Horn D. Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol*. 2004;53(2): 365-372. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04151.x
221. Patel AG, Flatten KS, Peterson KL, Beito TG, Schneider PA, Perkins AL, et al. Immunodetection of human topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(6): 2816-2826. doi:10.1093/nar/gkw109
222. Barroso SI, Aguilera A. Detection of DNA double-strand breaks by γ -H2AX immunodetection. *Methods Mol Biol*. 2021;2153: 1–8. doi:10.1007/978-1-0716-0644-5_1
223. Gutiérrez-Corbo C, Álvarez-Velilla R, Reguera RM, García-Estrada C, Cushman M, Balaña-Fouce R, et al. Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2019;11: 39-48. doi:10.1016/j.ijpddr.2019.09.005
224. Glover L, Horn D. Trypanosomal histone γ H2A and the DNA damage response. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;183(1): 78-83. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.01.008
225. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009;3(1): 16-20. doi:10.1021/nn900002m
226. Khalil N, de Mattos A, Moraes Moreira Carraro T, Ludwig D, Mainardes R. Nanotechnological strategies for the treatment of neglected diseases. *Curr Pharm Des*. 2013;19(41): 7316-7329. doi:10.2174/138161281941131219135458
227. Maesaki S. Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents. *Curr Pharm Des*. 2005;8(6): 433-440. doi:10.2174/1381612023395916
228. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm*

- Res. 2006;23(7): 1417-1450. doi:10.1007/s11095-006-0284-8
229. Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011;156(2): 128-145. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.002
230. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*. 1999;112(18): 2993–3002. doi:10.1242/jcs.112.18.2993
231. Ndjamen B, Kang BH, Hatsuzawa K, Kima PE. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell’s endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. *Cell Microbiol*. 2010;12(10): 1480-1494. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01483.x
232. Young J, Kima PE. The *Leishmania* parasitophorous vacuole membrane at the parasite-host interface. *Yale J Biol Med*. 2019;92(3): 511–521.
233. Canton J, Kima PE. Interactions of pathogen-containing compartments with the secretory pathway. *Cell Microbiol*. 2012;14(11): 1676-1686. doi:10.1111/cmi.12000
234. Dermine JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2000;2(2): 115-126. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00037.x
235. Lodge R, Descoteaux A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *Eur J Immunol*. 2006;36(10): 2735-2744. doi:10.1002/eji.200636089
236. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1997;185(12): 2061-2068. doi:10.1084/jem.185.12.2061
237. Duclos S, Desjardins M. Subversion of a young phagosome: The survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol*. 2000;2(5): 365-377. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00066.x
238. Naderer T, Heng J, Saunders EC, Kloehn J, Rupasinghe TW, Brown TJ, et al. Intracellular survival of *Leishmania major* depends on uptake and degradation of extracellular matrix glycosaminoglycans by macrophages. *PLoS Pathog*. 2015;11(9): e1005136. doi:10.1371/journal.ppat.1005136
239. Goldman-Pinkovich A, Balno C, Strasser R, Zeituni-Molad M, Bendelak K, Rentsch D, et al. An arginine deprivation response pathway is induced in *Leishmania* during macrophage invasion. *PLoS Pathog*. 2016;12(4): e1005494. doi:10.1371/journal.ppat.1005494
240. Moradin N, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2: 121. doi:10.3389/fcimb.2012.00121
241. Real F, Mortara RA. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2): e1518. doi:10.1371/journal.pntd.0001518
242. Saleem K, Khursheed Z, Hano C, Anjum I, Anjum S. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: A focus on recent advances and challenges. *Nanomaterials*. 2019;9(12): 1749. doi:10.3390/nano9121749
243. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today*. 2015;10(4): 487-510. doi:10.1016/j.nantod.2015.06.006
244. Momeni A, Rasoolian M, Momeni A, Navaei A, Emami S, Shaker Z, et al. Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Liposome Res*. 2013;23(2): 134-144. doi:10.3109/08982104.2012.762519

245. Ortega V, Giorgio S, de Paula E. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. *J Liposome Res.* 2017;27(3): 234-248. doi:10.1080/08982104.2017.1376682
246. Ickenstein LM, Garidel P. Lipid-based nanoparticle formulations for small molecules and RNA drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019;16(11): 1205-1226. doi:10.1080/17425247.2019.1669558
247. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics.* 2017;9(2): 12. doi:10.3390/pharmaceutics9020012
248. New RRC, Chance ML, Heath S. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J Antimicrob Chemother.* 1981;8(5): 371-381. doi:10.1093/jac/8.5.371
249. Szoka FC, Milholland D, Barza M. Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and *in vitro* fungicidal activity of liposome-intercalated amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(3): 421-429. doi:10.1128/AAC.31.3.421
250. Vyas SP, Gupta S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(4): 417-432. doi:10.2147/nano.2006.1.4.417
251. Roychoudhury J, Sinha R, Ali N. Therapy with sodium stibogluconate in stearylamine-bearing liposomes confers cure against SSG-resistant *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One.* 2011;6(3): e17376. doi:10.1371/journal.pone.0017376
252. Gasco MR, Gallarate M, Pattarino F. *In vitro* permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. *Int J Pharm.* 1991;69(3): 193-196. doi:10.1016/0378-5173(91)90361-Q
253. de Souza A, Marins DSS, Mathias SL, Monteiro LM, Yukuyama MN, Scarim CB, et al. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. *Int J Pharm.* 2018;547(1-2): 421-431. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.018
254. Kansal S, Tandon R, Dwivedi P, Misra P, Verma PRP, Dube A, et al. Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: A system for intervention in visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11): 2650-2660. doi:10.1093/jac/dks286
255. Singodia D, Verma A, Verma RK, Mishra PR. Investigations into an alternate approach to target mannose receptors on macrophages using 4-sulfated N-acetyl galactosamine more efficiently in comparison with mannose-decorated liposomes: An application in drug delivery. *Nanomedicine.* 2012;8(4): 468-477. doi:10.1016/j.nano.2011.07.002
256. Pham TTH, Loiseau PM, Barratt G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *Int J Pharm.* 2013;454(1): 539-552. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.035
257. Meheus F, Balasegaram M, Olliaro P, Sundar S, Rijal S, Faiz MA, et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(9): e818. doi:10.1371/journal.pntd.0000818
258. Asthana S, Jaiswal AK, Gupta PK, Pawar VK, Dube A, Chourasia MK. Immunoadjuvant chemotherapy of visceral leishmaniasis in hamsters using amphotericin B-encapsulated nanoemulsion template-based chitosan nanocapsules. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4): 1714-1722. doi:10.1128/AAC.01984-12
259. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2005;3: 6. doi:10.1186/1477-3155-3-6
260. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomedicine.* 2011;6: 2705-2714. doi:10.2147/ijn.s23883

261. Jebali A, Kazemi B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. *Toxicol in Vitro*. 2013;27(6): 1896-1904. doi:10.1016/j.tiv.2013.06.002
262. Mohebbali M, Rezayat MM, Gilani K, Sarkar S, Akhoundi B, Esmaeili J, et al. Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): An *in vitro* and *in vivo* study. *Daru*. 2009;17: 285–289.
263. Varshosaz J, Arbabi B, Pestehchian N, Saberi S, Delavari M. Chitosan-titanium dioxide-glucantime nanoassemblies effects on promastigote and amastigote of *Leishmania major*. *Int J Biol Macromol*. 2018;107(Pt A): 212-221. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.177
264. Kalangi SK, Dayakar A, Gangappa D, Sathyavathi R, Maurya RS, Narayana Rao D. Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments the antileishmanial efficacy of miltefosine. *Exp Parasitol*. 2016;170: 184-192. doi:10.1016/j.exppara.2016.09.002
265. Moquin A, Hanna R, Liang T, Erguven H, Gran ER, Arndtsen BA, et al. PEG-conjugated pyrrole-based polymers: One-pot multicomponent synthesis and self-assembly into soft nanoparticles for drug delivery. *Chem Commun*. 2019;55(66): 9829-9832. doi:10.1039/c9cc04000e
266. Khandare J, Mohr A, Calderón M, Welker P, Licha K, Haag R. Structure-biocompatibility relationship of dendritic polyglycerol derivatives. *Biomaterials*. 2010;31(15): 4268-4277. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.001
267. Calderón M, Quadir MA, Strumia M, Haag R. Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers. *Biochimie*. 2010;92(9): 1242-1251. doi:10.1016/j.biochi.2010.02.017
268. Khandare J, Calderón M, Dagia NM, Haag R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: Opportunities and challenges. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7): 2824-2848. doi:10.1039/c1cs15242d
269. Costa Lima SA, Silvestre R, Barros D, Cunha J, Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, et al. Crucial CD8+ T-lymphocyte cytotoxic role in amphotericin B nanospheres efficacy against experimental visceral leishmaniasis. *Nanomedicine*. 2014;10(5): 1021-1030. doi:10.1016/j.nano.2013.12.013
270. Barros D, Lima SAC, Cordeiro-Da-Silva A. Surface functionalization of polymeric nanospheres modulates macrophage activation: Relevance in leishmaniasis therapy. *Nanomedicine*. 2015;10(3): 387-403. doi:10.2217/nmm.14.116
271. Kumar R, Sahoo GC, Pandey K, Das V, Das P. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. *Drug Deliv*. 2015;22(3): 383-388. doi:10.3109/10717544.2014.891271
272. D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(9): 1257-1275. doi:10.1080/17425247.2016.1182485
273. Franch O, Gutiérrez-Corbo C, Domínguez-Asenjo B, Boesen T, Jensen PB, Nejsum LN, et al. DNA flowerstructure co-localizes with human pathogens in infected macrophages. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(11): 6081-6091. doi:10.1093/NAR/GKAA341
274. Kleiman M, Tannenbaum E. Diploidy and the selective advantage for sexual reproduction in unicellular organisms. *Theory Biosci*. 2009;128(4): 249-285. doi:10.1007/s12064-009-0077-9
275. Williams GC. Sex and Evolution. *Monogr Popul Biol*. 1975;(8): 3-200.
276. Maynard Smith J. The evolution of sex. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1978

277. Lively CM, Morran LT. The ecology of sexual reproduction. *J Evol Biol.* 2014;27(7): 1292-1303. doi:10.1111/jeb.12354
278. Neiman M, Lively CM, Meirmans S. Why Sex? A Pluralist Approach Revisited. *Trends Ecol Evol.* 2017;32(8): 589-600. doi:10.1016/j.tree.2017.05.004
279. West SA, Lively CM, Read AF. A pluralist approach to sex and recombination. *J Evol Biol.* 1999;12(6): 1003–1012. doi:10.1046/j.1420-9101.1999.00119.x
280. Van Valen L. A new evolutionary law. *Evol theory.* 1973;1: 1–30.
281. Birky CW. *Giardia* Sex? Yes, but how and how much? *Trends Parasitol.* 2010;26(2): 70-74. doi:10.1016/j.pt.2009.11.007
282. Hartfield M, Keightley PD. Current hypotheses for the evolution of sex and recombination. *Integr Zool.* 2012;7(2): 192-209. doi:10.1111/j.1749-4877.2012.00284.x
283. Lloyd DG. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *Am Nat.* 1979;113(1): 67–79. doi:10.1086/283365
284. Charlesworth B. The cost of sex in relation to mating system. *J Theor Biol.* 1980;84(4): 655-671. doi:10.1016/S0022-5193(80)80026-9
285. Maynard Smith J. What use is sex? *J Theor Biol.* 1971;30(2): 319-335. doi:10.1016/0022-5193(71)90058-0
286. Salathé M, Kouyos RD, Bonhoeffer S. The state of affairs in the kingdom of the Red Queen. *Trends Ecol Evol.* 2008;23(8): 439-445. doi:10.1016/j.tree.2008.04.010
287. Lehtonen J, Jennions MD, Kokko H. The many costs of sex. *Trends Ecol Evol.* 2012;27(3): 172-178. doi:10.1016/j.tree.2011.09.016
288. Weedall GD, Hall N. Sexual reproduction and genetic exchange in parasitic protists. *Parasitology.* 2015;142 Suppl 1: S120–S127. doi:10.1017/S0031182014001693
289. Jaenke J. A hypothesis to account for the maintenance of sex within populations. *Evol Theory.* 1978;94: 191–194.
290. Barton NH. Linkage and the limits to natural selection. *Genetics.* 1995;140(2): 821–841. doi:10.1093/genetics/140.2.821
291. Otto SP, Barton NH. The evolution of recombination: Removing the limits to natural selection. *Genetics.* 1997;147(2): 879–906. doi:10.1093/genetics/147.2.879
292. Roze D, Barton NH. The Hill-Robertson effect and the evolution of recombination. *Genetics.* 2006;173(3): 1793-1811. doi:10.1534/genetics.106.058586
293. Muller HJ. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res.* 1964;106: 2–9. doi:10.1016/0027-5107(64)90047-8
294. Haigh J. The accumulation of deleterious genes in a population-Muller's Ratchet. *Theor Popul Biol.* 1978;14(2): 251-267. doi:10.1016/0040-5809(78)90027-8
295. Hill WG, Robertson A. The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genet Res.* 1966;8(3): 269–294. doi:10.1017/S0016672300010156
296. Charlesworth B, Betancourt AJ, Kaiser VB, Gordo I. Genetic recombination and molecular evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2009;74: 177-186. doi:10.1101/sqb.2009.74.015
297. Lynch M, Conery J, Burger R. Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution.* 1995;49(6): 1067-1080. doi:10.1111/j.1558-5646.1995.tb04434.x
298. Strotz LC, Simões M, Girard MG, Breitkreuz L, Kimmig J, Lieberman BS. Getting somewhere with the red queen: Chasing a biologically modern definition of the hypothesis. *Biol Lett.* 2018;14(5): 20170734. doi:10.1098/rsbl.2017.0734

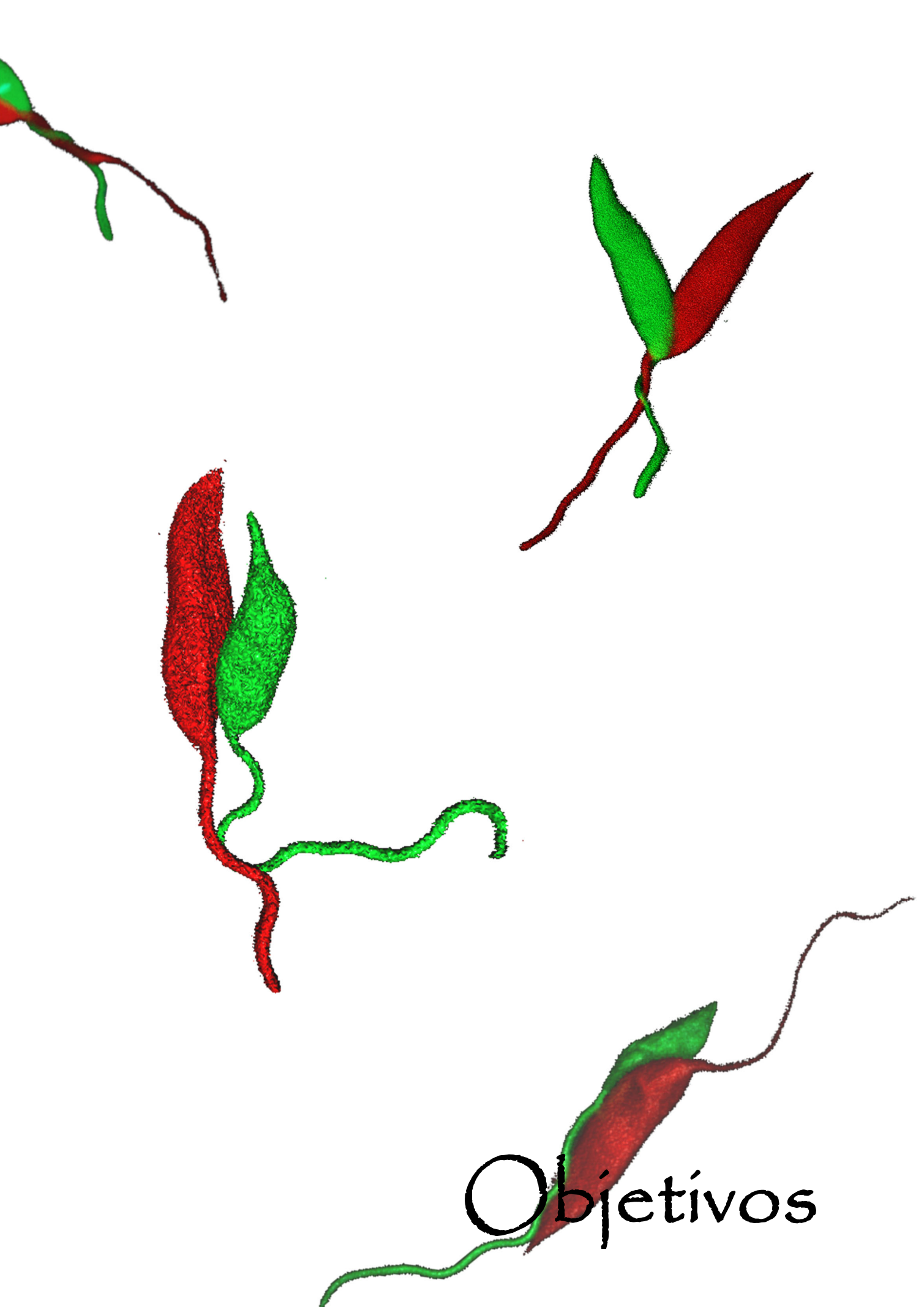
299. Neiman M, Meirmans PG, Schwander T, Meirmans S. Sex in the wild: How and why field-based studies contribute to solving the problem of sex? *Evolution*. 2018;72(6): 1194-1203. doi:10.1111/evo.13485
300. Lythgoe KA. The coevolution of parasites with host-acquired immunity and the evolution of sex. *Evolution*. 2000;54(4): 1142-1156. doi:10.1111/j.0014-3820.2000.tb00550.x
301. Howard RS, Lively CM. Parasitism, mutation accumulation and the maintenance of sex. *Nature*. 1994;367(6463): 554-557. doi:10.1038/367554a0
302. Ebert D, Hamilton WD. Sex against virulence: The coevolution of parasitic diseases. *Trends Ecol Evol*. 1996;11(2): 79-82. doi:10.1016/0169-5347(96)81047-0
303. Graham Bell. *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. Routledge. 1982.
304. Heitman J. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol*. 2006;16(17): R711–R725. doi:10.1016/j.cub.2006.07.064
305. Møller AP. Interactions between interactions: Predator-prey, parasite-host, and mutualistic interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1133: 180-186. doi:10.1196/annals.1438.007
306. Day T. Parasite transmission modes and the evolution of virulence. *Evolution*. 2001;55(12): 2389-2400. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00754.x
307. Ginger M, Field MC. Making the pathogen: Evolution and adaptation in parasitic protists. *Mol Biochem Parasitol*. 2016;209(1-2): 1-2. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.11.002
308. Jackson AP. Preface: The evolution of parasite genomes and the origins of parasitism. *Parasitology*. Cambridge University Press; 2015;142 Suppl 1(Suppl 1): S1–S5. doi:10.1017/S0031182014001516
309. Howard RS, Lively CM. The Ratchet and the Red Queen: The maintenance of sex in parasites. *J Evol Biol*. 2002;15(4): 648–656. doi:10.1046/j.1420-9101.2002.00415.x
310. Cavalier-Smith T. Origins of the machinery of recombination and sex. *Heredity*. 2002;88(2): 125-141. doi:10.1038/sj.hdy.6800034
311. Speijer D, Lukeš J, Eliáš M. Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(29): 8827-8834. doi:10.1073/pnas.1501725112
312. Bernstein H, Bernstein C. Evolutionary origin of recombination during meiosis. *Bioscience*. 2010;60(7): 498–505. doi:10.1525/bio.2010.60.7.5
313. Cavalier-Smith T. Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biol Direct*. 2010;5: 7. doi:10.1186/1745-6150-5-7
314. Gibson W. The sexual side of parasitic protists. *Mol Biochem Parasitol*. 2021;243: 111371. doi:10.1016/j.molbiopara.2021.111371
315. Peacock L, Bailey M, Carrington M, Gibson W. Meiosis and haploid gametes in the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Curr Biol*. 2014;24(2): 181-186. doi:10.1016/j.cub.2013.11.044
316. Lanotte G, Rioux JM. Cell fusion in *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *C R Acad Sci III*. 1990;310(7): 285–288.
317. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7): 2414-2418. doi:10.1073/pnas.87.7.2414
318. Tibayrenc M. Clonality in *Leishmania*. *Parasitol Today*. 1993;9(2): 58. doi:10.1016/0169-4758(93)90036-F

319. Prugnolle F, De Meeûs T. The impact of clonality on parasite population genetic structure. *Parasite*. PRINCEPS Editions; 2008;15(3): 455-457. doi:10.1051/parasite/2008153p455
320. Tibayrenc M, Ayala FJ. *Trypanosoma cruzi* populations: More clonal than sexual. *Parasitol Today*. 1987;3(6): 189-190. doi:10.1016/0169-4758(87)90179-7
321. Tibayrenc M, Echalar L, Dujardin JP, Poch O, Desjeux P. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78(4): 519-525. doi:10.1016/0035-9203(84)90075-0
322. Hartl DL. Population genetics of microbial organisms. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(6): 937-942. doi:10.1016/S0959-437X(05)80119-4
323. Tait A. Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*. 1980;287(5782): 536-538. doi:10.1038/287536a0
324. Tait A. Sexual Processes in the Kinetoplastida. *Parasitology*. 1983;86(Pt 4): 29-57. doi:10.1017/S0031182000050836
325. Gibson WC, Osinga KA, Michels PAM, Borst P. Trypanosomes of subgenus trypanozoon are diploid for housekeeping genes. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;16(3): 231-242. doi:10.1016/0166-6851(85)90066-0
326. Iovannisci DM, Beverley SM. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;34(2): 177-188. doi:10.1016/0166-6851(89)90009-1
327. Beck JT, Ullman B. Biopterin conversion to reduced folates by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;49(1): 21-28. doi:10.1016/0166-6851(91)90126-Q
328. Gueiros-Filho FJ, Beverley SM. Selection against the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) locus as a probe of genetic alterations in *Leishmania major*. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10): 5655-5663. doi:10.1128/mcb.16.10.5655
329. Tibayrenc M, Ayala FJ. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 2013;29(6): 264-269. doi:10.1016/j.pt.2013.03.007
330. Tibayrenc M, Ayala FJ. Is predominant clonal evolution a common evolutionary adaptation to parasitism in pathogenic parasitic protozoa, fungi, bacteria, and viruses? *Adv Parasitol*. 2017;97: 243-325. doi:10.1016/bs.apar.2016.08.007
331. Tibayrenc M, Ayala FJ. Reproductive clonality of pathogens: A perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(48): E3305-3313. doi:10.1073/pnas.1212452109
332. de Meeûs T, Balloux F. Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: A simulation study. *Infect Genet Evol*. 2004;4(4): 345-351. doi:10.1016/j.meegid.2004.05.002
333. Prugnolle F, De Meeus T. Apparent high recombination rates in clonal parasitic organisms due to inappropriate sampling design. *Heredity*. 2010;104(2): 135-140. doi:10.1038/hdy.2009.128
334. Rougeron V, De Meeûs T, Bañuls AL. A primer for *Leishmania* population genetic studies. *Trends Parasitol*. 2015;31(2): 52-59. doi:10.1016/j.pt.2014.12.001
335. Ramírez JD, Llewellyn MS. Reproductive clonality in protozoan pathogens - Truth or artefact? *Mol Ecol*. 2014;23(17): 4195-4202. doi:10.1111/mec.12872
336. Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van VE, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;46(2): 253-263. doi:10.1016/0166-6851(91)90049-C
337. Belli AA, Miles MA, Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*.

- 1994;109(Pt 4): 435-442. doi:10.1017/S0031182000080689
338. Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3): 573–578. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.573
339. Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, et al. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop.* 1995;59(4): 293-307. doi:10.1016/0001-706X(95)00094-U
340. Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol.* 2006;36(13): 1383-1388. doi:10.1016/j.ijpara.2006.06.019
341. Peacock L, Ferris V, Sharma R, Sunter J, Bailey M, Carrington M, et al. Identification of the meiotic life cycle stage of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(9): 3671-3676. doi:10.1073/pnas.1019423108
342. Hofstatter PG, Lahr DJG. All eukaryotes are sexual, unless proven otherwise: many so-called asexuals present meiotic machinery and might be able to have sex. *BioEssays.* 2019;41(6): e1800246. doi:10.1002/bies.201800246
343. Peacock L, Kay C, Farren C, Bailey M, Carrington M, Gibson W. Sequential production of gametes during meiosis in trypanosomes. *Commun Biol.* 2021;4(1): 555. doi:10.1038/s42003-021-02058-5
344. Sterkers Y, Crobu L, Lachaud L, Pagès M, Bastien P. Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: Alternative genetics. *Trends Parasitol.* 2014;30(9): 429-435. doi:10.1016/j.pt.2014.07.002
345. Lachaud L, Bourgeois N, Kuk N, Morelle C, Crobu L, Merlin G, et al. Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. *Microbes Infect.* 2014;16(1): 61-66. doi:10.1016/j.micinf.2013.09.005
346. Gaunt MW, Yeo M, Frame JA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 2003;421(6926): 936-939. doi:10.1038/nature01438
347. Jenni L, Marti S, Schweizer J, Betschart B, Le Page RWF, Wells JM, et al. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature.* 1986;322(6075): 173-175. doi:10.1038/322173a0
348. Gibson W, Whittington H. Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: Selection of hybrid trypanosomes by introduction of genes conferring drug resistance. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;60(1): 19-26. doi:10.1016/0166-6851(93)90024-R
349. Gibson W, Garside L, Bailey M. Trisomy and chromosome size changes in hybrid trypanosomes from a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;51(2): 189-199. doi:10.1016/0166-6851(92)90069-V
350. Bingle LEH, Eastlake JL, Bailey M, Gibson WC. A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the *in situ* detection of mating events. *Microbiology.* 2001;147(Pt 12): 3231-3240. doi:10.1099/00221287-147-12-3231
351. MacLeod A, Tweedie A, McLellan S, Taylor S, Cooper A, Sweeney L, et al. Allelic segregation and independent assortment in *T. brucei* crosses: Proof that the genetic system is Mendelian and involves meiosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(1): 12-19. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.04.009
352. Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasites and Vectors.* 2008;1(1): 4. doi:10.1186/1756-3305-1-4

353. Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors*. 2009;2(1): 43. doi:10.1186/1756-3305-2-43
354. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 2009;324(5924): 265-268. doi:10.1126/science.1169464
355. Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. Mating compatibility in the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors*. 2014;7: 78. doi:10.1186/1756-3305-7-78
356. Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Jiménez M, Molina R, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, et al. First evidence of intraclonal genetic exchange in trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9): e3075. doi:10.1371/journal.pntd.0003075
357. Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, et al. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One*. 2011;6(5): e19851. doi:10.1371/journal.pone.0019851
358. Inbar E, Akopyants NS, Charmoy M, Romano A, Lawyer P, Elnaiem DEA, et al. The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. *PLoS Genet*. 2013;9(7): e1003672. doi:10.1371/journal.pgen.1003672
359. Inbar E, Shaik J, Iantorno SA, Romano A, Nzelu CO, Owens K, et al. Whole genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis-like sexual recombination in *Leishmania*. *PLoS Genet*. 2019;15(5): e1008042. doi:10.1371/journal.pgen.1008042
360. Romano A, Inbar E, Debrabant A, Charmoy M, Lawyer P, Ribeiro-Gomes F, et al. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47): 16808-16813. doi:10.1073/pnas.1415109111
361. Shaik JS, Dobson DE, Sacks DL, Beverley SM. *Leishmania* sexual reproductive strategies as resolved through computational methods designed for aneuploid genomes. *Genes*. 2021;12(2): 1-16. doi:10.3390/genes12020167
362. Louradour I, Ferreira TR, Ghosh K, Shaik J, Sacks D. *In vitro* generation of *Leishmania* hybrids. *Cell Rep*. 2020;31(2): 107507. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.071
363. Telittchenko R, Descoteaux A. Study on the occurrence of genetic exchange among parasites of the *Leishmania mexicana* complex. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10: 607253. doi:10.3389/fcimb.2020.607253
364. Birky CW. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(25): 11331-11338. doi:10.1073/pnas.92.25.11331
365. Wang Z, Wilson A, Xu J. Mitochondrial DNA inheritance in the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *Fungal Genet Biol*. 2015;75: 1-10. doi:10.1016/j.fgb.2015.01.001
366. Breton S, Stewart DT. Atypical mitochondrial inheritance patterns in eukaryotes. *Genome*. 2015;58(10): 423-431. doi:10.1139/gen-2015-0090
367. Sternberg J, Tait A, Haley S, Wells JM, Le Page RWF, Schweizer J, et al. Gene exchange in African trypanosomes: characterisation of a new hybrid genotype. *Mol Biochem Parasitol*. 1988;27(2-3): 191-200. doi:10.1016/0166-6851(88)90038-2
368. Sternberg J, Turner CMR, Wells JM, Ranford-Cartwright LC, Le Page RWF, Tait A. Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;34(3): 269-279. doi:10.1016/0166-6851(89)90056-X
369. Gibson WC. Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Parasitology*. 1989;99 Pt 3: 391-402. doi:10.1017/S0031182000059114

370. Gibson W, Crow M, Kearns J. Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetic crosses of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res.* 1997;83(5): 483-488. doi:10.1007/s004360050284
371. Gibson W, Garside L. Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetic hybrids of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;42(1): 45-53. doi:10.1016/0166-6851(90)90111-X
372. Michael C, Turner R, Hide G, Buchanan N, Tait A. *Trypanosoma brucei*: Inheritance of kinetoplast DNA maxicircles in a genetic cross and their segregation during vegetative growth. *Exp Parasitol.* 1995;80(2): 234-241. doi:10.1006/expr.1995.1029
373. Birky CW. Relaxed cellular controls and organelle heredity. *Science.* 1983;222(4623): 468-475. doi:10.1126/science.6353578
374. Orr HA. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(8): 531-539. doi:10.1038/nrg2603
375. Matthey-Doret R, Whitlock MC. Background selection and FST: consequences for detecting local adaptation. *Mol Ecol.* 2019;28(17):3902-3914. doi:10.1111/mec.15197



Objetivos

Objetivos del Capítulo 1

Objetivo general: Evaluar el efecto leishmanicida de una colección de 20 indenoisoquinolinas cuyo mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la DNA-topoisomerasa IB de *Leishmania*

Objetivos específicos:

- Evaluación de la actividad leishmanicida de una serie de indenoisoquinolinas frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania* en un modelo *ex vivo* de explante murino de bazo infectados y evaluación de la citotoxicidad frente a líneas celulares de mamífero.
- Medida de la actividad de los compuestos frente a la DNA-topoisomerasa IB de *Leishmania* y la DNA-topoisomerasa IB humana.
- Estudio de la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de la histona H2A de *Leishmania* por indenoisoquinolinas.
- Efecto de las indenoisoquinolinas en el ciclo celular de *Leishmania* y determinación del daño de doble cadena en su ADN.

