



universidad
de león

Tesis Doctoral

**Nueva Estrategia
para el
Descubrimiento
y
Desarrollo
de
Fármacos
Leishmanicidas**

Bárbara Domínguez Asenjo

Ciencias Biomédicas y de la Salud

Rosa M^a Reguera Torres

Rafael Balaña Fouce

León, 2021



universidad
de león

Tesis Doctoral

**Nueva Estrategia
para el
Descubrimiento y Desarrollo
de
Fármacos Leishmanicidas**

Bárbara Domínguez Asenjo

Ciencias Biomédicas y de la Salud

Rosa M^a Reguera Torres

Rafael Balaña Fouce

León, 2021

Obra de Hilma af Klint

El trabajo recogido en la presente memoria se ha podido realizar gracias a la financiación del Fondo Social Europeo y la Junta de Castilla y León, a través del contrato predoctoral (LE208-17) concedido (ORDEN EDU/574/2018, de la Consejería de Educación) al amparo de la convocatoria “Ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador 2017”.



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro



Agradecimientos

A lo largo de este camino tan duro y tan único a la vez, llamado “realizar una tesis” he contado con la ayuda, la compañía y el apoyo de muchas personas a las que me gustaría agradecerse.

A mis directores, Rosa y Rafa gracias por confiar en mí y abrirme la puerta del fascinante mundo de la investigación; por vuestra paciencia, dedicación, confianza y orientación en esos momentos en los que, durante horas, hemos trabajado mano a mano desarrollando ideas y solucionando problemas; gracias también por las interminables, divertidas e interesantes charlas en las que no solo he aprendido de ciencia, las echaré de menos.

A Yoli, gracias por escucharme y ayudarme cada vez que entraba en tu despacho y te interrumpía con alguna de mis ideas.

A Carlos, gracias por tu apoyo, especialmente con el inglés, una pena no haber podido coincidir más tiempo en el departamento.

A Camino, hemos vivido tantos logros, momentos difíciles y anécdotas juntas que te has convertido en un apoyo fundamental fuera y dentro del laboratorio. Gracias por ser mi amiga, mi compañera de aventuras, este viaje no hubiera sido lo mismo sin ti “Mary Way”.

A mis compañeros de laboratorio María, Rubén y Estela, gracias por estar siempre que he necesitado vuestra ayuda, por los divertidos momentos en el laboratorio, me alegra haber compartido mi día a día con vosotros.

A Irene, gracias porque sin tu trabajo, paciencia y apoyo diario este camino hubiera sido mucho más difícil.

A mis padres Olga y Manolo, sin cuyo esfuerzo y apoyo jamás hubiera llegado hasta aquí, gracias por escucharme, entenderme y ayudarme siempre.

A Héctor, gracias por apoyarme y sacarme una sonrisa con tu característico humor en los momentos en los que más lo necesitaba, se nota que somos hermanos.

A Alex, aunque no compartimos apellido sabes que eres un miembro más de mi familia, gracias por estar siempre ahí y por escucharme en mis momentos de desahogo.

A Javi, gracias por entender la “locura” que supone realizar una tesis, por acompañarme, escucharme, animarme y distraerme cuando pasaba un mal momento, por disfrutar conmigo de los éxitos y hacerlos aún más especiales.

A mis amigos, Jesús, Paula y Sandra gracias por los grandes momentos que hemos vivido juntos, por soportar mis charlas monotemáticas, hablando de mi tesis y mis agobios mientras tomábamos una caña.

Índice

Agradecimientos	V
Índice de Tablas	XI
Índice de Esquemas	XIII
Índice de Figuras	XV
Abreviaturas	XXV
Resumen	29
INTRODUCCIÓN	0
Género <i>Leishmania</i>	35
Leishmaniasis	38
Leishmaniasis cutánea	39
Leishmaniasis mucocutánea	42
Leishmaniasis visceral	42
Leishmaniasis dérmica postkala-azar	45
Principales fármacos leishmanicidas en uso clínico	46
Antimoniales Pentavalentes	46
Anfotericina B	48
Miltefosina	50
Desarrollo de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis	51
Estrategias aplicadas en el desarrollo de nuevos tratamientos	51
Reposicionamiento de fármacos	51
Terapia combinada	52
Nanoencapsulación de fármacos	53
Evaluación de la actividad leishmanicida <i>in vitro</i>	54
Evaluación de la actividad <i>in vivo</i>	61
Referencias	65
OBJETIVOS	82
ARTÍCULO 1	86
Bioluminescent imaging identifies thymus, as overlooked colonized organ, in a chronic model of <i>Leishmania donovani</i> mouse visceral leishmaniasis	89
Abstract	89