Objetivos del Capítulo 2

Objetivo general: Estudiar la capacidad de una nanopartícula dendrímica de polietilenglicol conjugada a doxorubicina mediante un enlace sensible a pH, (PG-DOX(pH)-PEG) como vehículo en macrófagos infectados con *Leishmania*.

Objetivos específicos:

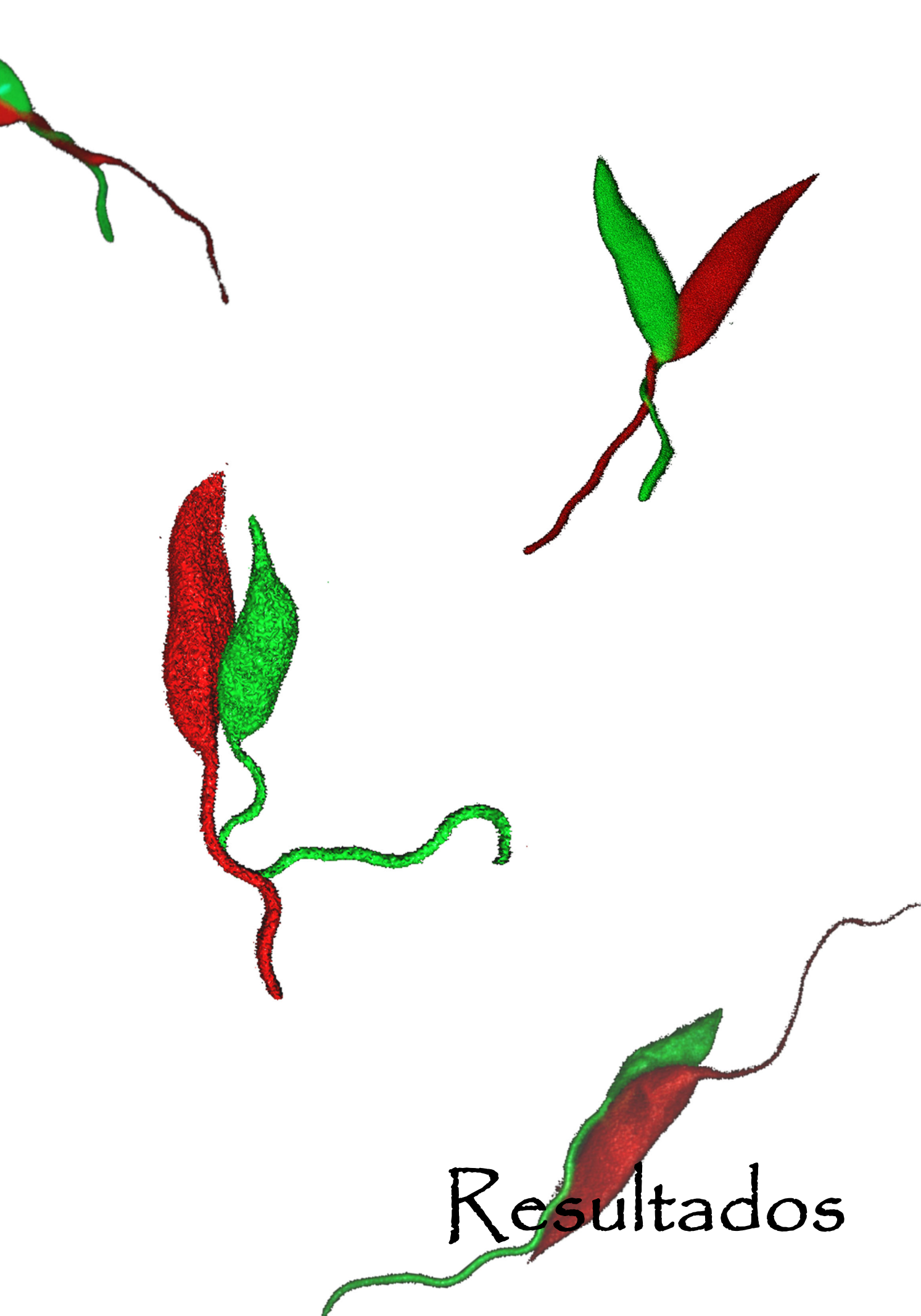
- Comparar la forma de entrada del conjugado PG-DOX(pH)-PEG con la doxorubicina libre
- Evaluación de la citotoxicidad del conjugado utilizando dos líneas celulares establecidas de macrófagos (RAW264.7 y J774A.1) y esplenocitos murinos.
- Determinación de la actividad leishmanicida en un modelo *ex vivo* de bazo procedente de ratones infectados con *L. infantum*.
- Estudio de la localización celular del conjugado en células no infectadas e infectadas de *Leishmania*, y visualización de la colocalización del fármaco con los parásitos mediante microscopía confocal.

Objetivos del Capítulo 3

Objetivo general: Avanzar en el conocimiento del intercambio genético de *Leishmania* investigando la producción de híbridos mediante cruces intraclonales e interespecíficos de *Leishmania*, en condiciones axénicas o en presencia de una línea celular procedente del vector *Lutzomyia longipalpis* (LULO).

Objetivos específicos:

- Obtención de híbridos mediante cruces experimentales intraclonales e interespecíficos utilizando distintos tipos de promastigotes en condiciones axénicas y en presencia de células LULO.
- Caracterización genotípica (nuclear y extranuclear) de los híbridos obtenidos.
- Caracterización fenotípica de los híbridos obtenidos.



Resultados



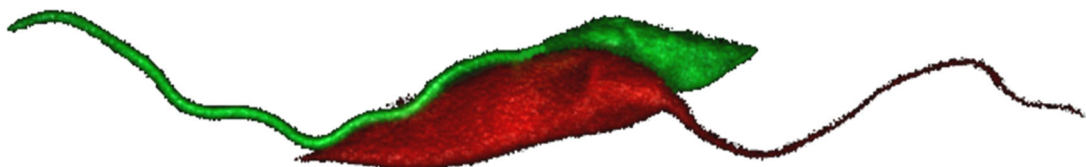
Capítulo 1

Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

11:39-48. doi: 10.1016/j.ijpddr.2019.09.005

2019



Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*

Camino Gutiérrez-Corbo^{a,1}, Raquel Álvarez-Velilla^{a,1}, Rosa M. Reguera^a, Carlos García-Estrada^b, Mark Cushman^c, Rafael Balaña-Fouce^a, Yolanda Pérez-Pertejo^{a,*}

DOI: 10.1016/j.ijpddr.2019.09.005

Abstract

DNA topoisomerases are considered consolidated druggable targets against diseases produced by trypanosomatids. Several reports indicated that indenoisoquinolines, a family of non-camptothecin based topoisomerase poisons, have a strong leishmanicidal effect both *in vitro* and *in vivo* in murine models of visceral leishmaniasis. The antileishmanial effect of the indenoisoquinolines implies several mechanisms that include the stabilization of the cleavage complex, histone H2A phosphorylation and DNA fragmentation.

A series of 20 compounds with the indenoisoquinoline scaffold and several substituents at positions N6, C3, C8 and C9, were tested both in promastigotes and in intramacrophage splenic amastigotes obtained from an experimental murine infection. The antileishmanial effect of most of these compounds was within the micromolar or submicromolar range. In addition, the introduction of an N atom in the indenoisoquinoline ring (7-azaindenoisoquinolines) produced the highest selectivity index along with strong DNA topoisomerase IB inhibition, histone H2A phosphorylation and DNA-topoisomerase IB complex stabilization.

This report shows for the first time the effect of a series of synthetic indenoisoquinolines on histone H2A phosphorylation, which represents a primary signal of double stranded DNA break in genus *Leishmania*.



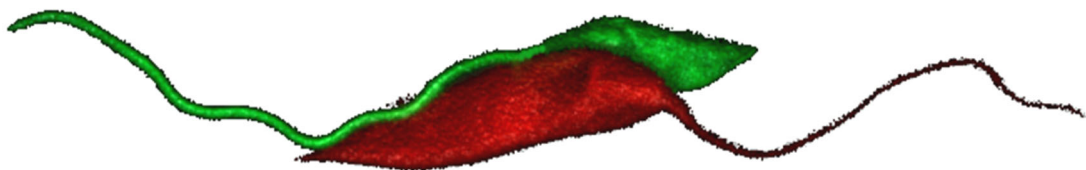
Capítulo 2

PEGylated dendritic polyglycerol conjugate delivers doxorubicin to the parasitophorous vacuole in *Leishmania infantum* infections

Macromolecular Bioscience

17(10). doi: 10.1002/mabi.201700098

2017



PEGylated dendritic polyglycerol conjugate delivers doxorubicin to the parasitophorous vacuole in *Leishmania infantum* infections

Camino Gutiérrez-Corbo^{1,2§}, Bárbara Domínguez-Asenjo^{1§}, Laura I. Vossen³, Yolanda Pérez-Pertejo¹, María A. Muñoz-Fenández², Rafael Balaña-Fouce¹, Marcelo Calderón^{3*} and Rosa M. Reguera^{1*}

DOI: 10.1002/mabi.201700098

Abstract

Most drugs against visceral leishmaniasis must be administered parenterally. A controlled drug release at the target site can improve the efficacy and toxicity of antileishmanial drugs in clinical use. Amastigotes live and grow inside the parasitophorous vacuole of host resident macrophages. Therefore, antileishmanial drugs should accumulate in this compartment to kill the parasite and do not produce toxicity to the cell host. PEGylated dendritic polyglycerol conjugates (PG-PEG) can ensure a controlled drug release and the immune activation efficiency of the host. A dendritic PG conjugate with doxorubicin (DOX) attached through a pH-cleavable hydrazone linker (PG-DOX(pH)-PEG), is tested on murine macrophage cell lines and on ex vivo infected BALB/c splenocytes. As a control, a dendritic PG conjugate attached via a non-cleavable linker (PG-DOX(non)-PEG) is used. DOX fluorescence is useful to monitor the fate of the drug inside the infected cells by flow cytometry and confocal microscopy. The results show that PG-DOX(pH)-PEG slowly releases DOX inside the targeted macrophages, protecting the host of toxic drug concentrations. In addition, unlike free DOX, PG-DOX(pH)-PEG is actively internalized through the acidic endocytic pathway and colocalized surrounding the amastigotes. These results prove that PG-DOX(pH)-PEG is a promising candidate for releasing antileishmanial drugs in a controlled manner.



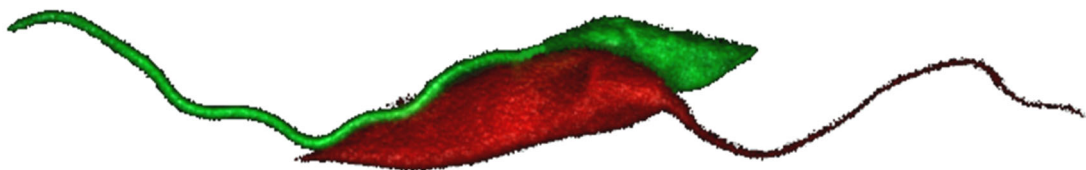
Capítulo 3 – Parte A

Reproduction in Trypanosomatids: Past and Present

Biology

10(6):471. doi: 10.3390/biology10060471

2021



Reproduction in trypanosomatids: past and present

Camino Gutiérrez-Corbo¹, Bárbara Domínguez-Asenjo¹, María Martínez-Valladares², Yolanda Pérez-Pertejo¹, Carlos García-Estrada¹, Rafael Balaña-Fouce^{1,*} and Rosa M. Reguera¹

DOI: 10.3390/biology10060471

Abstract

Diseases caused by trypanosomatids (Sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis) are a serious public health concern in low-income endemic countries. These diseases are produced by single-celled parasites with a diploid genome (although aneuploidy is frequent) organized in pairs of non-condensable chromosomes. To explain how they reproduce through the study of natural populations, the theory of strict clonal propagation of these microorganisms was taken as a rule at the beginning of the studies, since it partially justified their genomic stability. However, numerous studies provide evidence of sexual reproduction, thus explaining certain naturally occurring events that link the number of meiosis per mitosis and the frequency of mating. Recent techniques have demonstrated genetic exchange between individuals of the same species under laboratory conditions, as well as the expression of meiosis specific genes. The current debate focuses on the frequency of genomic recombination events and its impact on the natural parasite population structure.

This paper reviews the results and techniques used to demonstrate the existence of sex in trypanosomatids, the inheritance of kinetoplast DNA (maxi- and minicircles), the impact of genetic exchange in these parasites, and how it can contribute to the phenotypic diversity of natural populations.

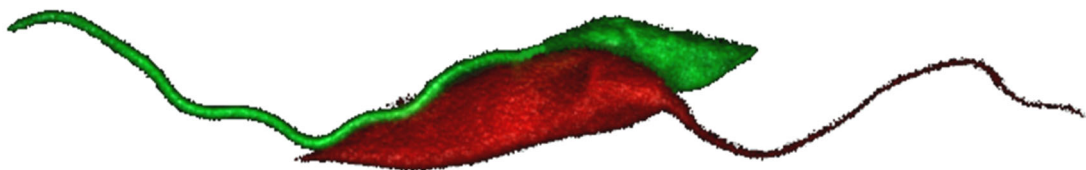


Capítulo 3 – Parte B

Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation
in *Leishmania*: succesful crossings between visceral
and cutaneous strains

Unpublished

2021



Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation in *Leishmania*: successful crossings between visceral and cutaneous strains.

Camino Gutiérrez-Corbo, Bárbara Domínguez-Asenjo, Yolanda Pérez-Pertejo, Carlos García-Estrada, Felio J Bello², Rafael Balaña-Fouce* and Rosa M. Reguera*

¹Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071, León, Spain.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria, Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia

*Corresponding authors: Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071, León, Spain. E-mail: rbalf@unileon.es; rmregt@unileon.es; Phone: +34 987291590

Short title: Axenic hybrid formation in *Leishmania*

Keywords: *Leishmania*, genetic exchange, hybrid, ploidy, kDNA

Abstract

Diseases caused by trypanosomatids are serious public health concerns in low-income endemic countries. Leishmaniasis is presented in two main clinical forms, visceral leishmaniasis - caused by *L. infantum* and *L. donovani* - and cutaneous leishmaniasis - caused by *L. major*, *L. tropica* and *L. braziliensis*. As for other trypanosomatids, sexual reproduction has been confirmed in these parasites, and formation of hybrids can contribute to virulence, drug resistance or adaptation to the host immune system. In the present work, the capability of intraclonal and interspecies genetic exchange has been investigated using three parental strains: *L. donovani*, *L. tropica* and *L. major*, which have been engineered to express different fluorescent proteins and antibiotic resistance markers in order to facilitate the phenotypic selection of hybrid parasites after mating events. Stationary and nectomonads promastigotes of each species were used, as well as two different *in vitro* conditions: parasites alone or parasites co-cultured on a monolayer of LULO cells (an embryonic cell line derived from *Lutzomyia longipalpis*). Several intraclonal hybrids were obtained with *L. tropica* as crossing progenitor, but not with *L. donovani* or *L. major*. In interspecies crossings, three *L. donovani* x *L. major* hybrids and two *L. donovani* x *L. tropica* hybrids were isolated, thereby demonstrating the feasibility to obtain *in vitro* hybrids of parental lines causing different tropism of leishmaniasis. Ploidy analysis revealed an increase in DNA content in all hybrids compared to the parental strains, and nuclear analysis showed that interspecies hybrids are complete hybrids, i.e. each of them showing at least one chromosomal set from each parental. Regarding kDNA inheritance, discrepancies were

observed between maxi and minicircle heritage. Finally, phenotypic studies showed either intermediate phenotypes in terms of growth profiles, or a decreased *in vitro* infection capacity compared to the parental cells.

To the best of our knowledge, this is the first time that *in vitro* interspecies outcrossing has been demonstrated between *Leishmania* species with different tropism, thus contributing to shed light on the mechanisms underlying sexual reproduction in these parasites.

1. INTRODUCTION

Major pathogenic trypanosomatids, *Trypanosoma brucei* (responsible for sleeping sickness in Africa), *Trypanosoma cruzi* (responsible for Chagas disease in South America) and *Leishmania* spp. are single-celled protists causing some of the most neglected and deathful transmissible diseases produced by eukaryotes in low-income countries. *Leishmania* is a digenetic parasite transmitted to humans by species of sandflies of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*, which maintain the zoonotic cycle.^{1,2} In the definitive host, *Leishmania* causes different disorders: i) cutaneous leishmaniasis, produced by *L. major* and *L. tropica* in the Old World and by *L. braziliensis* in the New World, is the less severe form and may lead to the formation of disfiguring sores and scars in exposed parts of the body³; ii) mucocutaneous leishmaniasis, caused by the *L. amazonensis* complex in the New World, is a more severe presentation that can destroy the mucous membranes of mouth and nose⁴; iii) visceral leishmaniasis is responsible for swelling of internal organs and can be fatal if left untreated. It is produced by *L. donovani* and *L. infantum* in the Old World, and by *L. chagasi* (*infantum*) in the New World, and can derive into a rare skin form of the disease called post-kala azar dermal leishmaniasis when the antimony therapy fails.^{5,6}

The mode of reproduction of these species is no longer just a basic biology issue, but a source of information that can provide explanations to important clues regarding parasite virulence, drug resistance or adaptation to the host immune system. Nowadays, it is unquestionable that sexual reproduction, including gene recombination and chromosome segregation, takes place in trypanosomatids. As for other eukaryotes, the genetic toolbox for the formation of gametes by reductive meiosis as well as their cytoplasmic fusion (syngamy) during mating, have been described in trypanosomatids.⁷⁻⁹ The debate is now focused on determining how frequent is sex and what is the impact exerted on species and natural populations of these parasites from an evolutive point of view.¹⁰⁻¹⁵

Since the late 80s, there is confirmed evidence that, under controlled laboratory conditions, different strains of *T. brucei* are capable of generating viable hybrids by genetic exchange.¹⁶

It was observed that filial hybrid generations inherited gene markers from each parent strain. In addition, this genetic exchange took place in the salivary glands of tsetse flies.^{16,17} The filial generation shared characteristics from both parental strains (biparental inheritance), but some specific characteristics such as the occurrence of a proportion of filial hybrids with variable ploidy¹⁸, or the existence of mating types capable of self- and non-self-recognition, were also reported.¹⁹ Finally, thanks to the use of transgenic fluorescent strains, mating phenomena and gamete production could be observed.^{20–22}

The results obtained with *Leishmania* spp. are more recent and confirm those obtained with other trypanosomatids. The use of antibiotic resistance markers served to detect the first interclonal genetic exchange event between different strains of *L. major* in the presence of either the natural vector *Phlebotomus duboscqi*, or the permissive *Lutzomyia longipalpis* sandfly. Similar to *T. brucei*, a percentage of the hybrid generation had an unexpectedly higher ploidy than that of the parental strains.^{23,24} Furthermore, viable hybrids that partly retained the visceralization capacity in mouse were obtained between two identical clones of *L. infantum* (self-mating or selfing).²⁵ Moreover, hybrids were also produced between strains of different species, such as *L. infantum* and *L. major*, whose filial hybrid generation retained part of the characteristics of each parent.²⁶

Until 2020, genetic exchange events in *Leishmania* had only been demonstrated in the midgut of the permissive *Lu. Longipalpis* or non-permissive *Ph. papatasi* and *Ph. duboscqi* sand flies fed with infected blood. However, a recent work demonstrated that these events could also take place between promastigotes in the absence of the insect vector in axenic conditions²⁷, and might be possible even between amastigotes within the macrophage phagolysosome.²⁸ These new findings could significantly facilitate this type of studies.

Other important results obtained from genetic exchange processes were related to the inheritance of extrachromosomal kinetoplast DNA (kDNA). kDNA is an intricate mesh of both maxicircles (few in number and equivalent to mitochondrial DNA) and minicircles (very numerous and responsible for the editing of parasite mRNAs).²⁹ Genetic exchange experiments with different strains of *T. brucei* showed that unlike minicircles³⁰, the DNA content of the maxicircles from filial hybrids seems to have uniparental origin, although recent results suggest the early biparental inheritance of maxicircles.³¹

Encouraged by the importance of genetic exchange in *Leishmania* we have proceeded to perform interspecies and intraclonal hybridization studies between lines of *L. donovani*, *L. tropica* and *L. major*. These experiments have been conducted in the absence of the vector, but assessing the effect of an embryonic cell line from the permissive vector *Lu. longipalpis* (LULO cells) as feed layer for hybridization experiments. The inheritance of the

hybrids obtained from each of the parental strains, their ploidy, kDNA composition, viability and infectivity in macrophages have been analysed to contribute to decipher the mechanism behind reproduction in *Leishmania*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and infections

Six-to-eight weeks old female Balb/c mice, purchased from Janvier Laboratories (St Berthevin Cedex, France) were used to maintain the *Leishmania* strains. Mice were infected intraperitoneally with 5×10^8 metacyclic promastigotes of different *Leishmania* strains (see below) and after 6 weeks, animals were euthanized. Livers and spleens were aseptically processed in order to recover the parasites as previously described.³²

Experiments in this study involving animals have been carried out in accordance with Spanish and European Union legislation (RD 53/2013 and 2010/63/EU, respectively). The protocols used in this study have been approved by the Ethics Committee of the University of León (Spain), Project license number OEBA-ULE-007-2019.

2.2. Parasites and growth curves

Parental strains, *L. donovani* MHOM/ET/67/HU3, also known as LV9 or L-82 (kindly provided by Dr. Philippe Loiseau, Université Paris-Sud, Paris, France), *L. major* LV39c5 (RHO/SU/59/P) (kindly provided by Dr. Stephen M Beverley, Washington University School of Medicine, Saint Louis, USA), *L. tropica* MRAT/IQ/72/ADHANIS1 (kindly provided by Dr. José M. Requena, CBM, UAM, Madrid, Spain) and hybrid parasites were cultured at 26°C in M199 medium (Sigma), supplemented with 25 mM HEPES pH 6.9, 10 mM glutamine, 7.6 mM hemin, 0.1 mM adenosine, 0.01 mM folic acid, 1x RPMI 1640 vitamin mix (Sigma), 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and antibiotic mixture (200 U/mL penicillin and 200 µg/mL streptomycin). Stationary-phase parasites were harvested after 7 days in culture, while nectomonad promastigotes were collected 72 hours after starting the culture. Both nectomonad and stationary phase promastigotes were confirmed microscopically before performing the experiments.

To prepare growth curves, parental and hybrid lines were seeded at a density of 10^6 promastigotes/mL in complete M199 medium and parasite numbers were determined daily on a Z1 Beckman Coulter.

2.3. LULO cell cultures

LULO cells were kindly provided by Dr. Felio Jesús Bello (Universidad de la Salle, Sede Norte, Bogotá, Colombia). LULO is an adherent embryonic cell line derived from the permissive sandfly *Lutzomyia longipalpis*.³³ LULO cells were cultured in monolayer at 26°C in L-15:Grace's (1:1) medium (both from FisherScientific) supplemented with 10% FBS and antibiotic mixture until reaching confluence between passages. Interaction between parental promastigotes and LULO cells was tested by seeding 2×10^4 LULO cells in 8-well Ibidi chambers and adding promastigotes 24 hours later at a 1:5 ratio. Interaction was visualized by confocal microscopy. For this purpose, parasites were stained with Hoechst 33342 (Fisher Scientific) during 30 minutes at 37°C and images were acquired on a Zeiss LSM800 confocal microscope.

2.4. Generation of fluorescent-transgenic lines of *Leishmania*

To perform *in vitro* crossing experiments, one of the transgenic lines was generated previously in our lab, namely *L. major* mCh HYG (expressing the gene encoding mCherry (mCh) and the hygromycin resistance cassette (HYG)). In addition to this transgenic line, some new fluorescent cell lines were generated after electroporation of the corresponding plasmids (see below) and further selection of the parasites on semisolid medium containing specific antibiotic markers (see below).³⁴

On the one hand, *L. donovani* mCh HYG and *L. tropica* mCh HYG were obtained after electroporation of these strains with pLEXSY-mCh-HYG construct³⁵ and subsequent selection of transfectants in medium containing hygromycin (200 µg/mL). On the other hand, electroporation of promastigotes of *L. tropica* with pLEXSY-iRFP-PAC³² and further selection of transfectants in medium with puromycin (200 µg/mL), gave rise to *L. tropica* iRFP PAC, which constitutively expresses the *iRFP* gene. Finally, electroporation of promastigotes of *L. donovani*, *L. major* and *L. tropica* with the construct pLEXSY-CTN-PAC (see below) and selection of transfectants in medium with puromycin (200 µg/mL) gave rise to *L. donovani* CTN PAC, *L. major* CTN PAC and *L. tropica* CTN PAC, respectively, which produce the citrine (CTN) protein. For the construct of pLEXSY-CTN-PAC (Figure 1A), the gene encoding CTN was amplified by PCR from the plasmid pLEXSY-CTN-HYG²⁵ using the primers RBF921, which contains the sequences for XhoI and BglII at the 5'-end, and RBF614, the latter containing the sequences for NotI at the 5'-end (Table 1). The fragment obtained (CTN; 720 bp) included the kozak sequence for improved expression of the fluorescence protein. Then, it was digested with XhoI and NotI, and cloned in a pBluescript SK (Agilent), thus forming pSK-CTN fragment. In the next step, plasmids pSK-CTN and pLEXSY-hyg2 (Jena Bioscience) were digested with BglII and NotI,

and the fragment CTN was cloned in the pLEXSY-hyg2 vector, thus obtaining pLEXSY-hyg2-CTN. Finally, pLEXSY-CTN-PAC was generated after digestion of pLEXSY-hyg2-CTN with SpeI and NotI in order to replace the fragment HYG-utr2 with the fragment PAC-HSP70. This fragment was obtained from pLEXSY-iRFP-70-PAC after digestion with SpeI and NotI, and contains the HSP70 downstream region, which has been reported to help increase the expression of the reporter gene included in pLEXSY vectors.³²

Table 1: Primers used in this work

Product name	Primers	Product (bp)	Use
Citrine ²⁵	RBF921, FW: <i>ccgCTCGAGgaAGATCTCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG</i> RBF614, RV: <i>ataagaatGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG</i>	720	ORF cloning
Hygromycine ³⁵	RBF646, FW: ATGAAAAAGCCTGAACTCACC RBF647, RV: CTATTCCTTTGCCCTCGGAC	1025	Characterization of transformants
Puromycin ³²	RBF774, FW: ATGACCGAGTACAAGCCCACG RBF775, RV: TCAGGCACCGGGCTTGCGG	720	Characterization of transformants
mCherry	TOX43, FW: TGGCCATCATCAAGGAGTTCA TOX44, RV: CCCTCGGCGCGTTCGT	711	Characterization of transformants
Citrine	TOX41, FW: CGAGGAGCTGTACACCGGG TOX42, RV: ACGAACTCCAGCAGGACCAT	717	Characterization of transformants
iRFP ³²	RBF843, FW: ATGGCGGAAGGATCCGTCGC RBF844, RV: TCACTCTTCCATCACGCCGATC	950	Characterization of transformants
Calmodulin-binding	TOX59, FW: CTGAACCGGATGCAGATTCGTGAG TOX60, RV: CTTGTGTGCGTGTCTGCTCGATCTG	786	Genomic SNP-CAPs
ABC transporter	TOX61, FW: ATGGACTTGGTGACGCTGCAGCGA TOX62, RV: GATGTCATCGCACAGGGACGTAATG	2091	Genomic SNP-CAPs
Sec20	TOX63, FW: GGACCAGGCGCTACACGAGCTGAT TOX64, RV: GACACGCGCAGCAGCAGATCATCG	618	Genomic SNP-CAPs
Rad9	TOX65, FW: GGCTGAGCGACGGCATCGAGATCAG TOX66, RV: CCTCGTTGGCGGAGGTGTAGGTGC	1956-1959	Genomic SNP-CAPs
Asparaginase	TOX69, FW: CGTCGCCGGATACCTGACGGAGC TOX70, RV: GGTGATTCGCCTCGCAGATTCTG	1015	Genomic SNP-CAPs
Paraflagellar rod protein	TOX67, FW: ATGAGCATCGTCTGCGACATGGCGT TOX68, RV: CTACTCGGTGATCTGTGCGACCGTC	1800	Genomic SNP-CAPs

Ribosomal protein L22p/L17e	TOX55, FW: ATGCCGAAGCCAGCCCCTCGGTAC TOX56, RV: CAGCAGTGATGGCGGGCACGTCCA	829	Genomic SNP-CAPs
Fumarate hydratase (Fumerase)	TOX45, FW: ATGTCTCTGTGCGACCA TOX46, RV: TCACGCAAGCGTCTTCG	1707	Genomic SNP-CAPs
Aquaglyceroporin 1	TOX51, FW: GGCTACGCGAGTATGTTGCC TOX52, RV: AAGACATACAAGAACATGCCGA	688-736	Genomic SNP-CAPs
2-oxoisovalerate dehydrogenase β -subunit	TOX49, FW: AGCGTTCAACCGAGTGAGTT TOX50, RV: AAGTGCACCACGGACTTGAT	1025	Genomic SNP-CAPs
A2 ³⁶	L2: TTGGCAATGCGAGCGTCACAGTC R3: CAACGCGTACGATAATGCCACA	230/480	Genomic amplification
ACTIN	TOX83, FW: AATGGCTGACAACGAGCAGA TOX84, RV: CACTTGTGTGCACGATGCT	1125	Genomic sequencing
ITS ³⁷	(LITSR); TOX75, FW: CTGGATCATTTTCCGATG (L5.8S); TOX76, RV: TGATACCACTTATCGCACTT	420	Strain confirmation
ND7 ³⁸	TOX97, FW: GTGCATTTATGCGTTTATTAATGTG TOX98, RV: ACAACATCAACATTACCAATAACTGC	800	Maxicircle SNP-CAPs
CYTB ²⁶	TOX99, FW: AGCGGAGAGRARAGAAAAGG TOX100, RV: : GYTCRCAATAAAAATGCAAATC	618	Maxicircle SNP-CAPs
ND5 ²⁶	TOX103, FW: GAYGCDATGGAAGGACCDAT TOX104, RV: CCACAYAAAAAYCAYAANGAACA	456	Maxicircle SNP-CAPs
12sRNA ²⁶	TOX101, FW: AACTARTGAWGGCACAGTTGTTCT TOX102, RV: ACCCAACTAACGAATTGCWTTT	818	Maxicircle SNP-CAPs
MINICIRCLES 1 (MIN 1) ³⁹	TOX73, FW: CCAGTTTCCCGCCCCG (KDNA-F) TOX74, RV: GGGGTTGGTGGTGTAATAATAG (KDNA-R)	780	Minicircle amplification
MINICIRCLES 2 (MIN 2) ⁴⁰	TOX75, FW: TAATATAGTGGGCCGCGCAC TOX76, RV: CCGACATGCCTCTGGGTAGG	<250 – 1000	Minicircle amplification

The correct integration of both the reporter and antibiotic resistance cassettes in the *Leishmania* genome was tested by PCR. In addition, fluorescent signal was checked by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10) and confocal microscopy. For this purpose, 2×10^4 exponential phase promastigotes were collected, washed twice in 1xPBS and placed in 8-well Ibidi chambers previously treated with poly-L-lysine (Sigma). Parasites were stained with Hoechst 33342 (Fisher Scientific) during 30 minutes at 37°C and images were acquired on a Zeiss LSM800 confocal microscope.

2.5. Crossing experiments

In vitro hybrids were generated by mixing equal numbers (2.5×10^6) of parental promastigotes, either on empty 96 well plates or on 96 well plates previously seeded with confluent LULO cells. Several days after mixing parental cell lines (3, 6 or 9 days, depending on the experiment) parasites were transferred into 48-well plates including fresh complete M199 medium containing the selection antibiotics (puromycin and hygromycin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each), in order to select the double resistant hybrids generated due to genetic exchange. For these experiments, promastigotes from different cell cycle stages were used in order to compare the differences between nectomonad and stationary phase promastigotes.

2.6. Analysis of DNA content

Ploidy of hybrids and parental strains was determined through the analysis of their total DNA content. Briefly, 1×10^6 promastigotes were collected, washed twice in 1xPBS and fixed by adding 70% ethanol dropwise in vortex. Samples were kept at -20°C during at least 24 hours and up to 1 week until analysis. For this, fixed cells were washed again in 1xPBS twice, stained with propidium iodide (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and treated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase (Sigma) at 37°C during 30 minutes. Analysis was carried out on MACSQuant Analyzer 10 flow cytometry equipment. Data were analysed with FlowJo v10 software. *L. major* Friedlin (2n) and *L. braziliensis* Mb2904 (3n) were used as ploidy-content reference cell lines in order to compare them with hybrids and parental strains.

2.7. Identification of parental *Leishmania* strains

The characterization of parental *Leishmania* strains was performed by sequencing ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1 region between the *ssu* and 5-8 rRNA genes)³⁷, using the primers described in Table 1.

2.8. Single Nucleotide Polymorphisms Cleaved Amplification Polymorphic site (SNP-CAPs):

Analysis of specific loci placed on different chromosomes and kinetoplastid DNA in the interspecific hybrids (*L. donovani* mCH HYG x *L. major* CTN PAC and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC) and in their parental strains was carried out by SNP-CAPs using the SNP2CAPS tool described by Thiel et al., (2004).⁴¹ Detailed description of the genes, primers, SNPs, restriction enzymes used for this purpose and the size of the predicted products in each *Leishmania* strain can be found in Table 2.

Table 2: Genes tested by SNP-CAPs. The gene name, gene identification (ID), location, the name of forward and reverse primers used for PCR amplification (sequence of these primers can be found in Table 1), SNP position, as well as the expected band sizes after digestion with the suitable restriction enzymes, are shown.

Gene name	ID	Location	Primers	SNP position	RE	Predicted products (bp)		
						<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>
Calmodulin-binding	LdBPK.01.2.000260 LMJLV39_010007500 LTRL590_010007500	Chr. 1	TOX59 TOX60	608	MscI (MlsI)	608 + 178	786	786
ABC Transporter	LdBPK.03.2.000150 LMJLV39_030006600 LTRL590_030006400	Chr. 3	TOX61 TOX62	206	NruI	2091	1885 + 206	n.a
					PmlI	2091	n.a	1812 + 279
Sec20	LdBPK.11.2.000300 LMJLV39_110008400 LTRL590_110008700	Chr. 11	TOX63 TOX64	158 + 204	BcnI (NciI)	414 + 158 + 46	618	618
Rad9	LdBPK.15.2.001040 LMJLV39_150016800 LTRL590_150016300	Chr. 15	TOX65 TOX66	938	MluCI (TasI)	1018 + 938	1956	n.a
				491	AvaII (Eco47I)	1956	n.a	1468 + 491
cytoplasmic l-asparaginase i-like protein	LdBPK.15.2.000440 LMJLV39_150009800 LTRL590_150009200	Chr. 15	TOX69 TOX70	832	EcoRV (Eco32I)	832 + 183	1015	1015
Paraflagellar rod protein	LdBPK.16.2.001510 LMJLV39_160021000 LTRL590_160021500	Chr. 16	TOX67 TOX68	925	XhoI	1800	925 + 875	n.a
				1441	NruI	1441 + 359	n.a	1800
Ribosomal protein L22p/L17e	LdBPK.22.2.000700 LMJLV39_220013900 LTRL590_220012400	Chr. 22	TOX55 TOX56	593	MluCI (TasI)	593 + 236	829	829
Fumarate hidratase	LdBPK.29.2.002080 LMJLV39_290027300 LTRL590_290026600	Chr. 29	TOX45 TOX46	935	MluCI (TasI)	1707	955 + 772	955 + 772
Aquaglyceroporin 1	LdBPK.31.2.000030 LMJLV39_310005100 MG797692.1	Chr. 31	TOX51 TOX52	279	MluCI (TasI)	457 + 279	736	688
2- oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit	Ld .35.2.209420 LMJLV39_350005400 LTRL590_350005500	Chr. 35	TOX49 TOX50	609	HpaI (KspAI)	609 + 416	1025	1025
CYTB	FJ416603.1 MK514113.1 MN904525.1	Maxicircle	TOX99 TOX100	618	TatI	420 + 140 + 60	252 + 228 + 141	n.a.
					NdeI	621	n.a.	525 + 96
ND5	FJ416603.1 MK514113.1 MN904525.1	Maxicircle	TOX103 TOX104	456	BglII	464	258 + 206	n.a.
					EcoRI	335 + 129	n.a.	464

2.9. Determination of inheritance in polyploid hybrids

In order to determine the origin of the extra chromosome sets in the different hybrids, we based on the experiment carried out by Romano et al in 2014.²⁶ Simulated 3n and 4n hybrids were created by mixing parental DNA in 1:1, 1:2 and 2:1 ratios (for the *L. donovani* x *L. major* hybrids) and 1:1, 1:3 and 3:1 ratios (for the *L. donovani* x *L. tropica* hybrids). Then, several loci were analysed by SNP-CAPs as indicated above. Subsequently, the ratio obtained between the largest band digested with the restriction enzyme belonging to one parental allele, and the uncut band corresponding to the allele of the other parental, was calculated using the Gene Tools 4.3.9 (Syngene) software. The ratio obtained in simulated 3n and 4n was compared to that obtained by the hybrids, thus allowing us to classify the hybrids according to one of the control ratios by statistical analysis using k-means analysis in SPSS COR statistical software.

2.10. *In vitro* infections:

The ability of intraclonal and interspecies hybrids to infect *in vitro* was tested in RAW murine macrophages. For this purpose, 5×10^4 RAW cells were seeded in 8-well Ibidi chambers and infected in a proportion of 1:10 with promastigotes. After 2 hours, the co-culture was washed three times in PBS. Three days after the infection, samples were stained with Hoechst 33342 (Fisher Scientific) during 30 minutes at 37°C, and images were acquired on a Zeiss LSM800 confocal microscope.

The *in vitro* infective competence of hybrids vs. parents was determined using bone marrow-derived macrophages (BMMs) obtained from Balb/c mice. Briefly, after euthanasia, the animals were dissected and the femur and tibia were cleaned and separated in sterile conditions using scissors and forceps. The heads of the bones were cut off, and 5 mL of 1xHBSS (Hanks Balanced Salt Solution) were insufflated through the channel bone with a 25G syringe. The undifferentiated cells were collected⁴² and frozen. Upon use, cells were thawed and the protocol proposed by Legarda was followed.⁴³ Briefly, cells were placed in 5 mL of differentiation medium, which contains RPMI supplemented with 10% FBS and 30% L929 supernatant (L929 fibroblast cells produce rM-CSF - recombinant macrophage colony stimulating factor -), in a small petri dish to allow them to attach, and 24 hours later, they were collected and seeded in 10 mL of differentiation medium in a 10-cm non-treated petri dish. On day 4, 5 mL of differentiation medium were added and BMMs were ready for parasite infection on day 7. Stationary phase promastigotes (7 days of culture) or amastigotes of each parental and hybrid strains were added to differentiated-macrophages at 1:5 ratio for 2 hours (promastigotes) or at 1:10 ratio for 6 hours (amastigotes) and maintained at 37°C. Later, non-internalised parasites were washed twice with PBS. After 3 days, samples were

fixed in 100% methanol and stained with Giemsa. Then, pictures were acquired with a Nikon microscope and 100 macrophages per parasite-cell-line were analysed for the presence of amastigotes, which were counted in three independent experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Generation of engineered parental cell lines

In order to ease the phenotypic analysis of the parental and hybrid strains, in addition to *L. major* mCh HYG, which had been already generated in our laboratory and was able to stably express the gene encoding mCh and the hygromycin resistance cassette³⁵, we prepared six other novel transgenic strains (see Materials and Methods). *L. donovani* mCh HYG and *L. tropica* mCh HYG are able to constitutively express the gene encoding mCherry and the hygromycin resistance cassettes. *L. tropica* iRFP PAC is able to express both the iRFP gene and the puromycin resistance cassette, whereas *L. donovani* CTN PAC, *L. tropica* CTN PAC and *L. major* CTN PAC were obtained after electroporation with pLEXSY-CTN-PAC (Figure 1A). These strains are able to produce the CTN protein and are resistant to puromycin. After the analysis of these transgenic strains by PCR to confirm the integration of both the reporter and antibiotic resistance cassettes, and analysis by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10), the fluorescent parasites were visualized with different wavelengths by confocal microscopy (Figure 1B).

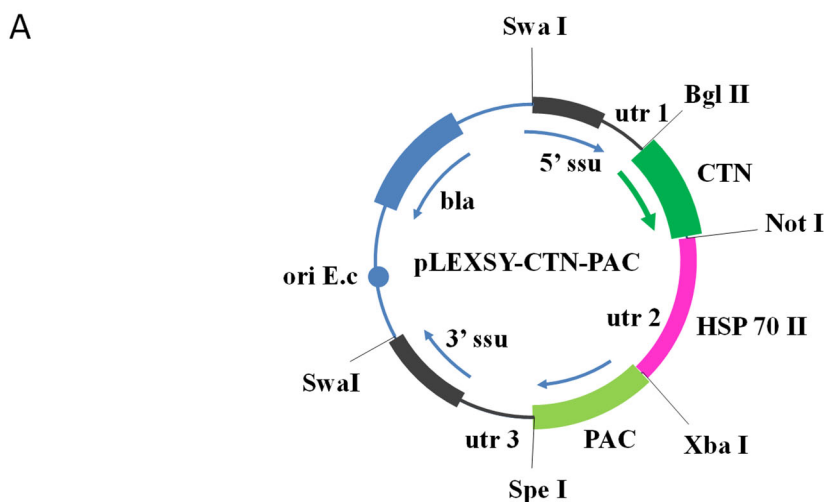


Figure 1. Engineered *Leishmania* parental strains. A. Schematic representation of pLEXSY-CTN-PAC.

B

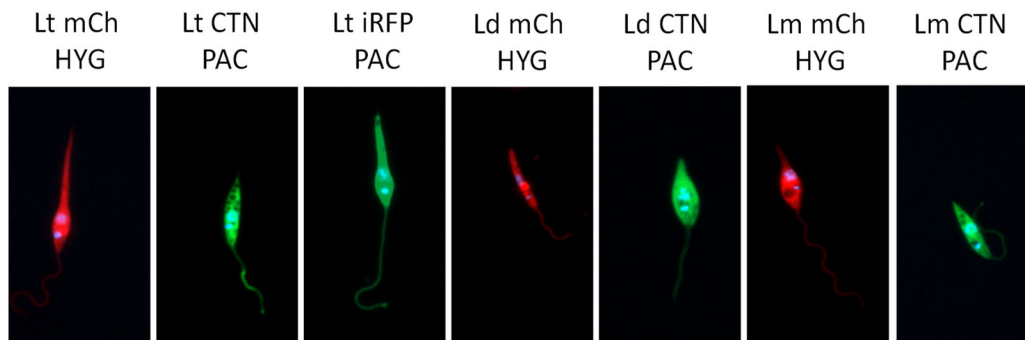


Figure 1 (cont.). Engineered *Leishmania* parental strains. B. Representative confocal microscopy pictures of promastigotes of the parental fluorescent strains of *Leishmania* used for the intraclonal and interspecies outcrossings. Lt mCh HYG: *L. tropica* mCh HYG (561 nm); Lt CTN PAC: *L. tropica* CTN PAC (488 nm); Lt iRFP PAC: *L. tropica* iRFP PAC (640 nm); Ld mCh HYG: *L. donovani* mCh HYG (561 nm); Ld CTN PAC: *L. donovani* CTN PAC (488 nm); Lm mCh HYG: *L. major* mCh HYG (561 nm); Lm CTN PAC: *L. major* CTN PAC (488 nm).

3.2. Formation and characterization of intraclonal hybrid strains *in vitro*

Stationary-phase promastigotes of *L. tropica* mCh HYG and *L. tropica* CTN PAC were mixed in the presence of a feed layer of cells isolated from *Lu. longipalpis* embryos (LULO cells) (Figure 2A), and the double selection of antibiotics (puromycin and hygromycin) was started at three different time points: days 3, 6 and 9 post-mixing. Two different experiments were carried out, and as shown in Table 3, the highest ratio of hybrid formation was achieved when antibiotic selection was performed at day 3 post-mixing.

Table 3. Intraclonal hybrid formation in *L. tropica*

	Addition of antibiotics (days post-mixing)	Percentage of positive wells
<i>L. tropica</i> mCh HYG x <i>L. tropica</i> CTN PAC	3 days	Exp. 1: 2.34% (9/384)
		Exp. 2: 10.67% (41/384)
	6 days	Exp. 1: 1.3% (5/384)
		Exp. 2: 2.6% (10/384)
	9 days	Exp. 1: 0.78% (3/384)
		Exp. 2: 0% (0/384)

These hybrids have yellow color (using both red and green channels for microscopic visualization) (Figure 2B), are resistant to puromycin and hygromycin, and show lower growth rate (lower number of promastigotes during the stationary phase) than the parental lines (Figure 2C). To confirm the inheritance of DNA from parental strains in the hybrid

filial strains, we amplified the genes conferring antibiotic resistance and the genes encoding fluorescent proteins using the primers listed in Table 1. Figure 2D shows agarose gels of the amplification products of the *L. tropica* strain before mating and in three hybrids. These results clearly show that unlike the parental strains, the hybrids contain genes from both parents either for antibiotic resistance or for fluorescence emission, thus confirming that genetic exchange events occurred during the outcrossing.

Typically, the outcrossing experiments carried out in trypanosomatids have been performed in the midgut of the vector's digestive tract between promastigotes.^{23–26,44,45} These experiments consisted of feeding the insect vectors with blood infected with both strains of parental promastigotes to be crossed, with mating taking place in the midgut of the insect (in the case of *Leishmania*). A recent paper, however, described the mating of two different strains of *L. tropica* promastigotes in axenic conditions.²⁷ The yield of hybrids obtained, although significant, was much lower than that obtained in the presence of the insect.⁴⁵ Considering these results, we performed intraclonal mating experiments *in vitro* using a feed layer of LULO cells, which were used to mimic the conditions within the insect midgut. *L. tropica* was initially chosen as model microorganism due to the fact that this species has a greater mating success in flies.⁴⁵ Stationary-phase promastigotes were selected because they are less mobile and allowed us to maintain the culture for up to 9 days without disturbing the LULO cell monolayer.

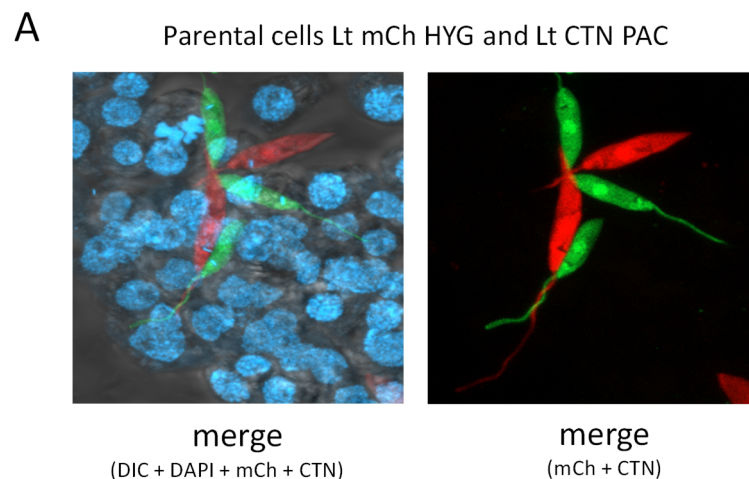


Figure 2. Characterization of intraclonal hybrids. A. Confocal microscopy showing the interaction between LULO cells and parental cell lines of *L. tropica* before mating.

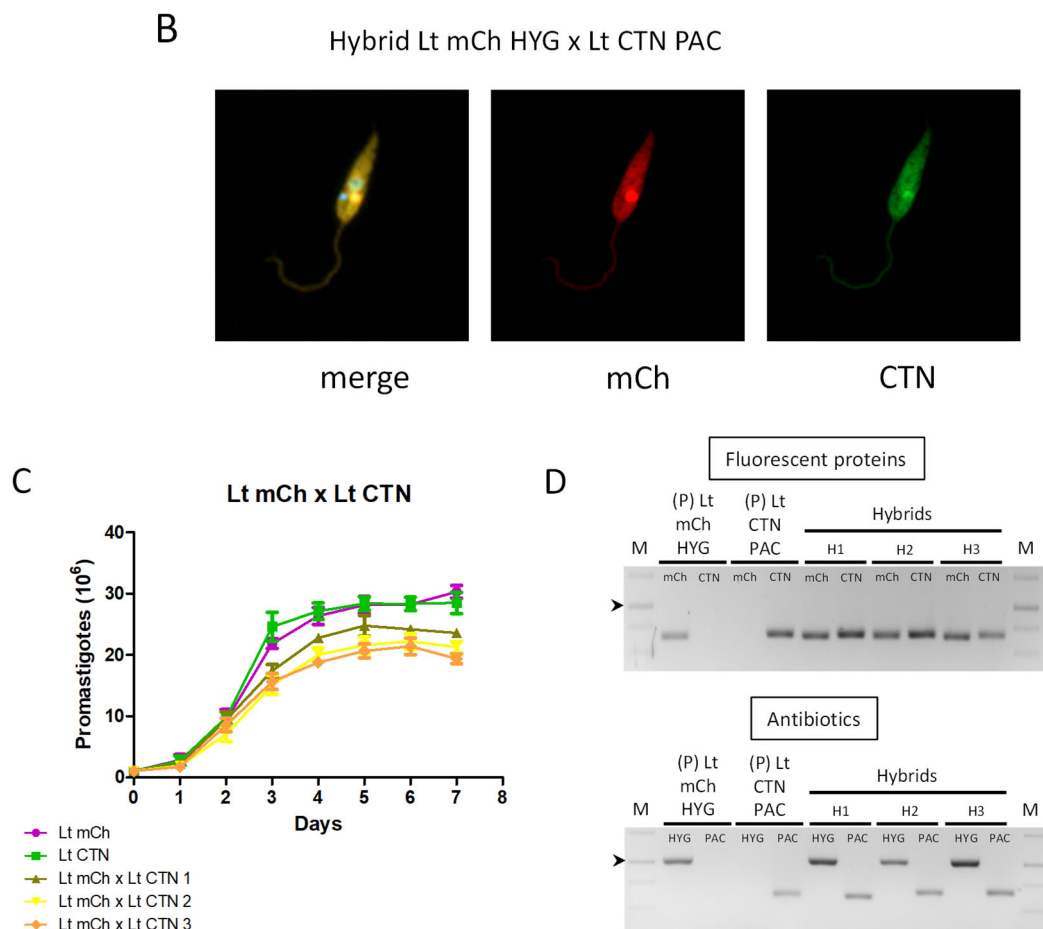


Figure 2 (cont.). Characterization of intraclonal hybrids. **B.** Representative image of confocal microscopy of one hybrid clone of *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC and fluorescence emission in the mCh (561 nm) and CTN (488 nm) channels. **C.** Growth curves (number of promastigotes in culture during 7 days) of the parental *L. tropica* mCh HYG (Lt mCh) and *L. tropica* CTN PAC (Lt CTN), and three representative intraclonal hybrids (Lt mCh x Lt CTN 1, 2 and 3). **D.** Agarose gels of the electrophoresis of the PCR products obtained after the amplification of the genes encoding fluorescent proteins (mCh and CTN) and antibiotic resistance (HYG or PAC) in the parental (P) and three representative intraclonal hybrids (H). The arrowheads indicate the 1000 bp band in the DNA molecular weight marker (M).

We also attempted to generate intraclonal hybrids for other *Leishmania* species, namely *L. major* (*L. major* mCh HYG x *L. major* CTN PAC) and *L. donovani* (*L. donovani* mCh HYG x *L. donovani* CTN PAC). Based on our previous results with *L. tropica*, we used stationary-phase promastigotes and LULO cells, and the addition of selection antibiotics was carried out on day 3 after mixing. Unfortunately, no hybrids were obtained under these conditions. Therefore, we decided to modify the promastigote phase of growth and use nectomonads in addition to stationary-phase promastigotes in the absence of LULO cells in an attempt to increase the probability of success, since as previously reported, mating-competent forms of *Leishmania* can also occur in axenic conditions.²⁷ Despite these modifications, we could not obtain intraclonal hybrids between these two *Leishmania* species. These results confirm the

better capacity of *L. tropica* to generate mating-competent forms compared to *L. major*⁴⁵ and, as shown in this work, to *L. donovani* as well.

3.3. Formation and characterization of interspecies hybrid strains *in vitro*

Interspecies hybrid formation was also attempted between *L. donovani* x *L. major*, *L. donovani* x *L. tropica* and *L. major* x *L. tropica*, using either stationary-phase promastigotes or nectomonads and in the presence and absence of LULO cells. Two different experiments were performed and addition of antibiotics was carried out on day 3 after mixing. As shown in Table 4, three hybrids (0.78% success) were obtained between stationary-phase promastigotes of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC, which have yellow color (using red and green channels for visualization) (Figure 3A left panel) and are resistant to both hygromycin and puromycin. On the other hand, two hybrids (0.52% success) were formed in the absence of LULO cells between nectomonads of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC, which have yellow color (using red and far red channels for visualization) (Figure 3A right panel) and are resistant to both antibiotics. No hybrid progeny was obtained after crossing *L. tropica* x *L. major*, which can be related to the low success rate observed for the *in vitro* mating. Indeed, interspecies crosses occurred with a low success rate, and regardless the promastigote type stage (stationary phase or nectomonads) or the presence of an insect cellular feed layer, which confirms that LULO cells are not strictly required for *in vitro* formation of hybrids.

Table 4. Interspecies crossings performed with *L. donovani*, *L. major* and *L. tropica*, and the success rate (percentage of hybrids obtained) using different mating parental lines, different promastigote stages and in the presence and absence of LULO cells.

Crossing experiments	<i>L. tropica</i> iRFP PAC x <i>L. major</i> mCh HYG	<i>L. donovani</i> mCh HYG x <i>L. tropica</i> iRFP PAC	<i>L. donovani</i> mCh HYG x <i>L. major</i> CTN PAC
Nectomonads	Exp1: 0% (0/384)	Exp 1: 0.52% (2/384)	Exp 1: 0% (0/384)
	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)
Nectomonads + LULO cells	Exp 1: 0% (0/384)	Exp 1: 0% (0/384)	Exp 1: 0% (0/384)
	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)
Stationary promastigotes	Exp 1: 0% (0/384)	Exp 1: 0% (0/384)	Exp 1: 0% (0/384)
	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)
Stationary promastigotes + LULO cells	Exp 1: 0% (0/384)	Exp 1: 0% (0/384)	Exp 1: 0% (0/384)
	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0% (0/384)	Exp 2: 0.78% (3/384)

L. donovani mCh HYG x *L. major* CTN PAC and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC hybrids showed a growth profile in between their parental strains; the highest parasite number being provided by the parental *L. donovani* mCh HYG and the lowest parasite number being provided by the other parental strains (i.e. *L. major* CTN PAC and *L. tropica* iRFP PAC) (Figure 3B). Inheritance of the parental antibiotic resistance and reporter genes in the hybrid filial strains was confirmed by PCR amplification using the primers listed in Table 1. Figure 3C shows agarose gels of the amplification products in the parental and hybrid strains, thus confirming inheritance of the above-mentioned genes.

To the best of our knowledge, this is the first report describing *in vitro* interspecies outcrossing in *Leishmania*, and in this specific case, between species with different tropism; i.e. visceral (*L. donovani*) and cutaneous (*L. tropica* and *L. major*).

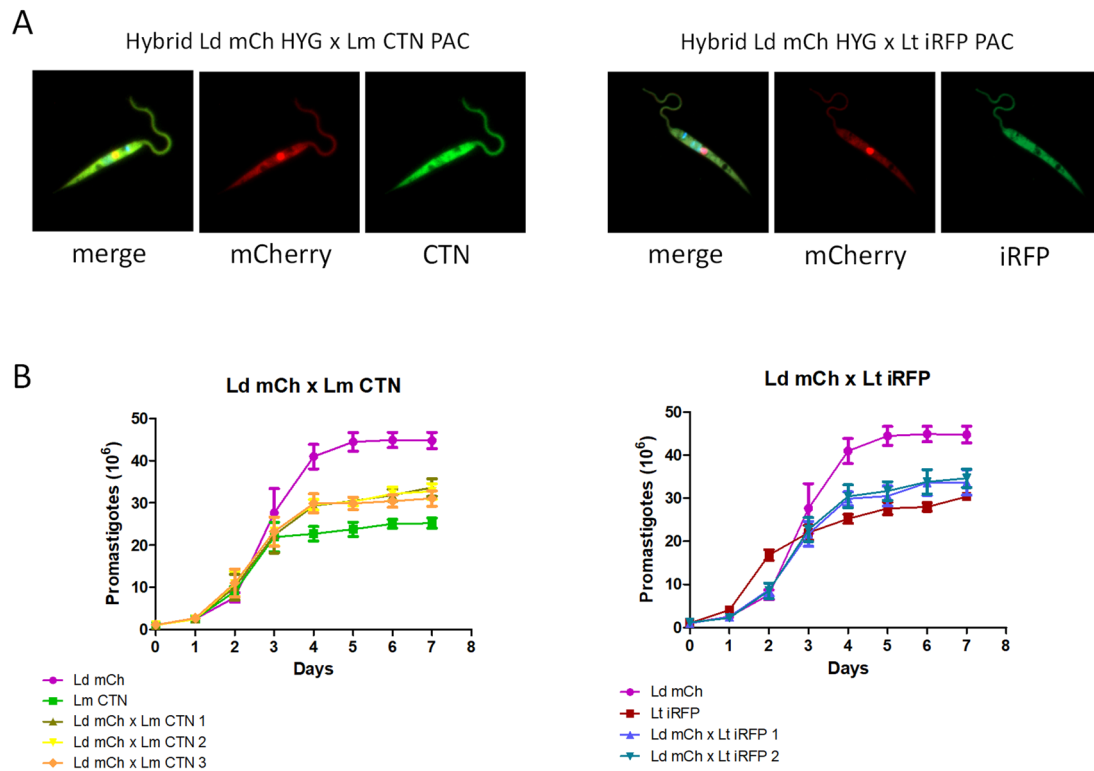


Figure 3. Characterization of interspecific hybrids. **A, left panel.** Representative merged images of confocal microscopy and fluorescence emission in the mCh (561 nm) and CTN (488 nm) channels of one hybrid clone obtained after the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld mCh HYG x Lm CTN PAC. **A, right panel.** Representative merged images of confocal microscopy and fluorescence emission in the mCh (561 nm) and iRFP (640 nm) channels of one hybrid clone obtained after the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld mCh HYG x Lt iRFP PAC. **B, left panel.** Growth curves (number of promastigotes in culture during 7 days) of the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh) and *L. major* CTN PAC (Lm CTN) and the interspecies hybrids Ld mCh x Lm CTN 1, 2 and 3. **B, right panel.** Growth curves (number of promastigotes in culture during 7 days) of the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh) and *L. tropica* iRFP PAC (Lt iRFP), and the interspecies hybrids Ld mCh x Lt iRFP 1 and 2.

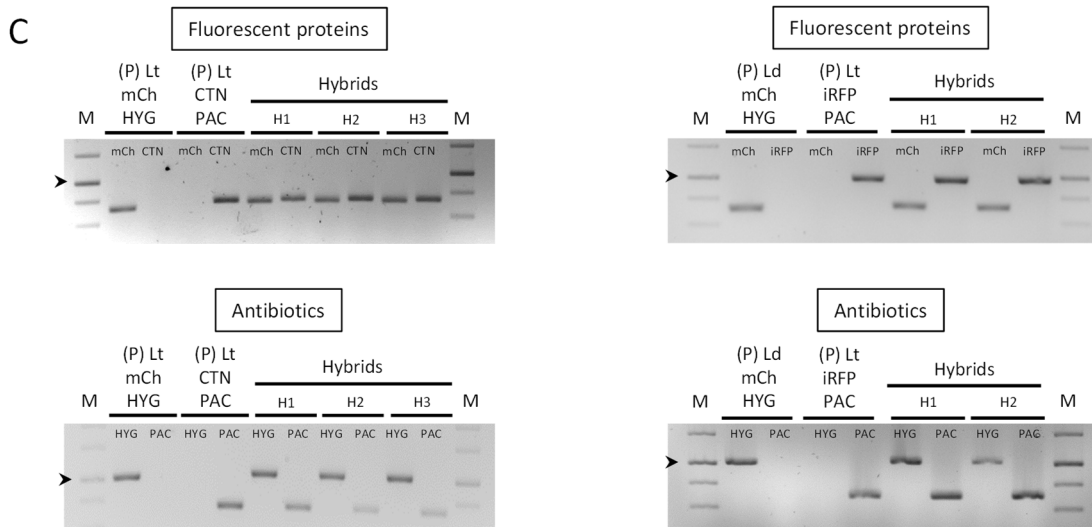


Figure 3 (cont.). Characterization of interspecific hybrids. **C, left panel.** Agarose gels of the electrophoresis of the PCR products obtained after the amplification of the genes encoding fluorescent proteins (mCh and CTN) and antibiotic resistance (HYG or PAC) in the parental strains (P) and in the three interspecies hybrids (H) obtained after the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC. **C, right panel.** Agarose gels of the electrophoresis of the PCR products obtained after the amplification of the genes encoding fluorescent proteins (mCh and iRFP) and antibiotic resistance (HYG or PAC) in the parental strains (P) and in the two interspecies hybrids (H) resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC. The arrowheads indicate the 1000 bp band in the DNA molecular weight marker (M).

3.4. Ploidy profile of hybrids

Once the hybrids were identified phenotypically, namely by their dual antibiotic resistance and mixed color detected by confocal microscopy, the ploidy of both the parental and filial generations was determined by flow cytometry in order to assess whether reductive or additive chromosome processes might have occurred after mating.

Figure 4A shows a representative chart of flow cytometry of the result of *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC crossing (only one hybrid is shown, since all the hybrids exhibited identical results). As indicated by flow cytometry, the ploidy of the parental *L. tropica* strain was 3n, whereas ploidy of the filial strains after *in vitro* mating was approximately 4n. Regarding interspecies hybrids, flow cytometry results indicated that the three hybrids obtained from *L. donovani* x *L. major* (both 2n) were 3n (Figure 4B), while the ploidy of the two hybrids obtained from the *L. donovani* x *L. tropica* offspring was 4n (Figure 4C).

These results indicate that either intraclonal or interspecies crossings give rise to additive chromosome events in the hybrid progeny. This phenomenon has been previously observed by other authors, who have obtained in their crosses a mixture of hybrids with variable ploidy,

with the presence of 2n, 3n and even 4n hybrids from 2n parents, regardless of whether the hybrids were obtained in the sandfly or *in vitro*.^{23–27} In our work, all hybrids having a DNA content of 4n resulted from at least one 3n parental strain (*L. tropica*). As far as we know, intraclonal or interespecies hybrids from 3n parentals have never been described before, either in sandflies or *in vitro*.

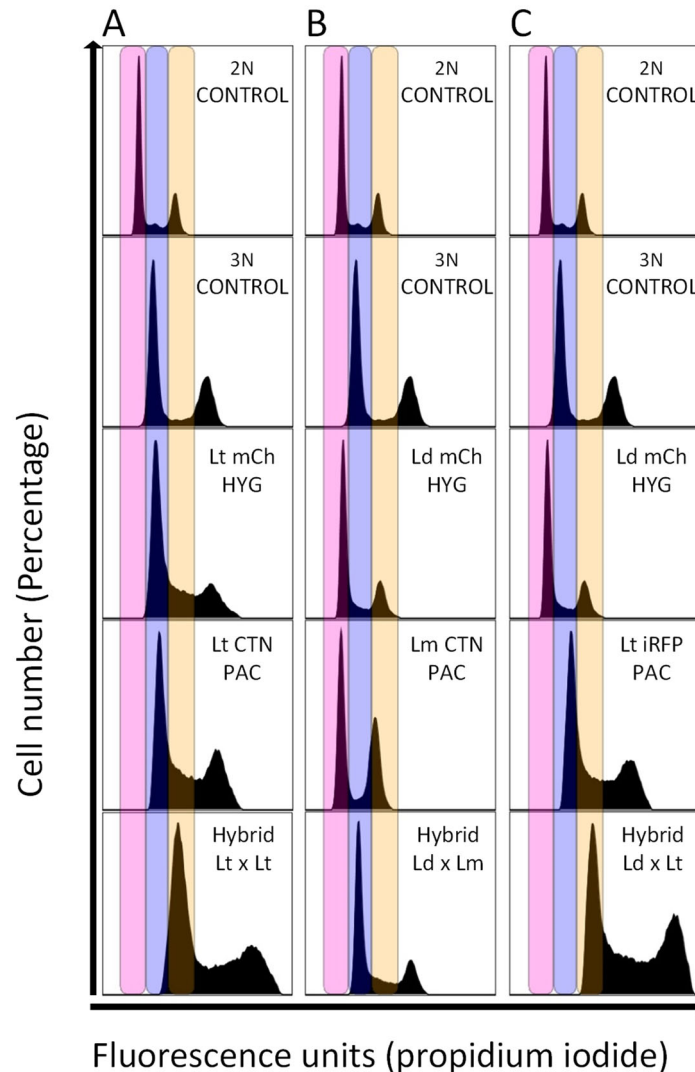


Figure 4. Analysis of the ploidy profile. **A.** Representative chart of flow cytometry showing the ploidy of *L. tropica* mCh HYG (Lt mCh HYG), *L. tropica* CTN PAC (Lt CTN PAC) and one hybrid of the intraclonal crossing (Hybrid 1 Lt x Lt). **B.** Representative chart of flow cytometry showing the ploidy of *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh HYG), *L. major* CTN PAC (Lm CTN PAC) and one hybrid of the interspecies crossing (Hybrid 1 Ld x Lm). **C.** Representative chart of flow cytometry showing the ploidy of *L. donovani* mCh HYG (Ld mCh HYG), *L. tropica* iRFP PAC (Lt iRFP PAC) and one hybrid of the interspecies crossing (Hybrid 1 Ld x Lt). *L. major* Friedlin (ploidy = 2n) and *L. braziliensis* Mb2904 (ploidy = 3n) were used as ploidy controls (2N CONTROL and 3N CONTROL, respectively) in order to assess the ploidy of the rest of the parasites.

3.5. Genotypic characterization of interspecies hybrids

Genotypic characterization of the interspecies hybrids was initially performed by SNP-CAPs in ten genes encoding the following proteins: calmodulin-binding protein, ABC transporter, Sec20, Rad9, cytoplasmic L-asparaginase i-like protein, paraflagellar rod protein, ribosomal protein L22p/L17e, fumarate hydratase, aquaglyceroporin 1, and 2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, which are present in different *Leishmania* chromosomes as indicated in Table 2. For this purpose, these genes were amplified with specific primers and cut with suitable restriction enzymes (see Table 2 for details). Amplification and restriction analysis allowed us to characterize the SNPs present in the progenitor strains and in the interspecies hybrids resulting from crosses of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Figure 5A).

After amplification and restriction analyses it can be observed that the bands corresponding to both progenitors are visible in the three hybrids of *L. donovani* x *L. major* outcrossing, which would correspond to a biparental inheritance produced by a genetic exchange after mating. As an exception we can highlight the absence of the *L. major* allele of the gene located on chromosome 1 in one of the hybrids (Figure 5A top panel) that can be due to a loss of heterozygosity and/or aneuploidy in *Leishmania*, as it has been previously reported.²⁶ Similar conclusions are raised from the crossing of *L. donovani* x *L. tropica* (Figure 5A bottom panel), where the biparental inheritance of the hybrids appears again represented by the bands corresponding to the enzymatic restriction of the amplified gene of both progenitors.

We also analysed the composition of A2 gene in the hybrids after mating. The interest of the product of A2 gene is because it has been involved in the organic tropism of visceralizing *Leishmania* strains including *L. donovani*.⁴⁶ In this species, the A2 gene is represented by a multicopy cluster (tandem-repeats) in chromosome 22 and encodes a family of A2 proteins with 10-amino acid repeated sequences. However, a single and truncated pseudogene is present in the species with cutaneous tropism, namely *L. major* and *L. tropica*.^{46,47} For the amplification of this gene, we used the primers L2/R3 (Table 1), which were previously described by Garin et al. (2005)⁴⁶ and later used by Romano et al. (2014).²⁶ As we can see in Figure 5B, the parental *L. donovani* strain shows a main band near 500 bp, whereas *L. major* and *L. tropica* show a main band over 250 bp, which correspond to the pattern amplified by these primers in these species.^{46,48} The presence of the main amplification bands that are visible in both parental strains and in the hybrid clones from both crosses, further demonstrates biparental inheritance (Figure 5B).

Finally, nuclear inheritance was also demonstrated by sequencing the actin gene located on chromosome 4, which was amplified using primers TOX83 and TOX84 (Table 1). Sequence analysis (Figure 5C) of several regions confirmed the inheritance of the SNPs located at positions 462 and 465 of the actin gene (from the initial ATG codon) in the hybrids obtained from both interspecies outcrossings. The parental *L. tropica* strain turned out to be heterozygous for some SNPs. This led to the visualization of triple nucleotide peaks in the sequencing fluorograms of *L. donovani* x *L. tropica* hybrids (Figure 5C right panel), which inherited at least two copies of the parental *L. tropica* and at least one copy of the parental *L. donovani* actin gene.

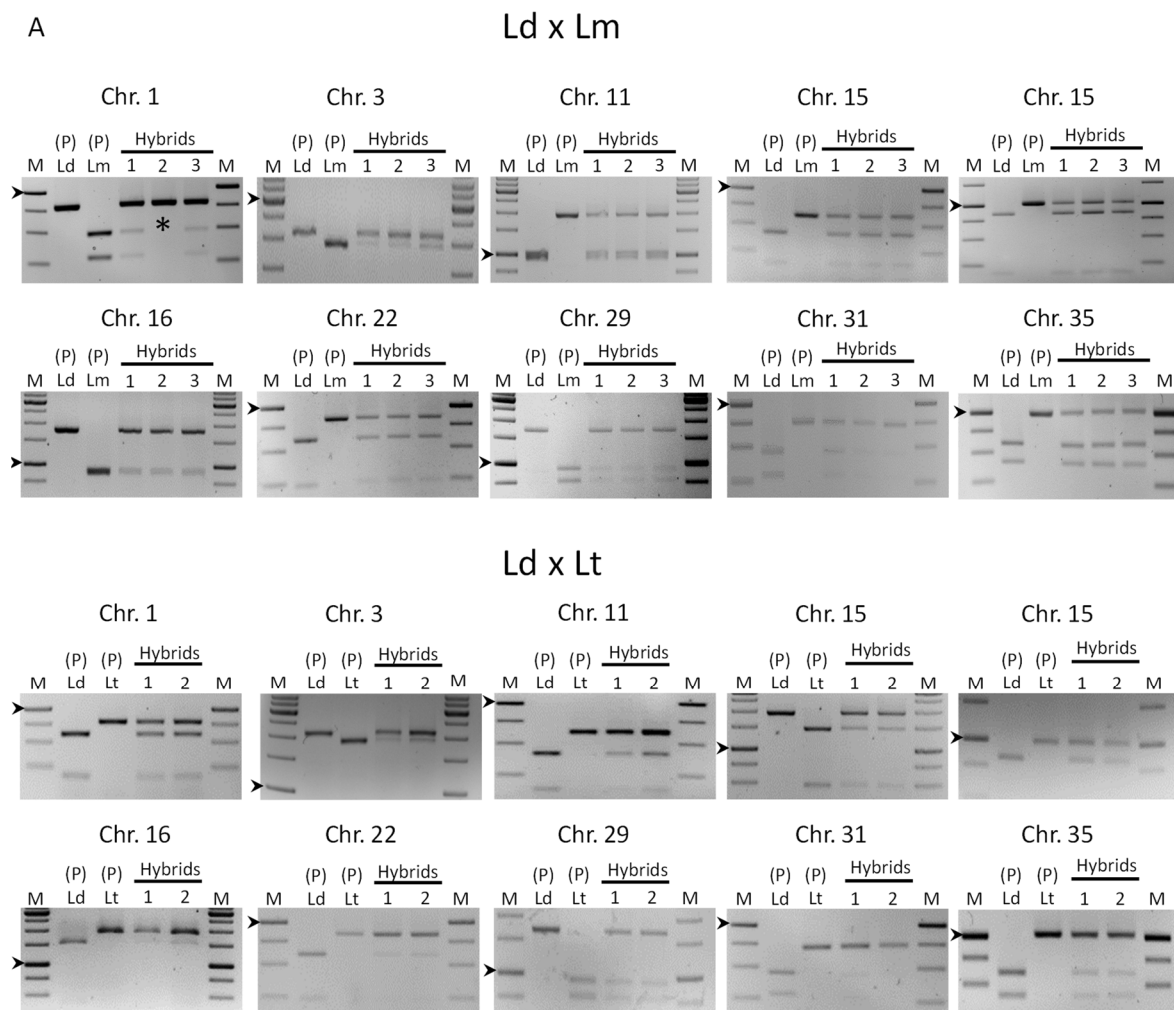


Figure 5. Characterization of the nuclear inheritance of the interspecies hybrids. A. Agarose gels of the SNP-CAPs analysis showing the DNA products after PCR amplification and enzymatic digestion of the ten genes present in nine different chromosomes. The electrophoretic profile of the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC is shown in the top panel, whereas the electrophoretic profile of the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC is shown in the bottom panel. Note the absence of the *L. major* allele of the gene located on chromosome 1 in hybrid number two (indicated with an asterisk).

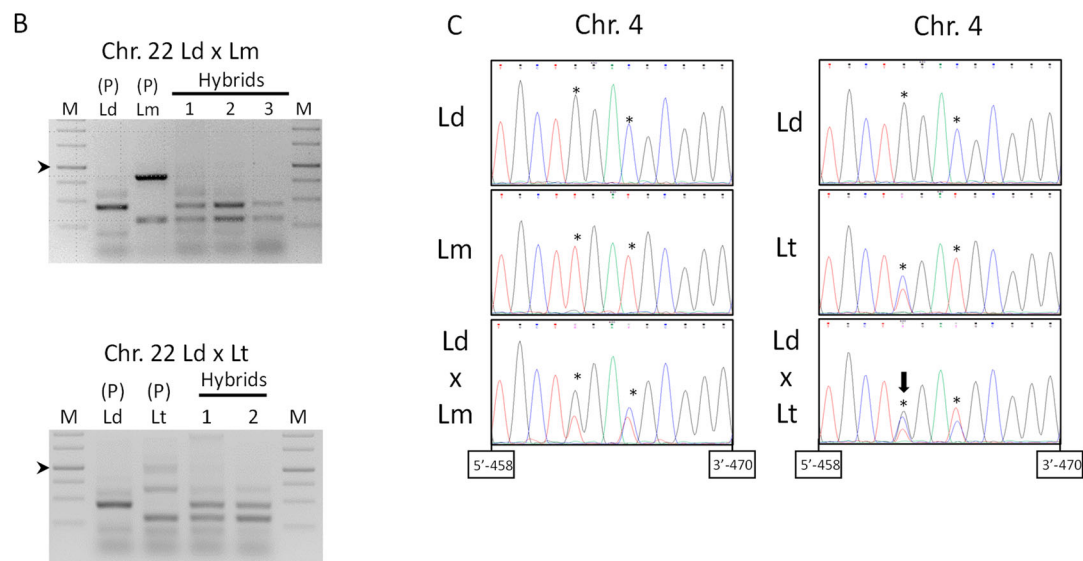


Figure 5 (cont.). Characterization of the nuclear inheritance of the interspecies hybrids. **B.** Agarose gels of the PCR amplification of the A2 gene in the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (top panel), and in the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (bottom panel). The arrowheads indicate the 1000 bp band in the DNA molecular weight marker (M). **C.** Fluorograms showing the sequence of part of the actin gene and some SNPs (marked with an asterisk) in the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. major* CTN PAC (Lm) and *L. tropica* iRFP PAC (Lt), and one representative hybrid of the outcrossing between *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld x Lm) and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld x Lt). Note the triple nucleotide peaks in the fluorograms of *L. donovani* x *L. tropica* hybrid (arrow in the SNP located at position 462 in the right panel).

The origin of the extra chromosome sets in the different hybrids was determined as indicated in the Methods section. Figure 6A shows the SNP-CAPs digestion products for different genes encoding the following proteins: calmodulin-binding protein (chromosome 1), cytoplasmic L-asparaginase i-like protein (chromosome 15), ribosomal protein L22p/L17e (chromosome 22) and 2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit (chromosome 35) (see Table 2 for details), and the ratios between the intensity of the upper band from the parental *L. donovani* and the uncut band from the other parental (*L. major* or *L. tropica*) in the corresponding hybrid clones. Results indicated that the hybrids obtained from *L. donovani* x *L. major* crosses, inherited the extra trisomic chromosomes 15, 22 and 35 from *L. donovani* (Figure 6A top panel). On the contrary, the hybrids obtained from *L. donovani* x *L. tropica* crossing seem to have inherited the extra chromosomes 1, 22 and 35 from *L. tropica* (Figure 6A bottom panel). This is consistent with the results represented in Figure 5C, which showed that at least two copies of the actin gene would have been inherited from *L. tropica*. Statistical analysis of the ratios showed that *L. donovani* x *L. major* hybrids are grouped within the category 2:1 (*L. donovani*:*L. major*) (Figure 6B), whereas *L. donovani* x *L. tropica* hybrids are grouped within the category 1:3 (*L. donovani*:*L. tropica*) (Figure 6C), thus

confirming the inheritance of extrachromosome sets from *L. donovani*, in the case of *L. donovani* x *L. major* hybrids (3n), or *L. tropica* in the case of *L. donovani* x *L. tropica* hybrids (4n).

The differences in ratios for each locus may reflect mosaic aneuploidy in the progeny. This process has been demonstrated in several *Leishmania* species⁴⁹, and has been suggested to represent a unique source of adaptability for the parasites to new environment.⁵⁰

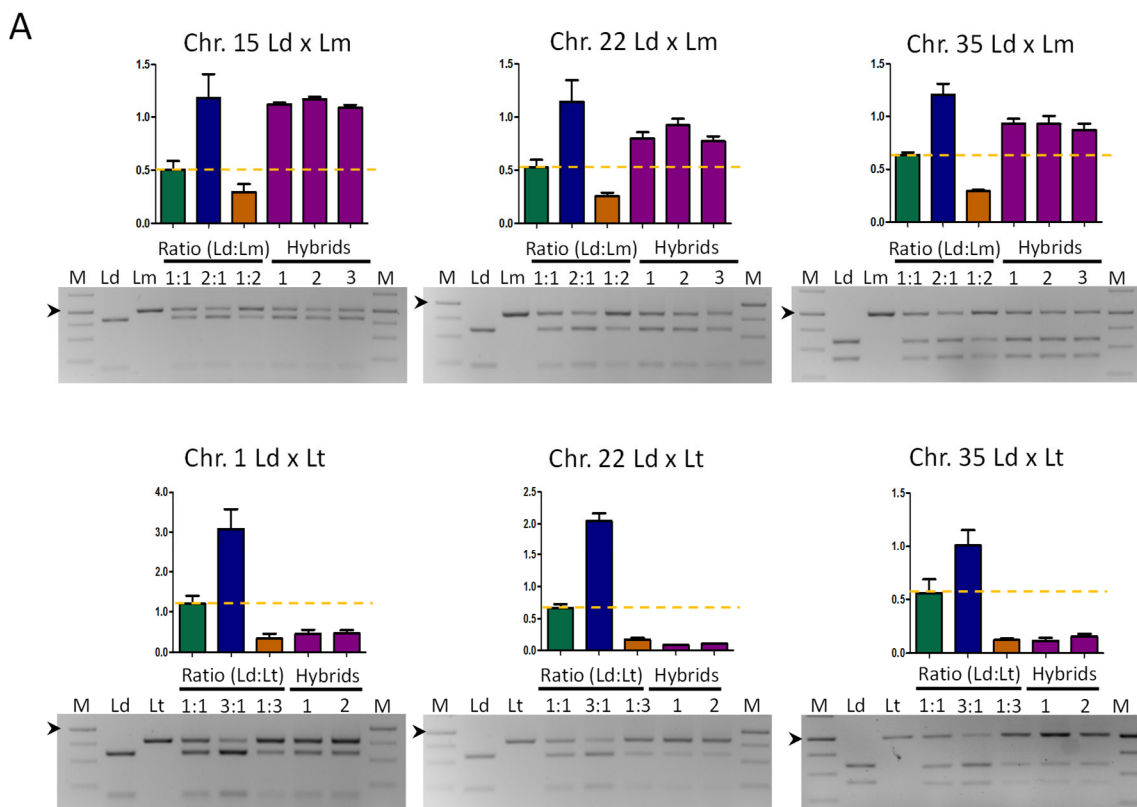
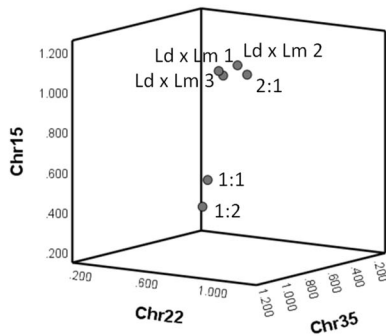


Figure 6. Characterization of the inheritance of extra chromosome sets in the interspecies hybrid clones. A. Agarose gels of the SNP-CAPs analysis showing the DNA products after PCR amplification and enzymatic digestion of three loci present in chromosomes 2, 22 and 35. The top panel shows the electrophoretic profile of *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. major* CTN PAC (Lm) and three hybrids (Ld x Lm), and the ratios between the intensity of the upper band from the parental *L. donovani* and the uncut upper band from the other parental *L. major* in the corresponding hybrid clones. Simulated 3n were created by mixing parental DNA in 1:1, 1:2 and 2:1 ratio (*L. donovani*:*L. major*). The bottom panel shows the electrophoretic profile of *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. tropica* iRFP PAC (Lt) and two hybrids (Ld x Lt), and the ratios between the intensity of the upper band from the parental *L. donovani* and the uncut upper band from the other parental *L. tropica* in the corresponding hybrid clones. Simulated 4n were created by mixing parental DNA in 1:1, 1:3 and 3:1 ratio (*L. donovani*:*L. tropica*). The arrowhead indicates 1000 bp in the DNA molecular weight marker (M).

B Ld mCh HYG x Lm CTN PAC

Belonging cluster			
Case number	Name	Cluster	Distance
1	1:1	1	.000
2	2:1	2	.299
3	1:2	3	.000
4	Ld x Lm 1	2	.130
5	Ld x Lm 2	2	.043
6	Ld x Lm 3	2	.181



C Ld mCh HYG x Lt iRFP PAC

Belonging cluster			
Case number	Name	Cluster	Distance
1	1:1	1	.000
2	3:1	2	.000
3	1:3	3	.144
4	Ld x Lt 1	3	.132
5	Ld x Lt 2	3	.063

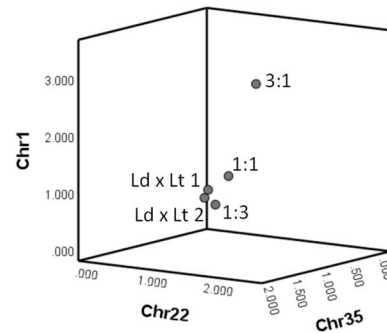
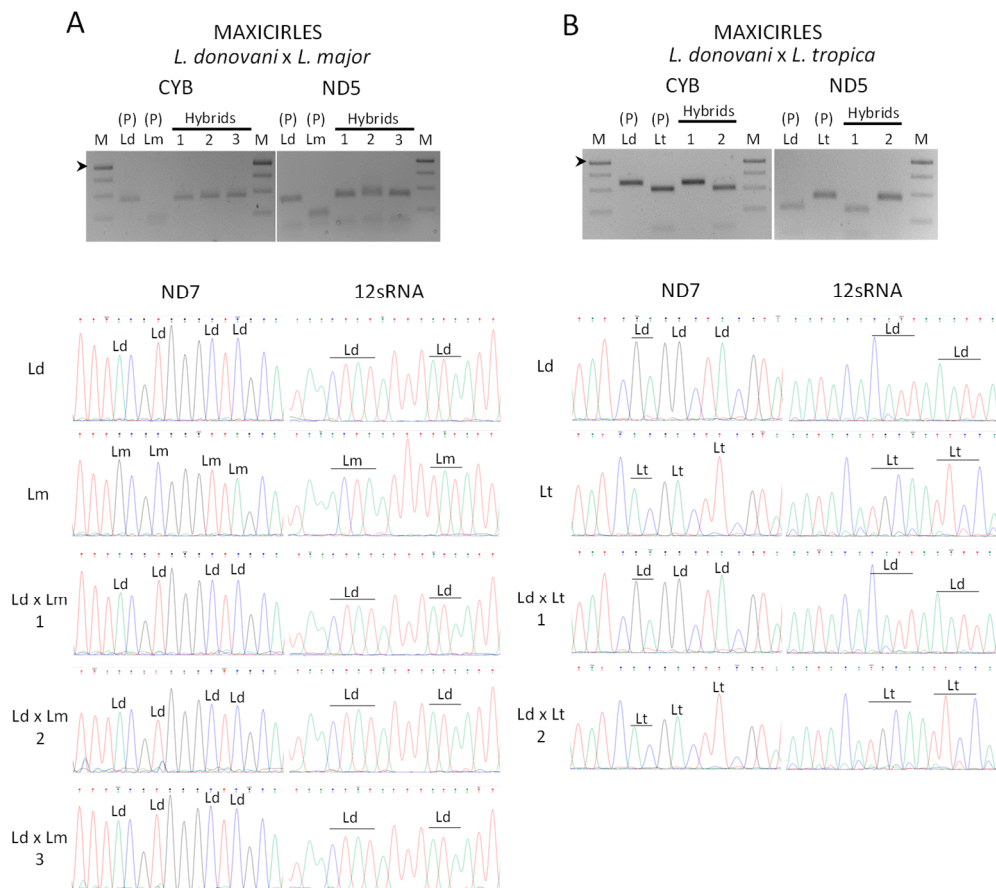


Figure 6 (cont.). Characterization of the inheritance of extra chromosome sets in the interspecies hybrid clones. B, C. Statistical representation by k-means analysis in SPSS of the extrachromosome inheritance of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (Ld mCh HYG x Lm CTN PAC) hybrids, which are clustered together with ratio 2:1 (LdxLm) (B), and *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (Ld mCh HYG x Lt iRFP PAC) hybrids, the latter being clustered together with ratio 1:3 (LdxLt) (C).

3.6. Extranuclear DNA inheritance of interspecies hybrid clones

The inheritance of maxi and minicircles of extrachromosomal kDNA in the interspecies hybrids was also analysed. For the study of the inheritance of maxicircles, four genes (*Cyb*, *ND5*, *ND7* and *12sRNA*) were analysed. Inheritance of *Cyb* and *ND5* was assessed by SNP-CAPs (see Table 2 for details). As seen in the top panel of Figure 7A, interspecies hybrid clones of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC only exhibit the restriction pattern of the parental *L. donovani* strain for these two genes. In the case of the *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC interspecies outcrossing, one of the hybrid clones showed a restriction pattern for *Cyb* and *ND5* similar to that observed for *L. donovani*, whereas the other hybrid clone showed a behavior similar to the other parental (i.e. *L. tropica*) (Figure 7B top panel). In order to confirm this phenomenon, the analysis of the inheritance of *ND7* and *12sRNA* was performed by sequencing these genes after amplification with the primers TOX97, TOX98 and TOX101, TOX102 (Table 1). Fluorograms indicated that in the three hybrid clones *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC, the SNPs were inherited from the parental *L. donovani* strain (Figure 7A bottom panel), whereas one of the hybrid clones of the *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC outcrossing inherited the SNPs from

L. donovani and the other hybrid clone inherited the SNPs from *L. tropica* (Figure 7B bottom panel). These results indicate that inheritance of maxicircles is uniparental or alternatively, that genetic information contained in maxicircles from one of the parental strains can be lost by genetic drift, as it has been previously suggested in *T. brucei*.³¹ For the study of the inheritance of minicircles, PCR experiments were conducted with primers TOX73 and TOX74, which amplify near 780 bp from a conserved region (MIN1) in minicircle kDNA in *Leishmania* spp.³⁹ (Table 1), and with primers TOX75 and TOX76 (Table 1), the latter amplifying a variable region of minicircles (MIN2) and generating multi-sized products.⁴⁰ As shown in Figure 7C, hybrids from either *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC or *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC exhibited an amplification pattern of MIN1 that included bands from both parental strains, although with different intensity. In the case of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC, the most intense band in the three hybrid clones corresponds to that inherited from *L. donovani*, which correlates well with the results obtained with the inheritance of maxicircles. The pattern for MIN2 in hybrids from either *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC or *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC, provided a more precise picture of the presence of bands from both parental strains, thereby suggesting the biparental inheritance of minicircles.



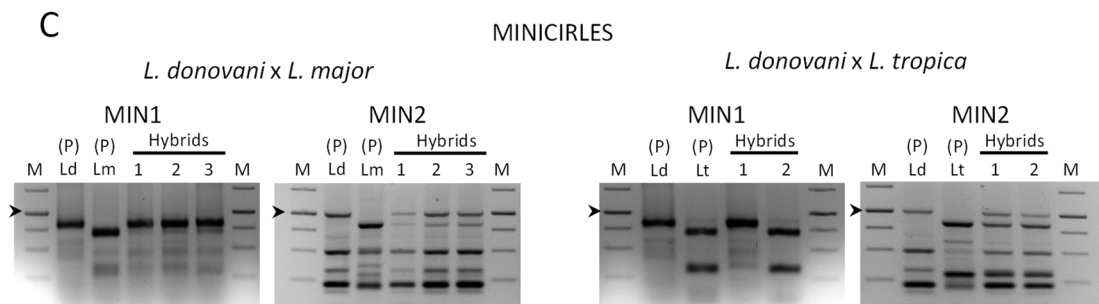


Figure 7. Characterization of the inheritance of kDNA in the interspecies hybrid clones. A, B, top panels. Agarose gels of the SNP-CAPs analysis showing the DNA products after PCR amplification and enzymatic digestion of *Cyb* and *ND5* genes. The electrophoretic profile of the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. major* CTN PAC (Lm) (A), or the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. tropica* iRFP PAC (Lt) (B), are shown. **A, B bottom panels.** Fluorograms showing the sequence of part of the *ND7* and *12 sRNA* genes with some SNPs, which have been indicated as Ld (*L. donovani*) and Lm (*L. major*) in the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. major* CTN PAC (Lm) and in their clonal hybrids (LdxLm) 1, 2 and 3 (A), or as Ld (*L. donovani*) and Lt (*L. tropica*) in the parental strains *L. donovani* mCh HYG (Ld), *L. tropica* iRFP PAC (Lt) and in their clonal hybrids (LdxLt) 1 and 2 (B). **C.** Agarose gels showing the band profile after amplification of a conserved region (MIN1) or a variable region (MIN2) of minicircles in the parental lines [P (Ld, Lm)] and three hybrids [Hybrids (1, 2, 3)] resulting from the outcrossing of *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. major* CTN PAC (Lm) (left panel), or in the parental lines [P (Ld, Lt)] and two hybrids [Hybrids (1, 2)] resulting from the outcrossing *L. donovani* mCh HYG (Ld) x *L. tropica* iRFP PAC (Lt) (right panel). The arrowhead indicates 1000 bp in the DNA molecular weight marker (M).

3.7. Infectivity of intraclonal and interspecies hybrids

In vitro infection of hybrid clones obtained from different mating experiments, was first checked in RAW cells by confocal microscopy (Figure 8A). Once the ability of these parasites to infect macrophages was confirmed *in vitro*, the infectivity of both promastigotes and amastigotes was tested in BMMs derived from Balb/c mice by microscopy analysis after Giemsa staining (Figure 8B). The number of parasites infecting each BMMs was determined after the analysis of 100 BMMs in triplicate and represented for each hybrid (Figure 8C). Results indicate that promastigotes from intraclonal hybrid number 1 showed an infectivity similar to both parental strains, unlike hybrid clone number 2 and 3, which showed lower values than the parental *L. tropica* mCh HYG only. Amastigotes of all the intraclonal hybrids showed a reduction in their infection ability regarding *L. tropica* mCh HYG. Interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC showed infectivity values between both parental strains either with promastigotes or with amastigotes. However, promastigotes and amastigotes of interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC exhibited reduced infectivity values in comparison with both parental strains (Figure 8C).

Regarding the number of macrophages that hybrid and parental parasites were able to infect (Figure 8D), intraclonal hybrids did not show significant differences with parental strains when promastigotes were used. On the contrary, when amastigotes were chosen for infection, hybrids *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC 2 and 3 showed a significant decrease regarding the parental *L. tropica* mCh HYG. Infection with promastigotes of the interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC did not show significant differences regarding *L. donovani* mCh HYG, although a significant increase in the percentage of infected BMMs was observed regarding the other parental strain *L. major* CTN PAC. Infection with amastigotes of these interspecies hybrids provided a similar profile, except for hybrid 3, which exhibited a significant decrease in the percentage of infected BMMs regarding *L. donovani* mCh HYG. Infection with either promastigotes or amastigotes of the interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC, in general, provided a reduction in the percentage of infected BMMs regarding both parental strains, this decrease being more patent in the case of interspecies hybrid 2 (Figure 8D).

Hybrid promastigotes were also able to infect mice, and amastigotes were recovered from the spleens of infected mice. The recovered parasites maintained double antibiotic resistance, thus confirming stability of the hybrids upon *in vivo* infection.

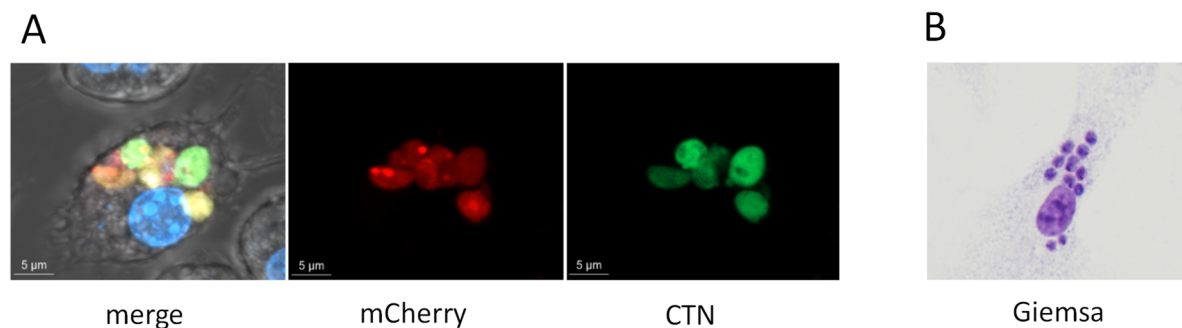


Figure 8. Infectivity of intraclonal and interspecies hybrids. **A.** Representative image of confocal microscopy of a RAW cell infected with one hybrid of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC. Merge and fluorescent pictures in the mCh (561 nm) and CTN (488 nm) channels are shown. **B.** Representative image of BMMs infected with amastigotes of one hybrid of *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC and stained with Giemsa.

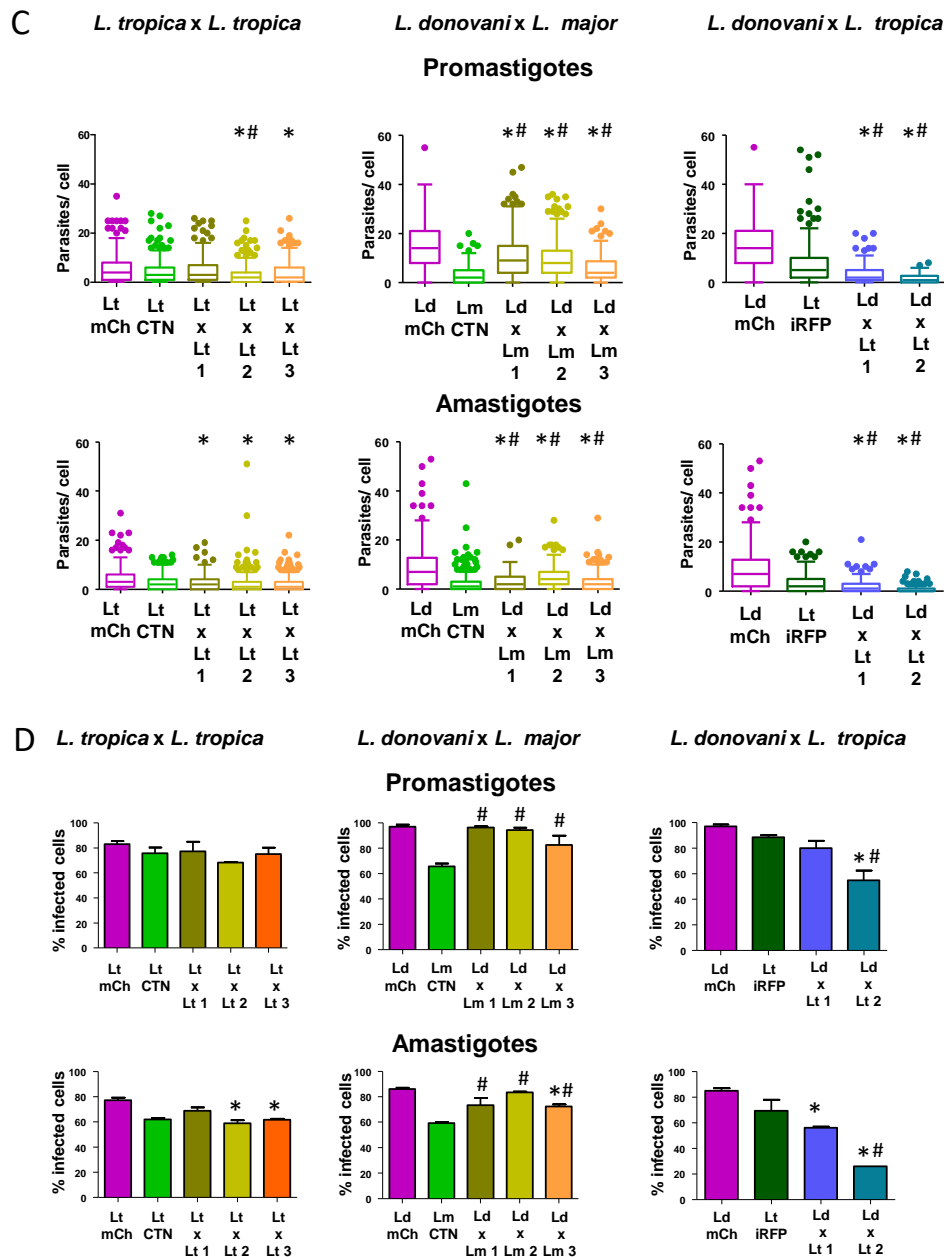


Figure 8 (cont.). Infectivity of intraclonal and interspecies hybrids. **C.** Box plots representing the number of amastigotes present within each BMM after *in vitro* infection of either promastigotes or amastigotes of *L. tropica* mCh HYG (*Lt* mCh), *L. tropica* CTN PAC (*Lt* CTN), three intraclonal hybrids *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC (*Lt* x *Lt* 1, 2 and 3), *L. donovani* mCh HYG (*Ld* mCh), *L. major* CTN PAC (*Lm* CTN) three interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (*Ld* x *Lm* 1, 2 and 3), *L. tropica* iRFP PAC (*Lt* iRFP), and two interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (*Ld* x *Lt* 1 and 2). **D.** Bar graphs representing the percentage of infected BMMs after *in vitro* infection of either promastigotes or amastigotes of *L. tropica* mCh HYG (*Lt* mCh), *L. tropica* CTN PAC (*Lt* CTN), three intraclonal hybrids *L. tropica* mCh HYG x *L. tropica* CTN PAC (*Lt* x *Lt* 1, 2 and 3), *L. donovani* mCh HYG (*Ld* mCh), *L. major* CTN PAC (*Lm* CTN) three interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. major* CTN PAC (*Ld* x *Lm* 1, 2 and 3), *L. tropica* iRFP PAC (*Lt* iRFP), and two interspecies hybrids *L. donovani* mCh HYG x *L. tropica* iRFP PAC (*Ld* x *Lt* 1 and 2). Differences were considered as significant when $p < 0,05$ and in a Kruskal-Wallis test (C) or in a one-way ANOVA analysis (D) (represented with an asterisk regarding the first parental line and with a hash regarding the second parental line).

In conclusion, we have demonstrated in this work that outcrossing in *Leishmania* can also occur under *in vitro* conditions, even between species of different tropism and even if a parental strain contains a ploidy of 3n. In addition, the resultant 4n hybrids are stable after *in vivo* infection. These results contribute to the understanding of sexual reproduction in this trypanosomatid and suggest that mechanisms of virulence and drug resistance can be acquired by *Leishmania* through this process.

Author Contributions: This paper has multiple authors and our individual contributions were as below. C.G.C.: performed the experiments, acquisition, analysis, and interpretation of data and wrote the paper. F.J.B. provided the LULO cell line, as well as the culture procedures. R.M.R, R.B.F and C.G.E. edited the manuscript and provided scientific input. Y.P.P. and B.D.A. helped in conceptualizing the idea, interpretation of data, and editing the draft.

Acknowledgments:

The first author C.G.C (LE255-16) as well as B.D.A (LE208-17) are recipients of Junta de Castilla y León (JCyL) and European Social Found (ESF)'s Fellowships Schem for Doctoral Training Programs. This research was funded by MINECO; SAF2017-83575-R to RMR.

Author summary

Neglected Tropical Diseases (NTDs) represent a serious threat to humans, especially for those living in poor or developing countries. Leishmanianiosis is considered a zoonotic NTD transmitted by the bite of female phlebotomine sandflies, and is manifested mainly as a visceral form (caused by *L. infantum* and *L. donovani*) and a cutaneous form (caused by *L. major*, *L. tropica* and *L. braziliensis*). Although it is now known that sexual reproduction occurs in these parasites, more studies are necessary to characterize the ability of *Leishmania* to generate hybrids, which may represent an important mechanism for virulence, drug resistance of adaptation to the host immune system. Therefore, several experiments were conducted to generate either intraclonal or interspecies hybrids *in vitro*. Results demonstrated that hybrids can be formed even with outcrosses between parasites causing visceral and cutaneous forms of the disease. Characterization of hybrids in terms of ploidy, kDNA content, growth rate and infection capacity provide important information about sexual reproduction in these parasites.

References

1. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: A review. *F1000Res*. 2017;6:750. doi:10.12688/f1000research.11120.1
2. Telleria EL, Martins-Da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Cseko YM. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*. 2018;145(10): 1336–1353. doi:10.1017/S0031182018001014
3. Caridha D, Vesely B, van Bocxlaer K, Arana B, Mowbray CE, Rafati S, et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2019;11: 106-117. doi:10.1016/j.ijpddr.2019.06.003
4. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr*. 2021;S0001-7310(21)00108. doi:10.1016/j.ad.2021.02.008
5. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496): 1561-1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
6. Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El Hassan IM, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(2): 87-98. doi:10.1016/S1473-3099(03)00517-6
7. Peacock L, Ferris V, Sharma R, Sunter J, Bailey M, Carrington M, et al. Identification of the meiotic life cycle stage of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108: 3671-3676. doi:10.1073/pnas.1019423108
8. Peacock L, Kay C, Farren C, Bailey M, Carrington M, Gibson W. Sequential production of gametes during meiosis in trypanosomes. *Commun Biol*. 2021;4(1): 555. doi:10.1038/s42003-021-02058-5
9. Peacock L, Bailey M, Carrington M, Gibson W. Meiosis and haploid gametes in the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Curr Biol*. 2014;24(2): 181-186. doi:10.1016/j.cub.2013.11.044
10. Gibson W, Stevens J. Genetic exchange in the Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*. 1999;43: 1–46. doi:10.1016/s0065-308x(08)60240-7
11. de Meeûs T, Balloux F. Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: A simulation study. *Infect Genet Evol*. 2004;4(4): 345–351. doi:10.1016/j.meegid.2004.05.002
12. Prugnolle F, De Meeus T. Apparent high recombination rates in clonal parasitic organisms due to inappropriate sampling design. *Heredity*. 2010;104(2): 135-140. doi:10.1038/hdy.2009.128
13. Ramírez JD, Llewellyn MS. Reproductive clonality in protozoan pathogens - Truth or artefact? *Mol Ecol*. 2014;23(17): 4195-4202. doi:10.1111/mec.12872
14. Rougeron V, de Meeûs T, Ouraga SK, Hide M, Bañuls AL. “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*; 2010;6(8):e1001004. doi:10.1371/journal.ppat.1001004
15. Rougeron V, De Meeûs T, Bañuls AL. A primer for *Leishmania* population genetic studies. *Trends Parasitol*. 2015;31(2): 52-59. doi:10.1016/j.pt.2014.12.001
16. Jenni L, Marti S, Schweizer J, Betschart B, Le Page RWF, Wells JM, et al. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*. 1986;322(6075): 173-175. doi:10.1038/322173a0
17. Gibson W, Whittington H. Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: Selection of hybrid trypanosomes by introduction of genes conferring drug resistance. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;60(1): 19-26. doi:10.1016/0166-6851(93)90024-R
18. Gibson W, Garside L, Bailey M. Trisomy and chromosome size changes in hybrid trypanosomes from a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;51(2): 189-199. doi:10.1016/0166-6851(92)90069-V

19. Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. Mating compatibility in the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors*. 2014;7: 78. doi:10.1186/1756-3305-7-78
20. Bingle LEH, Eastlake JL, Bailey M, Gibson WC. A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the *in situ* detection of mating events. *Microbiology*. 2001;147(Pt 12): 3231-3240. doi:10.1099/00221287-147-12-3231
21. Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors*. 2008;1(1): 4. doi:10.1186/1756-3305-1-4
22. Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors*. 2009;2(1): 43. doi:10.1186/1756-3305-2-43
23. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 2009;324(5924): 265–268. doi:10.1126/science.1169464
24. Inbar E, Akopyants NS, Charmoy M, Romano A, Lawyer P, Elnaiem DEA, et al. The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003672. doi:10.1371/journal.pgen.1003672
25. Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Jiménez M, Molina R, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, et al. First evidence of intraclonal genetic exchange in trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3075. doi:10.1371/journal.pntd.0003075
26. Romano A, Inbar E, Debrabant A, Charmoy M, Lawyer P, Ribeiro-Gomes F, et al. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47): 16808-16813. doi:10.1073/pnas.1415109111
27. Louradour I, Ferreira TR, Ghosh K, Shaik J, Sacks D. *In vitro* generation of *Leishmania* hybrids. *Cell Rep*. 2020;31(2):107507. doi:10.1016/j.celrep.2020.03.071
28. Telittchenko R, Descoteaux A. Study on the occurrence of genetic exchange among parasites of the *Leishmania mexicana* complex. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10: 607253. doi:10.3389/fcimb.2020.607253
29. Lin RH, Lai DH, Zheng LL, Wu J, Lukeš J, Hide G, et al. Analysis of the mitochondrial maxicircle of *Trypanosoma lewisi*, a neglected human pathogen. *Parasit Vectors*. 2015;8:665. doi:10.1186/s13071-015-1281-8
30. Gibson W, Garside L. Kinetoplast DNA minicircles are inherited from both parents in genetic hybrids of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;42(1): 45-53. doi:10.1016/0166-6851(90)90111-X
31. Turner CMR, Hide G, Buchanan N, Tait A. *Trypanosoma brucei*: Inheritance of kinetoplast DNA maxicircles in a genetic cross and their segregation during vegetative growth. *Exp Parasitol*. 1995;80(2): 234-241. doi:10.1006/expr.1995.1029
32. Calvo-Álvarez E, Stamatakis K, Punzón C, Álvarez-Velilla R, Tejería A, Escudero-Martínez JM, et al. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3): e0003666. doi:10.1371/journal.pntd.0003666
33. Rey GJ, Ferro C, Bello FJ. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(1): 103-110. doi:10.1590/S0074-02762000000100017
34. Robinson KA, Beverley SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA

- interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;128(2): 217-228. doi:10.1016/S0166-6851(03)00079-3
35. Calvo-Álvarez E, Guerrero NA, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Requena JM, Punzón C, et al. Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11): e1927. doi:10.1371/journal.pntd.0001927
 36. McCall LI, Matlashewski G. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. *Exp Parasitol*. 2012;132(2): 109-115. doi:10.1016/j.exppara.2012.06.001
 37. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(1): 349-358. doi:10.1016/S0732-8893(03)00093-2
 38. Kaufer A, Ellis J, Stark D. Identification of clinical infections of *Leishmania* imported into Australia: Revising speciation with polymerase chain reaction-RFLP of the kinetoplast maxicircle. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101: 590-601. doi:10.4269/ajtmh.19-0095
 39. Rocha RF, Menezes E V., Xavier AREO, Royo VA, Oliveira DA, Júnior AFM, et al. Standardization of a molecular method for epidemiologic identification of *Leishmania* strains. *Genet Mol Res*. 2016;15(4): 10-4238/gmr-15048854. doi:10.4238/gmr.15048854
 40. Brenière SF, Telleria J, Bosseno MF, Buitrago R, Bastrenta B, Cuny G, et al. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop*. 1999;73(3): 283-293. doi:10.1016/S0001-706X(99)00025-X
 41. Thiel T, Kota R, Grosse I, Stein N, Graner A. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(1): e5. doi:10.1093/nar/gnh006
 42. Liu X, Quan N. Immune cell isolation from mouse femur bone marrow. *Bio Protoc*. 2015;5(20): e1631. doi:10.21769/bioprotoc.1631
 43. Legarda D, Ting AT. Analysis of necroptosis in bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol*. 2018;1857: 63-70. doi:10.1007/978-1-4939-8754-2_6
 44. Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, et al. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One*. 2011;6(5): e19851. doi:10.1371/journal.pone.0019851
 45. Inbar E, Shaik J, Iantorno SA, Romano A, Nzelu CO, Owens K, et al. Whole genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis-like sexual recombination in *Leishmania*. *PLoS Genet*. 2019;15(5): e1008042. doi:10.1371/journal.pgen.1008042
 46. Garin YJF, Meneceur P, Pratlong F, Dedet JP, Derouin F, Lorenzo F. A2 gene of Old World cutaneous *Leishmania* is a single highly conserved functional gene. *BMC Infect Dis*. 2005;5:18. doi:10.1186/1471-2334-5-18
 47. McCall LI, Matlashewski G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: Evidence that A2 is a stress response protein. *Mol Microbiol*. 2010;77: 518-530. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07229.x
 48. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira R V., Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop*. 2011;118(2): 87-96. doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.007
 49. Sterkers Y, Lachaud L, Crobu L, Bastien P, Pagès M. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cell Microbiol*. 2011;13(2): 274-283. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01534.x
 50. Sterkers Y, Lachaud L, Bourgeois N, Crobu L, Bastien P, Pagès M. Novel insights into

genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. Mol Microbiol. 2012;86(1): 15-23. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08185.x



Discusión general

A lo largo de esta Memoria se han abordado temas que, vistos desde una perspectiva amplia, dan cuenta de la influencia que las cuestiones más básicas de la biología de *Leishmania* (forma de reproducción, relación con el hospedador) pueden tener sobre la epidemiología de las enfermedades que provocan, incluyendo efectos sobre la transmisión y adaptación a nuevos nichos (nuevos ambientes, vectores u hospedadores) y sobre la adquisición de características ventajosas (como aumento de la virulencia o resistencia a fármacos). Los tripanosomátidos y otros parásitos fueron considerados por los biólogos evolutivos del siglo XIX y parte del XX organismos degenerados biológicamente y evolutivamente anómalos^{1,2}, sin embargo, han demostrado que su papel a nivel evolutivo no solo tiene importancia para sí mismos, sino también para las especies de vida libre que se relacionan con ellos y para el funcionamiento de los ecosistemas.^{3,4}

Al tiempo que se estudian los procesos de reproducción y otros aspectos básicos del parásito (Capítulo 3), hemos contribuido al desarrollo de nuevas estrategias para combatir a *Leishmania*. Los numerosos inconvenientes que presentan los fármacos actualmente utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis; toxicidad, efectos secundarios, administración parenteral y a menudo necesidad de hospitalización, falta de adherencia, tasas de éxito fluctuantes, aparición de cepas resistentes, estabilidad química, coste, etc., nos han movido a continuar la búsqueda de tratamientos más tolerables. Aunque son numerosas y variadas las líneas de investigación que buscan hacer frente a esta problemática, en este trabajo nos hemos centrado en dos: la utilización de marcadores para evaluar la inhibición de la TopIB por indenoisoquinolinas (fosforilación de la histona H2A de *Leishmania*) (Capítulo 1) y la utilización de nanopartículas para vehicular la liberación de fármacos en la vacuola parasitófora (VP) del macrófago infectado por *Leishmania* (Capítulo 2).

En el primer capítulo se ha estudiado la fosforilación de la histona H2A de *Leishmania* como señal temprana de daño de doble cadena debido a la estabilización del complejo de rotura entre el ADN y la TopIB producido por indenoisoquinolinas. Como resultado observamos que los compuestos con un átomo de N sustituido en el farmacóforo de indenoisoquinolina, eran más selectivos destruyendo al patógeno, más potentes inhibiendo la LTopIB y producían mayores niveles de fosforilación de la histona H2A. Algunos venenos de la TopIB, como la camptotecina y sus derivados, o las indenoisoquinolinas sintéticas (derivados no camptotecínicos) han demostrado su eficacia en modelos preclínicos de LV en ratón.^{5,6} Se ha comparado la eficacia de la camptotecina libre frente a la encapsulada en forma liposomal, resultando ambas formulaciones efectivas para el tratamiento de LV en un modelo murino, pero sin que la formulación liposomal aumentara la eficacia ni disminuyese su toxicidad.⁷ En otro estudio, se evaluó la capacidad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de dos derivados indenoisoquinolínicos (indotecán y AM13-55) en un modelo *ex vivo* de

esplenocitos murinos infectados con *L. infantum*, obteniéndose índices selectivos interesantes. Además, cuando el indotecán se administró *in vivo* a ratones que padecían LV se produjo una reducción de la carga parasitaria de hasta un 80% en los órganos diana, sin embargo, cuando los ratones se trataron con AM13-55, se observó una disminución drástica en bazo, aunque no en el hígado.⁵ En un trabajo posterior, se evaluó la actividad de una serie sintética de indeno-1,5-naftiridinas sobre la LTopIB de *Leishmania*⁸, así como su actividad leishmanicida utilizando promastigotes transgénicos que expresaban la proteína infrarroja (iRFP) y esplenocitos procedentes de ratones Balb/c infectados con *L. infantum*.^{8,9} Las indenoisoquinolinas presentan ventajas respecto a los derivados camptotecínicos, ya que al ser más estables químicamente, el complejo intermediario de ruptura que forman con el ADN es más duradero y además no generan resistencias, ya que estas moléculas no son sustratos de la familia de transportadores de fármacos camptotecínicos.¹⁰ La estabilización del complejo covalente originada por este tipo de compuestos está en el origen de SSBs en el ADN que progresan a DSBs.^{11,12} En el trabajo presentado en esta Memoria se ha estudiado la fosforilación del residuo Thr128 de la histona H2A de *L. infantum*, y aunque se ha demostrado la inhibición de su LTopIB, las indenoisoquinolinas parecen tener otros mecanismos de acción relacionados con la inhibición de la tirosil ADN-fosfodiesterasa (Tdp1), una enzima involucrada en la reparación de complejos covalentes ADN-proteína. Esta inhibición explicaría la falta de correlación entre la estabilización de los complejos de rotura por los compuestos, la inhibición de la LTopIB y la fosforilación de su histona, ya que la Tdp1 es una enzima encargada de eliminarlos.^{13,14} Esta enzima ha sido descrita en *L. donovani* y se ha demostrado que los parásitos resistentes a la camptotecina expresan mayores niveles de Tdp1.¹⁵

En el segundo capítulo de la Memoria se ha caracterizado un conjugado dendrítico de poliglicerol (PG) y polietilenglicol (PEG) conjugado a doxorubicina (DOX) – un fármaco antitumoral, inhibidor de la Top de tipo II con probado efecto leishmanicida – mediante un enlace sensible a pH ácido (PG-DOX(pH)-PEG). Un problema farmacocinético de los patógenos intracelulares, incluida *Leishmania*, es la obligatoriedad de los fármacos de atravesar varias barreras antes de alcanzar una concentración lo suficientemente elevada como para eliminar al parásito.^{16,17} Para salvar todas estas barreras, el diseño de nanotransportadores que co-localicen con las VPs es un objetivo en el diseño de formulaciones para el tratamiento de estas enfermedades. Los dendrímeros (nanopartículas con simetría radial y estructura homogénea en forma de árbol^{18,19}, gracias a su solubilidad en agua y a su biocompatibilidad, han sido estudiados como candidatos para vehicular fármacos frente a enfermedades parasitarias como la malaria²⁰⁻²² o la toxoplasmosis.²³⁻²⁶ En *Leishmania*, Daftarian y colaboradores comprobaron que una combinación péptido-dendrímico conjugada a anfotericina B liposomal, permite no solo la liberación controlada

del fármaco en la VP si no también la activación de las células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas), activando una respuesta celular de tipo Th1.²⁷ Mehrizi y colaboradores utilizaron un dendrímero globular lineal con carga negativa conjugado con anfotericina B que mejoró la solubilidad del fármaco y consiguió reducir la carga parasitaria en los órganos diana de *Leishmania*.²⁸ En nuestro trabajo se ha utilizado el poliglicérol dendrítico debido a sus propiedades estructurales óptimas, a su tamaño y a la facilidad de ajuste de sus grupos funcionales.^{29,30} El fármaco conjugado a la NP fue la DOX, ya que permite su seguimiento mediante citometría de flujo y microscopía debido a su color y además tiene propiedades leishmanicidas en su forma libre.^{31,32} Nuestros resultados demostraron que el conjugado PG-DOX(pH)-PEG no tuvo efecto sobre los promastigotes pero sí frente a los amastigotes de *Leishmania* que infectaban esplenocitos murinos *ex vivo*. Además, su toxicidad sobre las células del explante de bazo fue 20 veces menor que la de la DOX libre, debido a que el dendrímero conjugado evita la acumulación del fármaco en los núcleos celulares (observado mediante microscopía confocal), mientras el enlace sensible a pH al que estaba unida la DOX permite su liberación conforme se acidificaba el medio en el interior de las VPs. Se podría concluir que la liberación controlada y dirigida de compuestos que, como la DOX, basan su mecanismo de acción en la inhibición de enzimas nucleares como las Top, permitiría mejorar su selectividad, ya que muchos de ellos son muy efectivos frente a patógenos intracelulares pero también muy poco selectivos, como se ha visto con algunos de los compuestos presentados en el capítulo 1³³ o en otros artículos publicados por nuestro grupo anteriormente.^{5,34} En conclusión, el conjugado PG-DOX(pH)-PEG demostró ser un prometedor vehículo para la liberación controlada de fármacos en la VP debido al enlace sensible a pH que une el fármaco al dendrímero y que permite su liberación solamente en un ambiente ácido.

Posteriormente, hemos estudiado cómo la decoración con motivos de manosa en la superficie de PG-DOX(pH)-PEG influye en la liberación dirigida de estos conjugados dendríticos, ya que las células presentadoras de antígenos presentan receptores para estos y otros carbohidratos (receptores de lectina tipo C- CLR). Nuestros resultados demostraron una mayor captación por parte de los macrófagos cuando los nanoconjugados contenían en su superficie cinco unidades de manosa.¹⁷

En el tercer capítulo de esta Memoria se ha abordado la reproducción sexual en *Leishmania*, aportando nuevas pruebas de intercambio genético *in vitro*, utilizando cruces intraclonales e interespecies entre *L. donovani*, *L. tropica* y *L. major*. El análisis de los híbridos interespecies *L. donovani* x *L. major* y *L. donovani* x *L. tropica* obtenidos permitió demostrar que presentan una mezcla de alelos procedentes de sus progenitores y fenotipos intermedios de infección y crecimiento. El estudio de los ciclos biológicos, incluidas las formas de

reproducción de estos parásitos, es importante para la comprensión de su papel en el medio ambiente. La reproducción sexual permite el barajado de los cromosomas parentales generando nuevos genotipos beneficiosos en la descendencia – especialmente en organismos haploides, pero también en diploides – porque permite el reemplazamiento de mutaciones deletéreas y permite que las mutaciones beneficiosas se extiendan rápidamente al actuar la selección natural. Esto puede ser importante en la aparición de resistencias a antibióticos y en la adaptación a la respuesta inmune del hospedador.³⁵ Aunque muchos de estos parásitos conservan la capacidad de reproducirse de forma sexual, la limitan, de manera que lo frecuente es la propagación clonal en el hospedador y en el ambiente en el que se encuentran adaptados, pero conservan la capacidad de reproducción sexual, a la cual pueden acceder cuando se producen cambios en el medio, en el hospedador o como respuesta a las terapias antimicrobianas.³⁶ *T. cruzi* es un buen ejemplo de las ventajas que puede proporcionar la propagación clonal con acceso limitado a la recombinación y al sexo a nivel evolutivo, ya que dos eventos de hibridación ancestrales son responsables de algunos de los linajes actuales^{37,38} causantes de la mayor parte de los casos de enfermedad de Chagas en Sudamérica, donde se transmiten mediante vectores domésticos, en lugar de silvestres.^{35,39}

Otras pruebas de la importancia del intercambio genético y la reproducción sexual en *Leishmania* las encontramos en brotes de la enfermedad o en cambios respecto a la permisividad del vector. Se ha sugerido que el polimorfismo de *L. infantum* detectado en el Sur de España podría relacionarse con eventos de recombinación e intercambio genético en el vector.^{40,41} En Perú, un brote en la década de los 90 se relacionó con la formación de híbridos *L. braziliensis* x *L. peruviana*, que se aislaron de varios pacientes de LMC.^{42,43} En la región de Cukurova (Turquía) se analizaron once aislados de *L. infantum* de un brote de LV. Los datos determinaron que los aislados descendían de una cepa híbrida de *Leishmania* procedente de un cruce *L. infantum* x *L. donovani* que posteriormente se había reproducido clonalmente con algún episodio de recombinación génica (deducido por el patrón de heterocigosidad observado en los aislados).⁴⁴ Esto implica que tras algunos brotes de enfermedades pueden estar episodios de intercambio genético puntuales que permitieron una ventaja evolutiva a la progenie híbrida en el ambiente en el que se encontraban y se expandieron rápidamente mediante propagación clonal. Además, los híbridos pueden adquirir capacidades de transmisión alteradas³⁵, como los resultantes de cruces entre *L. major* x *L. infantum*, capaces de colonizar moscas de *Phlebotomus papatasi*, que es un vector no permisivo para la transmisión de *L. infantum*.⁴⁵

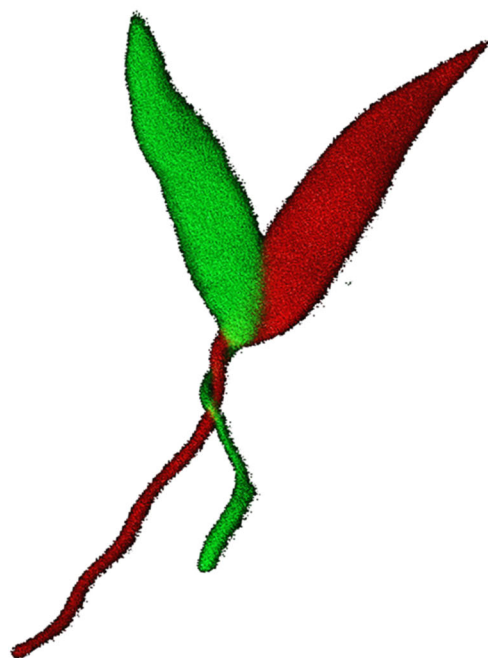
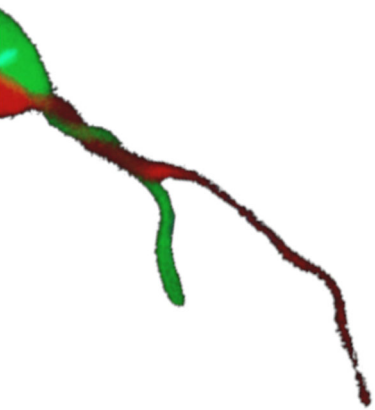
Referencias

1. Jackson AP. Preface: The evolution of parasite genomes and the origins of parasitism. *Parasitology*. 2015;142 Suppl 1: S1-S5. doi:10.1017/S0031182014001516

2. Vickerman K. "Not a very nice subject". Changing views of parasites and parasitology in the twentieth century. *Parasitology*. 2009;136(12): 1395-1402. doi:10.1017/S0031182009990825
3. Lafferty KD, Dobson AP, Kuris AM. Parasites dominate food web links. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30): 11211-11216. doi:10.1073/pnas.0604755103
4. Dunne JA, Lafferty KD, Dobson AP, Hechinger RF, Kuris AM, Martinez ND, et al. Parasites affect food web structure primarily through increased diversity and complexity. *PLoS Biol*. 2013;11(6): e1001579. doi:10.1371/journal.pbio.1001579
5. Balaña-Fouce R, Prada CF, Requena JM, Cushman M, Pommier Y, Álvarez-Velilla R, et al. Indotecan (LMP400) and AM13-55: Two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(10): 5264-5270. doi:10.1128/AAC.00499-12
6. Prada CF, Álvarez-Velilla R, Balaña-Fouce R, Prieto C, Calvo-Álvarez E, Escudero-Martínez JM, et al. Gimatecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(10): 1433-1440. doi:10.1016/j.bcp.2013.02.024
7. Proulx ME, Désormeaux A, Marquis JF, Olivier M, Bergeron MG. Treatment of visceral leishmaniasis with sterically stabilized liposomes containing camptothecin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(9): 2623-2627. doi:10.1128/AAC.45.9.2623-2627.2001
8. Tejería A, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM, Balaña-Fouce R, Alonso C, Fuertes M, et al. Antileishmanial effect of new indeno-1,5-naphthyridines, selective inhibitors of *Leishmania infantum* type IB DNA topoisomerase. *Eur J Med Chem*. 2016;124: 740-749. doi:10.1016/j.ejmech.2016.09.017
9. Calvo-Álvarez E, Stamatakis K, Punzón C, Álvarez-Velilla R, Tejería A, Escudero-Martínez JM, et al. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3): e0003666. doi:10.1371/journal.pntd.0003666
10. Antony S, Agama KK, Miao ZH, Takagi K, Wright MH, Robles AI, et al. Novel indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 produce persistent topoisomerase I cleavage complexes and overcome multidrug resistance. *Cancer Res*. 2007;67(21): 10397-10405. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0938
11. Nyamuswa G, Silber R. Interaction between replication forks and Topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40DNA replication system. *Cancer Res*. 1993;53(24): 5908-5914.
12. Pommier Y, Sun Y, Huang SYN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(11): 703-721. doi:10.1038/nrm.2016.111
13. Dexheimer T, Antony S, Marchand C, Pommier Y. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008;8(4): 381-389. doi:10.2174/187152008784220357
14. Huang SYN, Pommier Y, Marchand C. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (Tdp1) inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*. 2011;21(9): 1285-1292. doi:10.1517/13543776.2011.604314
15. Banerjee B, Roy A, Sen N, Majumder HK. A tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 from kinetoplastid parasite *Leishmania donovani* (LdTdp1) capable of removing topo I-DNA covalent complexes. *Mol Microbiol*. 2010;78(1): 119-137. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07318.x
16. Shaw CD, Carter KC. Drug delivery: Lessons to be learnt from *Leishmania* studies. *Nanomedicine*. 2014;9(10): 1531-1544. doi:10.2217/nmm.14.66

17. Vossen LI, Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Pérez-Pertejo MY, Balaña-Fouce R, Reguera RM, et al. Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to *leishmania infantum*-infected macrophages. *Pharmaceutics*. 2020;12(10): 1-21. doi:10.3390/pharmaceutics12100915
18. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1): 247. doi:10.1186/1556-276X-9-247
19. Sampathkumar SG, Yarema KJ. Dendrimers in cancer treatment and diagnosis. *Nanotechnologies for the life sciences*. In: Kumar CSSR, editor. *Nanotechnologies for life sciences*. 2007. doi:10.1002/9783527610419.ntls0071
20. Bhadra D, Bhadra S, Jain NK. PEGylated peptide-based dendritic nanoparticulate systems for delivery of artemether. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2005;15(1): 65–73. doi:10.1016/s1773-2247(05)50008-x
21. Bhadra D, Bhadra S, Jain NK. PEGylated peptide dendrimeric carriers for the delivery of antimalarial drug chloroquine phosphate. *Pharm Res*. 2006;23(3): 623-633. doi:10.1007/s11095-005-9396-9
22. Movellan J, Urbán P, Moles E, de la Fuente JM, Sierra T, Serrano JL, et al. Amphiphilic dendritic derivatives as nanocarriers for the targeted delivery of antimalarial drugs. *Biomaterials*. 2014;35(27): 7940-7950. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.061
23. Konstantinovic N, Guegan H, Stájner T, Belaz S, Robert-Gangneux F. Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. *Food Waterborne Parasitol*. 2019;15: e00036. doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00036
24. Lai BS, Witola WH, El Bissati K, Zhou Y, Mui E, Fomovska A, et al. Molecular target validation, antimicrobial delivery, and potential treatment of *Toxoplasma gondii* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35): 14182-14187. doi:10.1073/pnas.1208775109
25. Prieto MJ, Bacigalupe D, Pardini O, Amalvy JI, Venturini C, Morilla MJ, et al. Nanomolar cationic dendrimeric sulfadiazine as potential antitoxoplasmic agent. *Int J Pharm*. 2006;326(1-2): 160-168. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.068
26. Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(29): E4133-E4142. doi:10.1073/pnas.1600299113
27. Daftarian PM, Stone GW, Kovalski L, Kumar M, Vosoughi A, Urbietta M, et al. A targeted and adjuvanted nanocarrier lowers the effective dose of liposomal amphotericin B and enhances adaptive immunity in murine cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2013;208(11): 1914-1922. doi:10.1093/infdis/jit378
28. Mehrizi TZ, Ardestani MS, Khamesipour A, Hoseini MHM, Mosaffa N, Anissian A, et al. Reduction toxicity of Amphotericin B through loading into a novel nanoformulation of anionic linear globular dendrimer for improve treatment of *leishmania major*. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(8):125. doi:10.1007/s10856-018-6122-9
29. Vossen LI, Markovsky E, Eldar-Boock A, Tschiche HR, Wedepohl S, Pisarevsky E, et al. PEGylated dendritic polyglycerol conjugate targeting NCAM-expressing neuroblastoma: Limitations and challenges. *Nanomedicine*. 2018;14(4): 1169-1179. doi:10.1016/j.nano.2018.02.009
30. Roller S, Zhou H, Haag R. High-loading polyglycerol supported reagents for Mitsunobu- and acylation-reactions and other useful polyglycerol derivatives. *Mol Divers*. 2005;9(4): 305-316. doi:10.1007/s11030-005-8117-y

31. Shokri A, Akhtari J, Keighobadi M, Fakhari M, Teshnizi SH, Emami S, et al. Promising antileishmanial effectiveness of doxorubicin and Doxil against *Leishmania major*: An *in vitro* assay. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(6): 544-548. doi:10.1016/j.apjtm.2016.09.014
32. Sett R, Basu N, Ghosh AK, Das PK. Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. *J Parasitol*. 1992;78(2): 350–354. doi:10.2307/3283487
33. Gutiérrez-Corbo C, Álvarez-Velilla R, Reguera RM, García-Estrada C, Cushman M, Balaña-Fouce R, et al. Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2019;11: 39-48. doi:10.1016/j.ijpddr.2019.09.005
34. Reguera RM, Álvarez-Velilla R, Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Balaña-Fouce R, Cushman M, et al. Antiparasitic effect of synthetic aromathecins on *Leishmania infantum*. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):405. doi:10.1186/s12917-019-2153-9
35. Gibson W. The sexual side of parasitic protists. *Mol Biochem Parasitol*. 2021;243: 111371. doi:10.1016/j.molbiopara.2021.111371
36. Heitman J. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol*. 2006;16(17): R711-R725. doi:10.1016/j.cub.2006.07.064
37. Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2003;33(3): 269-279. doi:10.1016/S0020-7519(02)00264-3
38. Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005;171(2): 527-543. doi:10.1534/genetics.104.038745
39. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future. *Parasitology*. 2009;136(12): 1509-1528. doi:10.1017/S0031182009990977
40. Martín-Sánchez J, Gramiccia M, Pesson B, Morillas-Marquez F. Genetic polymorphism in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae). *Parasite*. 2000;7(4): 247-254. doi:10.1051/parasite/2000074247
41. Martin-Sanchez J, Gramiccia M, Di Muccio T, Ludovisi A, Morillas-Márquez F. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(4): 228-232. doi:10.1016/S0035-9203(03)00060-9
42. Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(3): 573-578. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.573
43. Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, et al. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop*. 1995;59(4): 293-307. doi:10.1016/0001-706X(95)00094-U
44. Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, et al. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet*. 2014;10(1): e1004092. doi:10.1371/journal.pgen.1004092
45. Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol*. 2007;37(6): 589-593. doi:10.1016/j.ijpara.2007.02.002



Conclusiones

Conclusiones del Capítulo 1

- La fosforilación de la histona H2A de *Leishmania* en el residuo Thr¹²⁸ es una señal temprana de reparación en respuesta al daño de doble cadena en el ADN, de manera semejante a la fosforilación de la histona H2AX en el residuo Ser¹³⁹ en células de mamífero.
- El aumento de fosforilación de la histona H2A en Thr¹²⁸ puede utilizarse como biomarcador de daño de doble cadena generado por la estabilización del complejo de escisión entre la LTopIB y el ADN producido por las indenoisoquinolinas.
- La falta de correlación entre la fosforilación de la histona H2A y la formación *in vivo* de complejos de escisión enzima-ADN indica que podrían estar alterados otros procesos implicados en la reparación del daño del ADN, como la inhibición de la enzima tirosil ADN-fosfodiesterasa 1 (Tdp1).

Conclusiones del Capítulo 2

- La doxorubicina conjugada en nanotransportadores de poliglicerol (PG-DOX(pH)-PEG) reduce la toxicidad de la doxorubicina libre en cultivos celulares de macrófagos RAW264.7 y J774 y en esplenocitos murinos y aumenta su índice selectivo.
- El conjugado PG-DOX(pH)-PEG utiliza la vía endocítica para alcanzar las vacuolas parasitóforas, rodeando a los amastigotes de *Leishmania* y liberando doxorubicina lentamente gracias al enlace hidrazona sensible a pH que conjuga el fármaco a la nanopartícula.
- Por lo tanto, se puede concluir que el conjugado representa un modelo prometedor de liberación controlada de fármacos en el nicho de *Leishmania*.

Conclusiones del Capítulo 3

- Se ha logrado obtener híbridos en condiciones axénicas entre especies de *Leishmania* con diferente tropismo, aunque con un rendimiento reducido con respecto a los cruces realizados en mosca descritos en la literatura.
- *L. tropica* tiene la capacidad de cruzarse intraclonalmente *in vitro*, mientras que en el caso de las especies *L. major* o *L. donovani* no se han obtenido híbridos.
- Se ha confirmado la segregación de alelos parentales a la progenie híbrida mediante el análisis de diferentes marcadores nucleares.
- La herencia del ADN del kinetoplasto presenta una discordancia entre los maxicírculos y los minicírculos, por lo que no se han podido establecer los mecanismos subyacentes a la herencia del ADN mitocondrial.
- En general, los híbridos obtenidos presentan fenotipos parentales intermedios, tanto en el comportamiento en cultivo como en la capacidad de infección.
- La evidencia científica sobre la reproducción sexual en *Leishmania* nos lleva a concluir que este proceso puede no ser tan infrecuente como se pensaba y podría estar relacionado con la adquisición de características ventajosas para el parásito en cuestiones como la virulencia, resistencia a fármacos y tolerancia al estrés.



Resumen

Los parásitos pertenecientes al género *Leishmania* presentan un ciclo de vida con dos hospedadores, por un lado, vectores de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* y por otro, mamíferos que sirven como hospedador definitivo y como reservorios. Estos protozoos son los causantes de un grupo de enfermedades denominadas leishmaniasis, englobadas por la Organización Mundial de la Salud dentro de las denominadas enfermedades tropicales desatendidas, ya que afectan en mayor medida a países empobrecidos. Las leishmaniasis se dividen en dos tipos principales en función de las manifestaciones clínicas: la leishmaniasis visceral o kala-azar, causada por especies como *Leishmania infantum* o *L. donovani*, es mortal sin tratamiento y su característica principal es la inflamación del hígado y el bazo, nichos principales del parásito. La leishmaniasis cutánea es producida por especies como *L. major* o *L. tropica*, se caracteriza por la aparición de lesiones en la piel, o en la piel y mucosa en el caso de la variante de leishmaniasis mucocutánea, siendo en este caso las causantes las especies del complejo *L. braziliensis*, de peor pronóstico sin tratamiento.

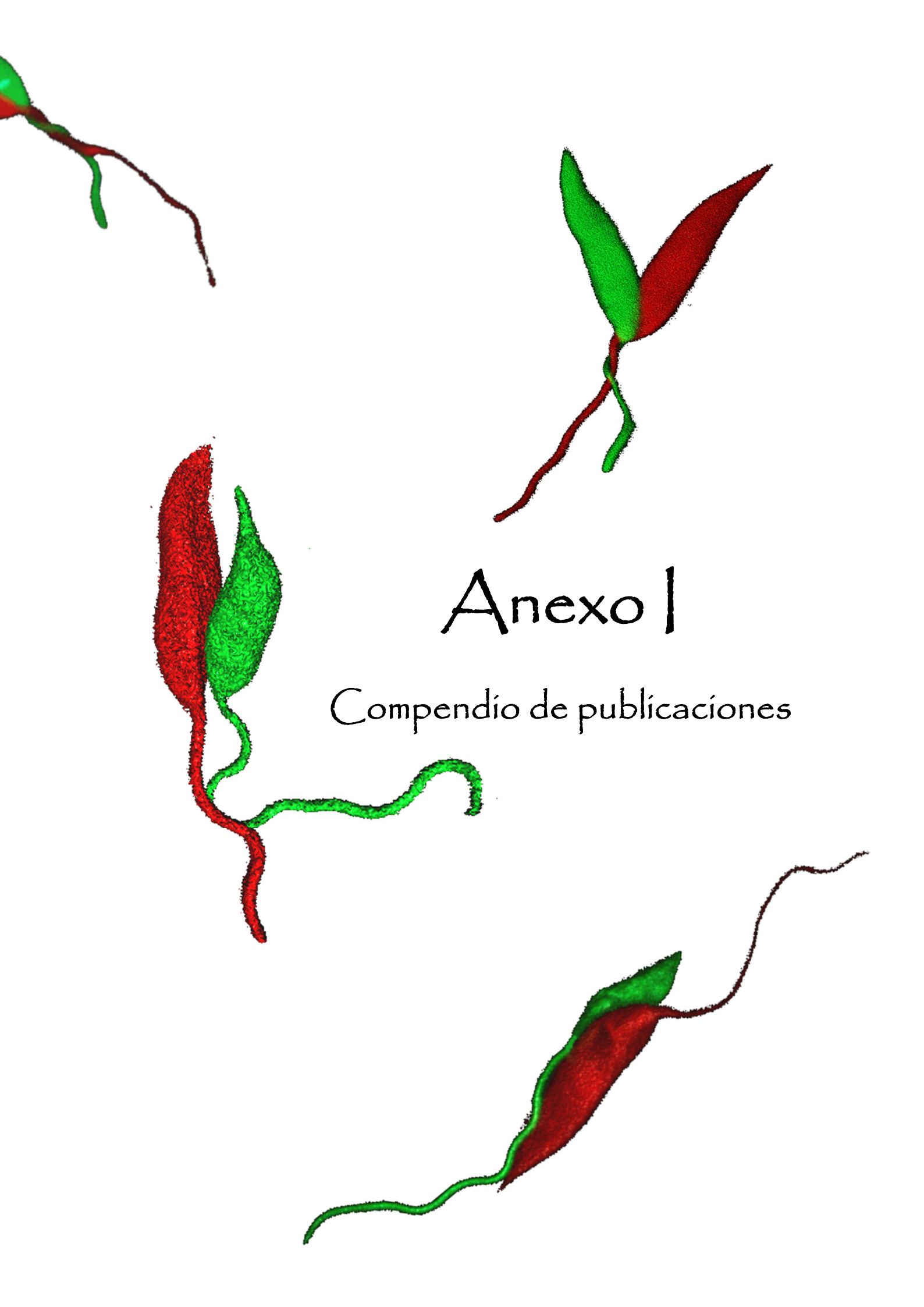
El manejo de la enfermedad, dadas las limitaciones que tienen medidas como el control de reservorios y vectores, y debido a que no se ha desarrollado ninguna vacuna eficaz en humanos, se ha basado en la quimioterapia, dentro de la cual se destacan fármacos como los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B, la miltefosina o la paromomicina, entre otros. Sin embargo, las terapias utilizadas presentan inconvenientes, como efectos secundarios, necesidad de hospitalización, aumento de cepas resistentes, precio elevado, etc. Esta situación apremia el descubrimiento de nuevos fármacos y la inversión en el desarrollo de nuevas estrategias para hacer frente a *Leishmania*. Entre las estrategias que se están desarrollando para mejorar la quimioterapia de las leishmaniasis, en esta Memoria nos hemos centrado en dos: el uso de dianas terapéuticas para evaluar potenciales tratamientos frente a *Leishmania*, en concreto, las ADN topoisomerasas, y la vehiculización de fármacos para la liberación controlada de los mismos en el interior de la vacuola parasitófora en la que se localiza el parásito.

El cribado dirigido en el descubrimiento de fármacos se basa en la identificación de compuestos activos específicamente frente a dianas del parásito, respetando las estructuras homólogas del hospedador. Las ADN topoisomerasas son enzimas con funciones importantes en los procesos de replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN, y debido a las diferencias estructurales que presentan respecto a las enzimas homólogas humanas, son buenas dianas terapéuticas. Por ejemplo, la topoisomerasa IB de *Leishmania* es heterodimérica, lo que contrarresta con las TopIB descritas en la mayor parte de las especies, que son monoméricas. Esta enzima es la encargada de relajar las tensiones de torsión en el ADN, para lo cual escinde una hebra de la cadena nucleotídica uniéndose al ADN y formando un complejo de escisión enzima-ADN transitorio, sin embargo, en el proceso, algunos inhibidores de la enzima pueden unirse a este complejo transitorio,

estabilizándolo y dando lugar a roturas de doble cadena cuando la horquilla de replicación choca contra el complejo enzima-ADN-inhibidor. Una de las señales tempranas de daño de doble cadena en las células eucariotas es la fosforilación de la histona H2A, por lo que la medida de fosforilación podría indicar la capacidad de algunos compuestos para inhibir al parásito, que junto con otros datos nos da información sobre potenciales fármacos leishmanicidas. En el Capítulo 1 de esta Memoria se ha estudiado la fosforilación de la histona H2A de *Leishmania* como señal temprana de daño de doble cadena para evaluar la capacidad leishmanicida de compuestos inhibidores de la Topoisomerasa I del parásito, en concreto, una serie de 20 compuestos indenoisoquinolínicos con distintos sustituyentes en las posiciones N6, C3, C8 y C9, los cuales fueron testados frente a promastigotes y frente a amastigotes esplénicos obtenidos de infecciones experimentales de ratón, y se evaluó la capacidad de estabilización del complejo de rotura enzima-ADN, la fosforilación de la histona H2A como señal temprana de daño de doble cadena y la fragmentación de ADN que eran capaces de provocar. El efecto leishmanicida de la mayor parte de los compuestos analizados estuvo en el rango micromolar o submicromolar, y la mayor capacidad de inhibición del parásito se observó en los compuestos con un átomo de N en el anillo de indenoisoquinolina (7-azaindenoisoquinolinas), que además inhibieron en gran medida la topoisomerasa IB y produjeron fosforilación de la histona H2A.

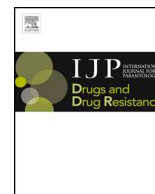
La vehiculización de fármacos es otra de las aproximaciones destacada en la mejora de los tratamientos actuales frente a la leishmaniasis. La nanotecnología engloba el uso de estructuras de tamaño que pueden llegar a varios cientos de nm y que permite dirigir fármacos a los órganos o células de interés. En el caso de *Leishmania*, el fármaco puede ser dirigido a la vacuola parasitófora en la que se encuentra el parásito en el interior de los macrófagos infectados, disminuyendo la toxicidad del compuesto, protegiendo al fármaco de la degradación y facilitando la solubilización del mismo. Existen numerosos tipos de nanopartículas, como liposomas y otras partículas lipídicas, nanopartículas metálicas, o nanopartículas poliméricas, entre las que se encuentran los dendrímeros. En el capítulo 2 de esta Memoria se ha evaluado un conjugado de poliglicerol dendrítico (PG-PEG) que presenta doxorubicina unida mediante un enlace hidrazona sensible a pH, lo que podría permitir la liberación de la droga en ambientes ácidos, como el fagolisosoma. La citotoxicidad del conjugado se evaluó utilizando dos líneas tumorales de macrófagos murinos y esplenocitos procedentes de ratones Balb/c, y el efecto leishmanicida se obtuvo utilizando promastigotes y amastigotes intracelulares. El conjugado PG-DOX(pH)-PEG fue capaz de liberar el fármaco en el interior de las vacuolas parasitóforas de *Leishmania*, disminuyó la toxicidad respecto a la doxorubicina libre al evitar la acumulación del fármaco en los núcleos celulares del macrófago y colocalizó con los lisosomas de la célula y posteriormente con los amastigotes de *Leishmania* en las vacuolas parasitóforas.

Paralelamente al empleo y la búsqueda de nuevas aproximaciones que permitan la mejora de los fármacos actualmente utilizados o el desarrollo de nuevos compuestos con mejores perfiles de toxicidad y eficacia, el avance en el estudio de aspectos básicos de la biología del parásito, como la reproducción, resulta fundamental para comprender los procesos que han permitido a estas especies evolucionar y adaptarse a nuevos ambientes, lo que incluye la adquisición de características ventajosas para el parásito (como la resistencia a fármacos o el aumento de la virulencia). Uno de los mayores problemas a resolver a los que se ha enfrentado la biología evolutiva es determinar cuáles son las causas que permiten el mantenimiento del sexo de forma casi universal en las especies eucariotas, pese a sus costes. Multitud de hipótesis, como la hipótesis de la reina roja (sobre la coevolución parásito-hospedador), el modelo de la lotería (que explica la reproducción sexual como un aumento de posibilidades frente a un ambiente al que adaptarse) o el sexo como forma de purgar mutaciones deletéreas (interferencia de Hill-Robertson y trinquete de Muller), trataron de explicar los motivos que llevan a la aparición, y sobre todo el mantenimiento de la reproducción sexual. Finalmente, parece que un enfoque pluralista, es decir, un conjunto de factores y no uno único, es el mejor modelo que permite abordar y entender esta cuestión. Durante muchos años, se consideró que los tripanosomátidos y otros eucariotas unicelulares se reproducían de una forma exclusivamente asexual, debido a la ausencia de recombinación y segregación en las poblaciones, a la baja detección de genotipos recombinantes, a la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg detectada y en general, debido a la estabilidad genómica que presentaban estas especies. Sin embargo, estudios isoenzimáticos y el descubrimiento de híbridos naturales en poblaciones de *Leishmania* y *Trypanosoma* fueron aportando pruebas que indicaban que si existía intercambio genético en estas especies, y a partir de finales de la década de los 80, los cruces experimentales obtenidos en el laboratorio en *Trypanosoma* y posteriormente entre especies de *Leishmania*, han ido aumentando el conocimiento sobre la reproducción sexual de estos parásitos, que en general no es una parte obligatoria del ciclo biológico pero que seguramente ha tenido consecuencias importantes a nivel evolutivo y en la adquisición de características ventajosas. En el capítulo 3, se han obtenido híbridos intraclonales e interespecies utilizando líneas parentales de *L. major*, *L. tropica* y *L. donovani*, modificadas para expresar proteínas fluorescentes rojas (mCherry) y verdes (citrina). Los híbridos obtenidos se han analizado genotípicamente y fenotípicamente, demostrando que respecto al genoma nuclear son híbridos completos, con una ploidía mayor a las células parentales, y el estudio fenotípico ha mostrado fenotipos intermedios en cuanto a la capacidad infectiva y la capacidad de crecimiento en cultivo. Respecto a la herencia extranuclear, los maxicírculos del kDNA presentaron una herencia uniparental, al contrario que los minicírculos, en los que se observan mezclas de los parentales.



Anexo I

Compendio de publicaciones



Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*



Camino Gutiérrez-Corbo^{a,1}, Raquel Álvarez-Velilla^{a,1}, Rosa M. Reguera^a, Carlos García-Estrada^b, Mark Cushman^c, Rafael Balaña-Fouce^a, Yolanda Pérez-Pertejo^{a,*}

^a Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana S/n, 24071, León, Spain

^b INBIOTEC (Instituto de Biotecnología de León), Avda. Real 1 - Parque Científico de León, 24006, León, Spain

^c Department of Medicinal Chemistry, and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, The Purdue Center for Cancer Research, Purdue University, Lafayette, IN, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmania
DNA-Topoisomerase IB
Camptothecin
Indenoisoquinolines
Histone H2A
DNA damage

ABSTRACT

DNA topoisomerases are considered consolidated druggable targets against diseases produced by trypanosomatids. Several reports indicated that indenoisoquinolines, a family of non-camptothecin based topoisomerase poisons, have a strong leishmanicidal effect both *in vitro* and *in vivo* in murine models of visceral leishmaniasis. The antileishmanial effect of the indenoisoquinolines implies several mechanisms that include the stabilization of the cleavage complex, histone H2A phosphorylation and DNA fragmentation.

A series of 20 compounds with the indenoisoquinoline scaffold and several substituents at positions N6, C3, C8 and C9, were tested both in promastigotes and in intramacrophage splenic amastigotes obtained from an experimental murine infection. The antileishmanial effect of most of these compounds was within the micromolar or submicromolar range. In addition, the introduction of an N atom in the indenoisoquinoline ring (7-azaindenoisoquinolines) produced the highest selectivity index along with strong DNA topoisomerase IB inhibition, histone H2A phosphorylation and DNA-topoisomerase IB complex stabilization.

This report shows for the first time the effect of a series of synthetic indenoisoquinolines on histone H2A phosphorylation, which represents a primary signal of double stranded DNA break in genus *Leishmania*.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious zoonotic disease caused by parasites of Gen. *Leishmania*, which is responsible for 20,000 to 30,000 deaths every year mostly in Africa (Alvar et al., 2012; Burza et al., 2018). First-choice drugs are based on organic complexes of pentavalent antimony (Sb^V), which are losing effectiveness due to excessive use and lack of replacement (Frézard et al., 2009; Bush et al., 2017). A single dose of a liposomal suspension of amphotericin B (AmBisome) (Sundar et al., 2010), and the oral drug miltefosine (Bhattacharya et al., 2007), are being used as second-line treatments, either alone or in combination with Sb^V (Kimutai et al., 2017). However, in the case of AmBisome, its use is limited due to, poor chemical stability at the point of care and its mandatory intravenous route of administration (Stone et al., 2016; Jensen, 2017). In the case of miltefosine, teratogenic concerns prevent its administration to pregnant women, and pregnancy should be avoided the next 4 months after the end of the miltefosine treatment (Dorlo et al., 2012). Therefore, the urgency of new antileishmanial drugs based on

validated objectives is a real need, especially when big pharmaceutical companies are recently committed to invest more funds and efforts in the development of novel treatments.

Control of DNA topology by DNA topoisomerases (Top) is considered a consolidated target for drug development in cancer and infectious diseases, including leishmaniasis (Champoux, 2001; Pommier et al., 2016). The heterodimeric *Leishmania* topoisomerase IB (LTopIB) is structurally dissimilar from the monomeric human Top IB (hTopIB), which makes it interesting as a therapeutic target (Balaña-Fouce et al., 2014; Chowdhury and Majumder, 2019; Velásquez et al., 2017). Mechanistically, DNA topoisomerase IB (TopIB) cleaves one of the DNA strands, establishing a reversible phosphodiester bond to the 3'-end and releasing a 5'-OH at the free end (Stewart et al., 1998). This step is particularly dramatic, since the intermediate can be stabilized by certain compounds called topoisomerase poisons, which trap the covalent TopIB-DNA cleavage complex, thus producing single-strand DNA breaks (SSB) (Pommier et al., 2010). TopIB poisons, such as camptothecin (CPT) (a natural product from the Chinese tree *Camptotheca acuminata*) and non-CPT compounds such as the synthetic

* Corresponding author.

E-mail address: myperp@unileon.es (Y. Pérez-Pertejo).

¹ Both authors contributed equally to this work.



PEGylated Dendritic Polyglycerol Conjugate Delivers Doxorubicin to the Parasitophorous Vacuole in *Leishmania infantum* Infections

Camino Gutierrez-Corbo, Barbara Dominguez-Asenjo, Laura I. Vossen, Yolanda Pérez-Pertejo, Maria A. Muñoz-Fenández, Rafael Balaña-Fouce, Marcelo Calderón,* and Rosa M. Reguera*

Most drugs against visceral leishmaniasis must be administered parenterally. A controlled drug release at the target site can improve the efficacy and toxicity of antileishmanial drugs in clinical use. Amastigotes live and grow inside the parasitophorous vacuole of host resident macrophages. Therefore, antileishmanial drugs should accumulate in this compartment to kill the parasite and do not produce toxicity to the cell host. PEGylated dendritic polyglycerol conjugates (PG-PEG) can ensure a controlled drug release and the immune activation efficiency of the host. A dendritic PG conjugate with doxorubicin (DOX) attached through a pH-cleavable hydrazone linker (PG-DOX(pH)-PEG), is tested on murine macrophage cell lines and on ex vivo infected BALB/c splenocytes. As a control, a dendritic PG conjugate attached via a non-cleavable linker (PG-DOX(non)-PEG) is used. DOX fluorescence is useful to monitor the fate of the drug inside the infected cells by flow cytometry and confocal microscopy. The results show that PG-DOX(pH)-PEG slowly releases DOX inside the targeted macrophages, protecting the host of toxic drug concentrations. In addition, unlike free DOX, PG-DOX(pH)-PEG is actively internalized through the acidic endocytic pathway and colocalized surrounding the amastigotes. These results prove that PG-DOX(pH)-PEG is a promising candidate for releasing antileishmanial drugs in a controlled manner.

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex vector-borne disease caused by heteroxenous protozoan parasites of the genus *Leishmania* that currently affects ≈12 million people worldwide, primarily in developing countries. These diseases affect a variety of mammals and are transmitted when sandfly (Phlebotominae) species bite mammalian hosts during their blood meal.

Human leishmaniasis can course a wide variety of clinical manifestations that range from a self-healing to a fatal form. Although there is a continuum in the clinical spectrum, four clinical forms are widely recognized. Cutaneous leishmaniasis (CL) causes scars in the skin but in most cases it is a self-healing process. Mucocutaneous leishmaniasis is a disfiguring disease that destroys soft tissues at the upper respiratory track causing psychological disturbances and social stigma to patients. However, the most severe and fatal form if untreated is visceral leishmaniasis (VL), responsible for 20.000–30.000 estimated death per year


worldwide.^[1] Additionally, post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) is generally linked to previous episodes of VL and appears 2–3 years post-treatment.^[2] The risk of developing PKDL seems to be associated with incomplete sodium stibogluconate treatment.^[3]

After sandfly feeding, the infective promastigote form can invade the phagocytic host cells at the bite site, where neutrophils^[4] play an essential role in parasite pathogenesis acting as Trojan horses for definitive target cells. Cargoes of promastigotes are efficiently and safely transferred into resident macrophages of liver, spleen, and bone marrow, preventing the activation of their defence responses.^[5] Promastigotes can also be internalized by macrophages at the inoculation site, ending within intracellular phagolysosome compartment, named parasitophorous vacuole (PV). Parasite visceralization from skin to internal organs is likely mediated by migratory infected myeloid cells.^[6] Therefore, the administration of targeted antileishmanial drugs against mononuclear phagocytic system of infected host could be a plausible strategy against VL.

C. Gutierrez-Corbo, B. Dominguez-Asenjo, Dr. Y. Pérez-Pertejo, Dr. R. Balaña-Fouce, Dr. R. M. Reguera
Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria
Universidad de León
24071 León, Spain
E-mail: rmregt@unileon.es

C. Gutierrez-Corbo, Dr. M. A. Muñoz-Fenández
Laboratorio de Inmunobiología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón
Spanish HIV HGM BioBank
IiSGM and CIBER-BBN, 28007 Madrid, Spain




L. I. Vossen, Prof. M. Calderón
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustrasse 3, 14195 Berlin, Germany
E-mail: marcelo.calderon@fu-berlin.de

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mabi.201700098>.

DOI: 10.1002/mabi.201700098

Review

Reproduction in Trypanosomatids: Past and Present

Camino Gutiérrez-Corbo ¹, Bárbara Domínguez-Asenjo ¹, María Martínez-Valladares ², Yolanda Pérez-Pertejo ¹, Carlos García-Estrada ¹, Rafael Balaña-Fouce ^{1,*} and Rosa M. Reguera ¹

¹ Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain; mgutc@unileon.es (C.G.-C.); bdoma@unileon.es (B.D.-A.); myperp@unileon.es (Y.P.-P.); cgare@unileon.es (C.G.-E.); rmregt@unileon.es (R.M.R.)

² Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-Universidad de León, 24346 León, Spain; mmarva@unileon.es

* Correspondence: rbalf@unileon.es; Tel.: +34-987291590

Simple Summary: The reproduction of trypanosomatids is a fundamental issue for host–parasite interaction, and its biological importance lies in knowing how these species acquire new defense mechanisms against the countermeasures imposed by the host, which is consistent with the theory of the endless race or the Red Queen hypothesis for the existence of meiotic sex. Moreover, the way these species re-produce may also be at the origin of novel and more virulent clades and is relevant from a therapeutic or vaccination point of view, as sex may contribute to increased tolerance and even to the rapid acquisition of drug resistance mechanisms. Kinetoplastids are single-celled organisms, many of them being responsible for important parasitic diseases, globally termed neglected diseases, which are endemic in low-income countries. Leishmaniasis, African (sleeping sickness) and American trypanosomiasis (Chagas disease) caused by trypanosomatids are among the most neglected tropical scourges related to poverty and poor health systems. The reproduction of these microorganisms has long been considered to be clonal due to population genetic observations. However, there is increasing evidence of true sex and genetic exchange events under laboratory conditions. We would like to highlight the importance of this topic in the field of host/parasite interplay, virulence, and drug resistance.

Abstract: Diseases caused by trypanosomatids (Sleeping sickness, Chagas disease, and leishmaniasis) are a serious public health concern in low-income endemic countries. These diseases are produced by single-celled parasites with a diploid genome (although aneuploidy is frequent) organized in pairs of non-condensable chromosomes. To explain the way they reproduce through the analysis of natural populations, the theory of strict clonal propagation of these microorganisms was taken as a rule at the beginning of the studies, since it partially justified their genomic stability. However, numerous experimental works provide evidence of sexual reproduction, thus explaining certain naturally occurring events that link the number of meiosis per mitosis and the frequency of mating. Recent techniques have demonstrated genetic exchange between individuals of the same species under laboratory conditions, as well as the expression of meiosis specific genes. The current debate focuses on the frequency of genomic recombination events and its impact on the natural parasite population structure. This paper reviews the results and techniques used to demonstrate the existence of sex in trypanosomatids, the inheritance of kinetoplast DNA (maxi- and minicircles), the impact of genetic exchange in these parasites, and how it can contribute to the phenotypic diversity of natural populations.

Keywords: Trypanosomatids; clonal and sexual reproduction; genetic exchange; ploidy; virulence; drug resistance

1. Clonal Theory or True Sex?

The question of how trypanosomatids reproduce is the subject of debate between two often apparently irreconcilable schools of thought. On the one hand, there are those who,



Citation: Gutiérrez-Corbo, C.; Domínguez-Asenjo, B.; Martínez-Valladares, M.; Pérez-Pertejo, Y.; García-Estrada, C.; Balaña-Fouce, R.; Reguera, R.M. Reproduction in Trypanosomatids: Past and Present. *Biology* **2021**, *10*, 471. <https://doi.org/10.3390/biology10060471>

Academic Editors: Alexis Beaurepaire and Robert Fleischer

Received: 30 April 2021

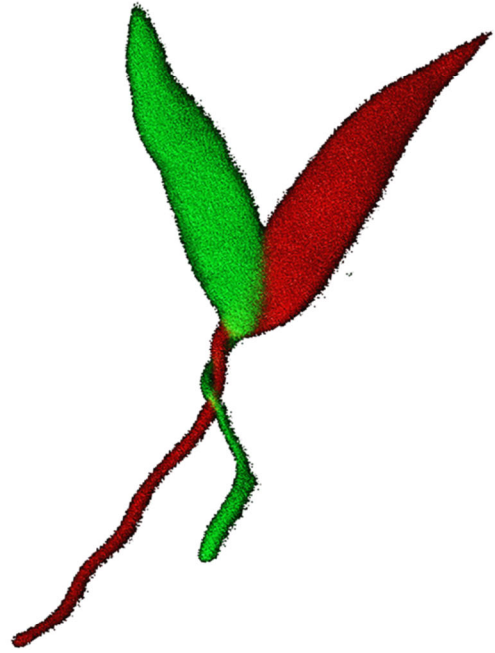
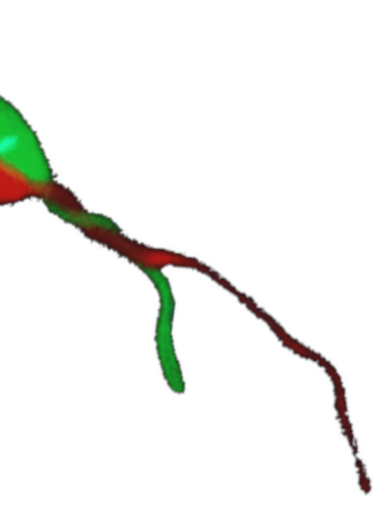
Accepted: 25 May 2021

Published: 27 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

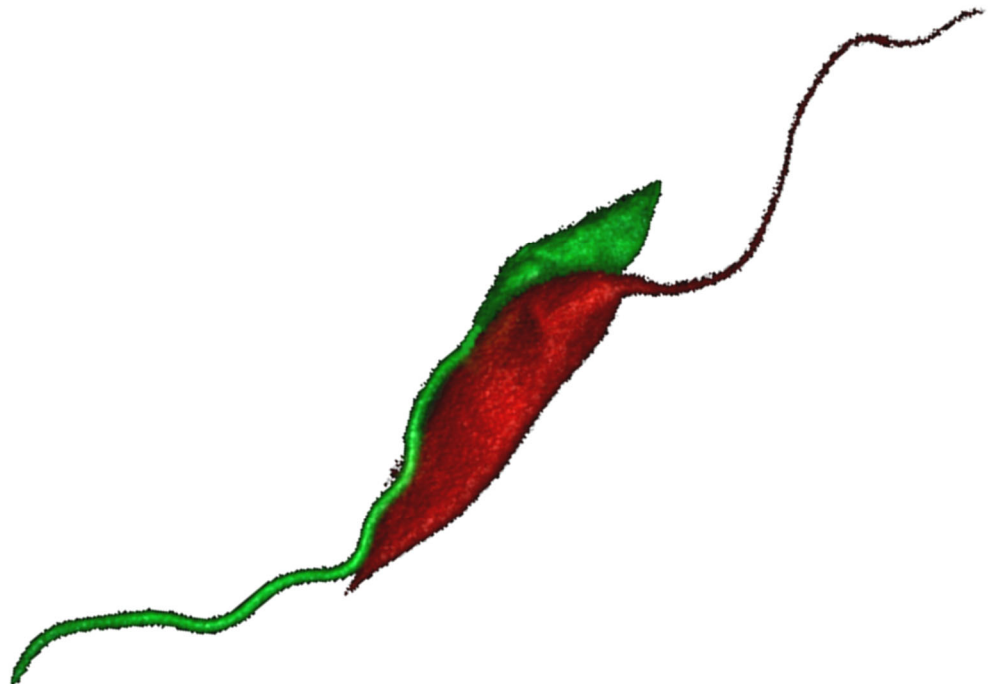


Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Anexo II

Otras publicaciones como coautora



Ex Vivo Phenotypic Screening of Two Small Repurposing Drug Collections Identifies Nifuratel as a Potential New Treatment against Visceral and Cutaneous Leishmaniasis

Bárbara Domínguez-Asenjo, Camino Gutiérrez-Corbo, María Álvarez-Bardón, Yolanda Pérez-Pertejo, Rafael Balaña-Fouce,^{*,†} and Rosa M. Reguera^{*,†}

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00139>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

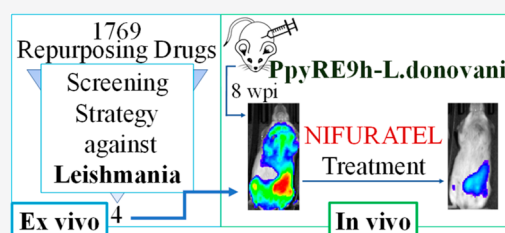
Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Leishmaniasis are vector-borne neglected diseases caused by single-celled parasites. The search for new antileishmanial drugs has experienced a strong boost thanks to the application of bioimaging to phenotypic screenings based on intracellular amastigotes. Mouse splenic explants infected with fluorescent strains of *Leishmania* are proven tools of drug discovery, where hits can be easily transferred to preclinical in vivo models. We have developed a two-staged platform for antileishmanial drugs. First, we screened two commercial collections of repurposing drugs with a total of 1769 compounds in ex vivo mouse splenocytes infected with an infrared emitting *Leishmania infantum* strain.

The most active and safest compounds were scaled-up to in vivo models of chronic *Leishmania donovani* visceral leishmaniasis and *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis. From the total of 1769 compounds, 12 hits with selective indices >35 were identified, and 4 of them were tested in vivo in a model of *L. donovani* visceral leishmaniasis. Nifuratel, a repurposed synthetic nitrofurane, when administered orally at 50 mg/kg bw once or twice a day for 10 days, caused >80% reduction in the parasitic load. Furthermore, the intralesional administration of nifuratel in a model of cutaneous leishmaniasis by *L. major* produced the parasitological cure. From the previous results we have deduced the great capacity of mouse splenic explants to identify new hits, a model which could be easily transferred to in vivo models, as well as the potential use of nifuratel as an alternative to the current treatment of cutaneous leishmaniasis.

KEYWORDS: leishmaniasis, drug discovery, ex vivo explants, in vivo imaging, drug repurposing, nifuratel



Leishmaniasis are a group of diseases caused by single-celled parasites of the genus *Leishmania* and transmitted by *Phlebotomus* and *Lutzomyia* sandflies. Cutaneous leishmaniasis (CL), caused by *L. major*, is characterized by ulcerations and papules around the insect feeding site. These lesions could heal spontaneously, leaving permanent scars, or become chronic in severe cases. Although CL is not life-threatening, it can lead to stigmatization and social exclusion. *L. donovani* and *L. infantum* visceral leishmaniasis (VL) is characterized by fever, weight loss, and hepatosplenomegaly. VL is fatal without treatment, causing between 20 000 to 50 000 deaths per year.^{1–3} Nowadays, there is no effective vaccine against any form of leishmaniasis, and therefore, treatment is just based on chemotherapy.¹

Drug repurposing is a well-established drug discovery strategy aimed at identifying new biological functions of approved medicines. Some of the strengths of this strategy lie in the following: (i) pharmacokinetic (PK) data are available for some species; (ii) the time frame for drug development can be reduced because most preclinical testing, safety assessment, and, in some cases, formulation development have already been completed; (iii) less investment is needed, although this will vary greatly depending on the stage and process of

development of the repurposing candidate. For all these advantages, drug repurposing is a suitable approach for neglected tropical diseases, where new treatments are urgently needed. We should not overlook the fact that this strategy has been successfully applied in the past against leishmaniasis. In fact, 62.5% of current antileishmanial drugs such as amphotericin B, miltefosine, and pentamidine were initially used as antifungal, anticancer, and antimicrobial agents, respectively.^{4,5}

Undoubtedly, drug development against leishmaniasis is currently experiencing a golden age given that the pipeline of compounds to enter phase I has more candidates than ever.^{6–10} However, the hit rate during mass screening campaigns is not as high as expected due to the low degree of predictability of the methods used.¹¹ Drug screening

Received: March 18, 2021

Bioluminescent Imaging Identifies Thymus, As Overlooked Colonized Organ, in a Chronic Model of *Leishmania donovani* Mouse Visceral Leishmaniasis

Bárbara Domínguez-Asenjo, Camino Gutiérrez-Corbo, Yolanda Pérez-Pertejo, Salvador Iborra, Rafael Balaña-Fouce,* and Rosa M. Reguera*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00864>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



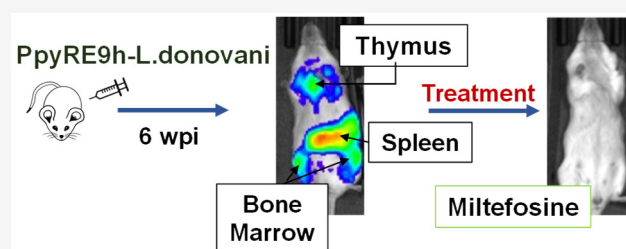
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The search for new drugs against neglected parasitic diseases has experienced a major boost in recent years with the incorporation of bioimaging techniques. Visceral leishmaniasis, the second more neglected disease in the world, has effective treatments but with several disadvantages that make the search for new therapeutic solutions an urgent task. Animal models of visceral leishmaniasis that resemble the human disease have the disadvantage of using hamsters, which are an outbred breeding animal too large to obtain acceptable images with current bioimaging methodologies. Mouse models of visceral leishmaniasis seem, however, to be more suitable for early (acute) stages of the disease, but not for chronic ones. In our work, we describe a chronic Balb/c mouse model in which the infection primarily colonizes the spleen and well recreates the late stages of human disease. Thanks to the bioluminescent image, we have been able to identify experimentally, for the first time, a new primary lymphoid organ of colonization, the thymus, which appears infected from the beginning until the late phases of the infection.

KEYWORDS: *Leishmania donovani*, drug discovery, in vivo imaging, thymus



Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic neglected disease produced by single-celled parasites of the genus *Leishmania* (*Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*) and transmitted by *Phlebotomus* and *Lutzomyia* sandflies.¹ *L. donovani* is mainly transmitted from human to human, unlike *L. infantum*, whose transmission is mostly zoonotic. Although VL is a disease that has been known for centuries and has high mortality (according to WHO, the incidence is more than 30 000 fatalities per year in the absence of treatment (https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)), no effective vaccine for humans is yet available. In addition, the existing drugs are unsafe, ineffective in certain geographical areas due to the emergence of resistance, and mostly depend on parenteral administration, which reduces patient adherence to long periods of treatment.^{2,3}

The high prevalence of these diseases in endemic regions of the planet, the suffering caused by the disease, not only from a health perspective but also from an economic point of view, and the lack of general interest in the so-called neglected diseases make research into safer and more effective therapeutic alternatives by all public and private stakeholders more necessary than ever in order to eradicate them in the shortest time possible.²

The research of new drugs against VL has had an important boost in recent years thanks to the effort done by supranational entities such as DNDi along with academic institutions and

public and private research centers, which have developed campaigns for its rapid eradication from a multidisciplinary perspective. This includes, from massive screening of new or repurposed molecules in systems with greater translatability, to preclinical *in vivo* models that have incorporated new candidates to the initial clinical phases in a short period of time.^{4–6}

The incorporation of modified transgenic parasites that emit light or fluorescence in the presence of specific substrates along with the development of bioimaging detection equipment have been a great step forward in the progress of preclinical models of VL in experimental animals.^{7–10} The development of *Leishmania* strains stably transfected with the gene encoding firefly luciferase that, in the presence of luciferin, emit light from internal organs allows real-time analysis of the course of an infection and its treatment without the need to sacrifice animals.^{11,12} Moreover, due to *in vivo* imaging being a friendly, nonlethal procedure, which could be performed repetitively,

Received: December 10, 2020



Article

Mannose-Decorated Dendritic Polyglycerol Nanocarriers Drive Antiparasitic Drugs To *Leishmania infantum*-Infected Macrophages

Laura I. Vossen ^{1,†}, Bárbara Domínguez-Asenjo ^{2,†}, Camino Gutiérrez-Corbo ², M. Yolanda Pérez-Pertejo ², Rafael Balaña-Fouce ² , Rosa María Reguera ^{2,*} and Marcelo Calderón ^{3,4,*}

¹ Institute of Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Takustrasse 3, 14195 Berlin, Germany; livhmio@hotmail.com

² Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of León, 24071 León, Spain; bdoma@unileon.es (B.D.-A.); mgutc@unileon.es (C.G.-C.); myperp@unileon.es (M.Y.P.-P.); rbalf@unileon.es (R.B.-F.)

³ POLYMAT & Applied Chemistry Department, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country UPV/EHU, Paseo Manuel de Lardizabal 3, 20018 Donostia-San Sebastián, Spain

⁴ IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48013 Bilbao, Spain

* Correspondence: rmregt@unileon.es (R.M.R.); marcelo.calderon@polymat.eu (M.C.); Tel.: +34-987295225 (R.M.R.); +34-943018182 (M.C.)

† These authors contributed equally to the article.

Received: 3 July 2020; Accepted: 21 September 2020; Published: 24 September 2020



Abstract: Macrophages are hosts for intracellular pathogens involved in numerous diseases including leishmaniasis. They express surface receptors that may be exploited for specific drug-targeting. Recently, we developed a PEGylated dendritic polyglycerol-based conjugate (PG-PEG) that colocalizes with intracellular parasite. We hereby study the effect of surface decoration with mannose units on the conjugates' targeting ability toward leishmania intracellular parasites. Murine and human macrophages were exposed to fluorescently labeled mannosylated PG-PEG and uptake was quantified by flow cytometry analysis. Nanocarriers bearing five mannose units showed the highest uptake, which varied between 30 and 88% in the population in human and murine macrophages, respectively. The uptake was found to be dependent on phagocytosis and pinocytosis (80%), as well as clathrin-mediated endocytosis (79%). Confocal microscopy showed that mannosylated PG-PEGs target acidic compartments in macrophages. In addition, when both murine and human macrophages were infected and treated, colocalization between parasites and mannosylated nanoconjugates was observed. *Leishmania*-infected bone marrow-derived macrophages (BMM) showed avidity by mannosylated PG-PEG whereas non-infected macrophages rarely accumulated conjugates. Moreover, the antileishmanial activity of Amphotericin B was kept upon conjugation to mannosylated PG-PEG through a pH-labile linker. This study demonstrates that leishmania infected macrophages are selectively targeted by mannosylated PEGylated dendritic conjugates.

Keywords: nanocarriers; polyglycerol; amphotericin B; mannosylated surface decoration; macrophage residing *Leishmania infantum*

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of neglected diseases transmitted by the bite of blood-sucking sandflies infected with parasites of the genus *Leishmania* [1]. Among the different species of *Leishmania*, *L. donovani* and *L. infantum* in the Old World and *L. chagasi* (*infantum*) in the New World are responsible

DNA flowerstructure co-localizes with human pathogens in infected macrophages

Oskar Franch^{1,2}, Camino Gutiérrez-Corbo³, Bárbara Domínguez-Asenjo³, Thomas Boesen^{2,4}, Pia Bomholt Jensen², Lene N. Nejsum⁵, Josephine Geertsen Keller^{1,5}, Simon Pagaard Nielsen¹, Prakruti R. Singh⁶, Rajiv Kumar Jha⁶, Valakunja Nagaraja⁶, Rafael Balaña-Fouce³, Yi-Ping Ho^{7,8}, Rosa María Reguera³ and Birgitta Ruth Knudsen^{1,2,*}

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark, ²Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus University, Aarhus, Denmark, ³Department of Biomedical Science, University of León, León, Spain, ⁴DANDRITE, Nordic EMBL Partnership for Molecular Medicine, Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark, ⁵Department of Clinical Medicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark, ⁶Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science & Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Bangalore, India, ⁷Department of Biomedical Engineering, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR and ⁸Centre for Novel Biomaterials, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR

Received October 30, 2019; Revised April 16, 2020; Editorial Decision April 16, 2020; Accepted April 24, 2020

ABSTRACT

Herein, we characterize the cellular uptake of a DNA structure generated by rolling circle DNA amplification. The structure, termed nanoflower, was fluorescently labeled by incorporation of ATTO488-dUTP allowing the intracellular localization to be followed. The nanoflower had a hydrodynamic diameter of approximately 300 nanometer and was non-toxic for all mammalian cell lines tested. It was internalized specifically by mammalian macrophages by phagocytosis within a few hours resulting in specific compartmentalization in phagolysosomes. Maximum uptake was observed after eight hours and the nanoflower remained stable in the phagolysosomes with a half-life of 12 h. Interestingly, the nanoflower co-localized with both *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania infantum* within infected macrophages although these pathogens escape lysosomal degradation by affecting the phagocytotic pathway in very different manners. These results suggest an intriguing and overlooked potential application of DNA structures in targeted treatment of infectious diseases such as tuberculosis and leishmaniasis that are caused by pathogens that escape the human immune system by modifying macrophage biology.

INTRODUCTION

DNA structures present several advantages for drug delivery purposes. These include biocompatibility, safety, stability and the ease by which entities with different shape, size and functionalizations can be designed (1). Cellular delivery of unfunctionalized or various functionalized DNA structures to cell lines or even in whole organisms have been demonstrated in a large number of studies (2–13). Interestingly, in the context of drug delivery purposes, the rigid or compact nature of DNA structures appears to make them more prone for entering living cells than linear single- or double-stranded DNA (14). For example, efficient cellular uptake of Spherical Nucleic Acids (SNAs) was demonstrated to be facilitated by scavenger receptors (15,16). Consistently, we observed uptake of a pristine octahedral DNA nanocage in COS-1 cells transfected with a scavenger receptor (Lox1) expressing plasmid but not in un-transfected COS-1 (17) or HEK293T cells (18). The Fan and Tuberclefield groups, on the other hand, demonstrated uptake of a pristine DNA tetrahedron in un-transfected HeLa and HEK293T cells (19,20) and studies suggest that the ‘pointy-ends’ in tetrahedral structures may facilitate internalization (21,22).

Once internalized, the cellular stability of DNA structures is rather high varying between 24 and 48 h depending on the identity of the structure (20,23,24). Unless targeted to other organelles, most DNA structures are directed to the phagolysosomes of treated cells (17,19,23,25,26). This localization presents an obvious advantage, when it comes to treatment of infectious diseases caused by intracellular


*To whom correspondence should be addressed. Tel: +45 60202673; Email: brk@mbg.au.dk

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Antiparasitic effect of synthetic aromathecins on *Leishmania infantum*

Rosa M. Reguera¹, Raquel Álvarez-Velilla¹, Bárbara Domínguez-Asenjo¹, Camino Gutiérrez-Corbo¹, Rafael Balaña-Fouce¹, Mark Cushman² and Yolanda Pérez-Pertejo^{1*} 

Abstract

Background: Canine leishmaniasis is a zoonotic disease caused by *Leishmania infantum*, being the dogs one of the major reservoirs of human visceral leishmaniasis. DNA topology is a consolidated target for drug discovery. In this regard, topoisomerase IB – one of the enzymes controlling DNA topology – has been poisoned by hundreds of compounds that increase DNA fragility and cell death. Aromathecins are novel molecules with a multiheterocyclic ring scaffold that have higher stability than camptothecins.

Results: Aromathecins showed strong activity against both forms of *L. infantum* parasites, free-living promastigotes and intra-macrophagic amastigotes harbored in ex vivo splenic explant cultures obtained from infected BALB/c mice. However, they prevented the relaxation activity of leishmanial topoisomerase IB weakly, which suggests that the inhibition of topoisomerase IB partially explains the antileishmanial effect of these compounds. The effect of aromathecins was also studied against a strain resistant to camptothecin, and results suggested that the trafficking of these compounds is not through the ABCG6 transporter.

Conclusions: Aromathecins are promising novel compounds against canine leishmaniasis that can circumvent potential resistances based on drug efflux pumps.

Keywords: *Leishmania*, DNA-topoisomerase IB, Camptothecin, Aromathecins

Background

Canine leishmaniasis (CanL) is a serious zoonotic disease caused by *L. infantum* in the Old World and *L. infantum chagasi* in the New World. Dogs affected by this disease become reservoirs of human visceral leishmaniasis, being extremely relevant the presence of *L. infantum* as its subspecies in Latin America, mainly in Brazil. Although there are several vaccines in use, and preventive measures including collars impregnated with insecticide or spot-on drops contribute to reduce the endemicity of this disease, the use of drugs is strictly necessary when the signs and symptoms appear in the animal. Nowadays, antimony-based (Sb^V) drugs, alone or in combination with allopurinol, are considered the gold standard treatment against CanL in southern European countries, whereas the oral drug miltefosine is used as second-line drug [1]. However, the mandatory parenteral administration

of Sb^V and the multiple side effects of Sb^{III} (product of enzymatic activation of the drug by host enzymes), are some of the causes of treatment interruption, which favors the emergence of relapses in the first-year post-treatment. Related to drug misuse is the emergence of resistant strains that may be triggered by host or parasite factors. Among the factors linked to the host, the most prevalent are those related to the alterations of pharmacokinetic parameters or the immunological system. On the other hand, factors related to parasites include structural modifications of target proteins, along with overexpression of ABC and multiple drug resistance (MDR) proteins [2]. Therefore, drug discovery research in this field is absolutely necessary to find new drugs for the management of CanL.

DNA topoisomerases are consolidated targets for drug development in cancer and infectious diseases. DNA topoisomerase IB (TopIB) is involved in relaxing supercoiled DNA by a DNA breaking and rejoining process. In this process TopIB cleaves one DNA strand by nucleophilic attack from the catalytic tyrosine placed in the active site, which becomes linked to 3' phosphate end of

* Correspondence: myperp@unileon.es

¹Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n; 24071 León (SPAIN), León, Spain

Full list of author information is available at the end of the article





Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis

Rafael Balaña-Fouce, M. Yolanda Pérez Pertejo, Bárbara Domínguez-Asenjo, Camino Gutiérrez-Corbo and Rosa M. Reguera



Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana, E-24071 León, Spain

The current commitment of the pharma industry, nongovernmental organizations and academia to find better treatments against neglected tropical diseases should end decades of challenge caused by these global scourges. The initial result of these efforts has been the introduction of enhanced combinations of drugs, currently in clinical use, or formulations thereof. Phenotypic screening based on intracellular parasite infections has been revealed as the first key tool of antileishmanial drug discovery, because most first-in-class drugs entering Phase I trials were discovered this way. The professional commitment among stakeholders has enabled the availability of a plethora of new chemical entities that fit the target product profile for these diseases. However, the rate of hit discovery in leishmaniasis is far behind that for other neglected diseases. This review defends the need to develop new screening methods that consider the part played not only by intracellular parasites but also by the host's immune system to generate disease-relevant assays and improve clinical outcomes.

Introduction

Leishmaniasis (see [Glossary](#)) is a neglected tropical disease (NTD), endemic in 98 countries. Currently, 12 million people are affected with leishmaniasis, >350 million people are at risk of contracting the infection and over one million new cases are reported each year. This parasitic disease has four main clinical syndromes: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL), visceral or Kala-azar leishmaniasis (VL) and post Kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). VL is ranked second in mortality and fourth in morbidity among NTDs, with 20 000–40 000 deaths annually. The majority of cases (90%) are reported in three endemic foci: (i) India; (ii) East Africa; and (iii) Brazil [1]. In the absence of vaccines, chemotherapy and vector control are the tools for disease management [2].

In 2005, the Indian Subcontinent, where the disease is caused by *Leishmania donovani* and has anthroponotic transmission, launched an initiative to eliminate the disease by 2017 [3]. In 2014, Bhutan and Thailand joined the initiative and the goal was set for 2020 [4],

although this has since been delayed [5]. The potential role of asymptotically infected humans and animals, along with the important reservoir of infection that can represent PKDL patients, are some reasons raised to explain this delay [5]. Recently, new models of transmission, including not only active VL but also asymptomatic and PKDL patients, concluded that the current policy recommendations by WHO, which are based on the combination of indoor spraying of insecticide and the reduction of onset-to-treatment times, would be sufficient to achieve the elimination target in all settings [6]. Treatments are mainly based on a single dose of liposomal amphotericin B (LAMB) [7] but its poor stability along with cold-chain issues in endemic districts imply other alternatives based on combination therapy, such as a single dose of LAMB (5 mg/kg) plus 7 days of oral miltefosine (50 mg once daily) or single dose of LAMB plus 10 days of paromomycin sulfate (15 mg/kg/day) or miltefosine (50 mg once a day for 10 days) plus paromomycin (15 mg/kg/d for 10 days) [8]. In East Africa, where AIDS is epidemic, VL with HIV co-infection has become a serious challenge [9]. The first-line treatment based on pentavalent antimonials has been replaced with the combination of sodium stibogluconate and paromomycin (SSG

Corresponding author: Reguera, R.M. (rmregt@unileon.es)

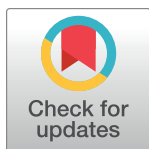
RESEARCH ARTICLE

A chronic bioluminescent model of experimental visceral leishmaniasis for accelerating drug discovery

Raquel Álvarez-Velilla¹, Maria del Camino Gutiérrez-Corbo², Carmen Punzón³, Maria Yolanda Pérez-Pertejo², Rafael Balaña-Fouce², Manuel Fresno^{1,3}, Rosa María Reguera^{2*}

1 Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **2** Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, León, Spain, **3** Diomune S.L Parque Científico de Madrid, Madrid, Spain

* rmregt@unileon.es



Abstract

Background

Visceral leishmaniasis is a neglected parasitic disease with no vaccine available and its pharmacological treatment is reduced to a limited number of unsafe drugs. The scarce readiness of new antileishmanial drugs is even more alarming when relapses appear or the occurrence of hard-to-treat resistant strains is detected. In addition, there is a gap between the initial and late stages of drug development, which greatly delays the selection of leads for subsequent studies.

Methodology/Principal findings

In order to address these issues, we have generated a red-shifted luminescent *Leishmania infantum* strain that enables long-term monitoring of parasite burden in individual animals with an *in vivo* limit of detection of 10^6 intracellular amastigotes 48 h postinfection. For this purpose, we have injected intravenously different infective doses (10^4 — 5×10^8) of metacyclic parasites in susceptible mouse models and the disease was monitored from initial times to 21 weeks postinfection. The emission of light from the target organs demonstrated the sequential parasite colonization of liver, spleen and bone marrow. When miltefosine was used as proof-of-concept, spleen weight parasite burden and bioluminescence values decreased significantly.

Conclusions

In vivo bioimaging using a red-shifted modified *Leishmania infantum* strain allows the appraisal of acute and chronic stage of infection, being a powerful tool for accelerating drug development against visceral leishmaniasis during both stages and helping to bridge the gap between early discovery process and subsequent drug development.

OPEN ACCESS

Citation: Álvarez-Velilla R, Gutiérrez-Corbo MdC, Punzón C, Pérez-Pertejo MY, Balaña-Fouce R, Fresno M, et al. (2019) A chronic bioluminescent model of experimental visceral leishmaniasis for accelerating drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis* 13(2): e0007133. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007133>

Editor: Louis Maes, University of Antwerp, BELGIUM

Received: June 22, 2018

Accepted: January 6, 2019

Published: February 14, 2019

Copyright: © 2019 Álvarez-Velilla et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: RAV received a postdoctoral fellowship from Tres Cantos Open Lab Foundation CBM-ULe_TC178 TCOLF (<http://www.openlabfoundation.org>). MCGC received a predoctoral fellowship from Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (<http://www.educa.jcy.es/es>). RBF was granted by



In vitro anthelmintic activity and safety of different plant species against the ovine gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*

Myriam Esteban-Ballesteros^{a,b}, Jaime Sanchis^c, Camino Gutiérrez-Corbo^d, Rafael Balaña-Fouce^d, Francisco A. Rojo-Vázquez^{a,b}, Camino González-Lanza^a, María Martínez-Valladares^{a,b,*}

^a Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Grulleros 24346, León, Spain

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, León 24071, Spain

^c Departamento de Parasitología, Universidad de la República (Regional Norte), Salto, Uruguay

^d Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, León 24071, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Plant extract
Egg hatch assay
Anthelmintic activity
Cytotoxicity
Teladorsagia circumcincta

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the *in vitro* anthelmintic activity and safety of methanolic and aqueous extracts of 9 plants against the ovine GIN *Teladorsagia circumcincta*. Initially the ovicidal efficacy of all extracts was tested at 50 mg/ml and at 1%, this last concentration for the methanolic extract of *Elettaria cardamomum*, by the Egg Hatch Assay. In those extracts with efficacy higher than 95%, the effective concentration required to inhibit 50% of egg hatching (EC₅₀) and their cytotoxicity, as the lethal dose 50 (LC₅₀), was also measured. The aqueous extracts of *Aesculus hippocastanum*, *Isatis tinctoria*, *Chelidonium majus*, *E. cardamomum* and *Sisymbrium irio*, with EC₅₀ values ranging 1.30–2.88 mg/ml, and the aqueous extract of *Jasminum polyanthum* with a value of 6.41 mg/ml, showed the highest activities. The aqueous extract of *J. polyanthum* was the safest extract, followed by methanolic extract of *E. cardamomum* and aqueous extract of *S. irio*, all of them with a Selective Index higher than 1. According to our results, there is no correlation between the amount of total phenols or total tannins with the anthelmintic activity of the plants tested. Although results need to be interpreted with caution, as *in vitro* activity may not automatically translate into *in vivo* efficacy, those extracts with SI equal or higher than 1 and EC₅₀ equal or lower than 6 mg/ml, could be taken into account for being used subsequently as feed or food additives in infected sheep.

1. Introduction

Parasitic infections caused by gastrointestinal nematodes (GINs) are a worldwide health problem in grazing farm animals, mainly ruminants. These infections cause lack of appetite, diarrhea, anemia and, in severe cases, death (Athanasiadou and Kyriazakis, 2004). The usual mode of controlling GIN infections in ruminants is the administration of anthelmintic drugs. However, the misuse of these drugs has caused a rapid development of anthelmintic resistance in worm populations due to a rise in the frequency of resistant alleles (Martínez-Valladares et al., 2012a, 2012b). Moreover, the administration of these drugs leads to the presence of chemical residues in meat and milk, resulting in withdrawal periods that produce economic losses and, at the same time, increasing the risk of environmental contamination. These disadvantages have stimulated the search for alternative control methods, such as the use of new compounds with anthelmintic properties like some traditional medicinal plants.

In recent years many authors have reviewed the anthelmintic properties of different plants or extracts collected around the world (Acharya et al., 2014; Adamu et al., 2013; Egualé et al., 2007a, 2007b; Kozan et al., 2006; Pessoa et al., 2002). Among many studies, one example is the study carried out by Lone et al. (2012) who found a significant anthelmintic activity, *in vitro* and *in vivo*, of aqueous and methanolic extracts of *Euphorbia helioscopia* against mixed GIN infections in sheep.

It is believed that the anthelmintic activity in plants is related to the amount of condensed tannins and/or others secondary metabolites such as flavonoids, steroids, terpenoids, alkaloids, saponins, etc. (Hoste et al., 2006, 2012; Marie-Magdeleine et al., 2010; Vargas-Magaña et al., 2014). However, the amount of these compounds in the plant depends on the season when plant is collected, its geographical origin and phenological stage, among other factors (Manolaraki, 2011; Novobilsky et al., 2013). The importance of tannins is due to the fact that some studies in ruminants suggested that parasitised sheep and red deer

* Corresponding author at: Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Grulleros 24346, León, Spain.

E-mail address: mmarva@unileon.es (M. Martínez-Valladares).