Keyworks	89
Introduction	89
Results	91
Discussion	102
Methods	106
Associated content	108
Author information	108
Acknowledgments	109
References	110
Supporting Information	115
ARTÍCULO 2	118
<i>Ex vivo</i> phenotypic screening of two small repurposing drug collections identifies nifuratel as a potential new treatment against visceral and cutaneous leishmaniasis	121
Abstract	121
Keyworks	121
Introduction	122
Results	123
Discussion	130
Methods	134
Associated content	138
Author information	138
Acknowledgments	139
References	140
Supporting Information	147
ARTÍCULO 3	152
Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to <i>Leishmania infantum</i>-infected macrophages	155
Abstract	155
Keywords	156
Introduction	156
Materials and methods	158
Results	167
Conclusions	179
Associated content	180

Author information _____	180
Funding _____	181
References _____	181
Supporting Information _____	187
DISCUSIÓN GENERAL _____	197
Referencias _____	205
CONCLUSIONES _____	209
ANEXO I: Compendio de publicaciones _____	214
ANEXO II: <i>Curriculum vitae</i> _____	215

Índice de Tablas

Introducción

Tabla 1. Diferentes poblaciones de macrófagos empleadas como célula hospedadora en infecciones *in vitro* de *Leishmania* spp. _____ 58

Artículo 2: *Ex vivo* phenotypic screening of two small repurposing drug collections identifies nifuratel as a potential new treatment against visceral and cutaneous leishmaniasis

Table 1 Effectiveness and safety of the 43 compounds that reduce the viability of *L. infantum* by more than 70% at 1 μ M, in at least one of the experimental replicates. _____ 126

Artículo 3: Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to *Leishmania infantum*-infected macrophages

Table 1. Summary of characteristics of precursors and products. _____ 169

Table S1. Physicochemical Characterization of PG-PEG-Mann(n)-FITC conjugates. ____ 188

Índice de Esquemas

Artículo 3: Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to *Leishmania infantum*-infected macrophages

Scheme 1. Schematic pathways for the synthesis of (A) the precursor PG-PEG-Mann(n) and (B) mannose-bearing polymer-drug conjugates. Chemical structures of all the precursors are depicted in the bottom panel. _____ 162

Scheme S1. Synthesis of 2-azidoethyl- α -D-mannopyranoside and reaction yields of each step.

Imagen creada con BioRender.com. _____ 188

Scheme 2. Synthesis of AmB-EMCH. _____ 191

Scheme S3. Synthesis of amine-bearing polyglycerol. _____ 192

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1. Micrografía electrónica del kADN de un miembro de la clase *Kinetoplastea*. Flecha (→) indica un minicírculo; punta de flecha (►) señala parte de un maxicírculo. Imagen tomada de la referencia 3. _____ 35

Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1. Infección del huésped por la inoculación de promastigotes metacíclicos durante la ingesta de sangre del flebótomo. 2. Reclutamiento de neutrófilos. 3. Infección de macrófagos. 4. Diferenciación a la forma amastigote. 5. Replicación del amastigote por fisión binaria. 6. Los amastigotes abandonan la célula hospedadora. 7. Infección de nuevas células. 8. Ingestión de parásitos y células infectadas por los flebótomos. 9. Diferenciación de los amastigotes en promastigotes procíclicos dentro del tracto digestivo del flebótomo. 10. Diferenciación en nectomonas. 11. Diferenciación en leptomonas. 12. Diferenciación a promastigotes metacíclicos. 13. Diferenciación cíclica entre metacíclicos y retroleptomonas. Imagen tomada de la referencia 16. _____ 37

Figura 3. Situación de endemidad de la leishmaniasis cutánea (LC) en el 2018 en el mundo. Imagen modificada de la referencia 20. _____ 40

Figura 4. Evolución de la lesión en un paciente con leishmaniasis cutánea contraída en Bolivia. Imagen tomada de la referencia 27. _____ 40

Figura 5. Lesiones causadas por leishmaniasis mucocutánea grave. En la parte izquierda de la figura, lesión que afecta a la fosa nasal derecha, al labio superior y al surco nasal. En la parte derecha de la figura, lesión que afecta a la úvula y al paladar blando adyacente. Imagen tomada de la referencia 27. _____ 42

Figura 6. Situación de endemidad de la leishmaniasis visceral (LV) en el 2018 en el mundo. Imagen modificada de la referencia 20. _____ 43

Figura 7. Lesiones causadas por leishmaniasis dérmica postkala-azar (LDPK). En la parte izquierda de la figura, erupción maculopapular eritematosa en un niño. En la parte derecha de la figura, erupción macular hipopigmentada en un adulto. Imagen tomada de la referencia 27. _ 45

Figura 8. Estructura de los antimoniales pentavalentes en uso clínico. Imagen tomada de la referencia 22. _____ 46

Figura 9. Mecanismos moleculares de la resistencia a antimoniales pentavalentes en cepas aisladas de *Leishmania* spp. La figura muestra un amastigote en el interior de un macrófago. Explica los métodos de entrada de los antimoniales y los mecanismos intracelulares empleados por el parásito para expresar el fenotipo resistente. AQP1 (aquaporina 1), MRPA (multidrug resistance associated protein A), SbV (antimonial pentavalente), SbIII (antimonial trivalente), Try (Tripanotión). Imagen creada con BioRender.com. _____ 47

Figura 10. Estructura de la anfotericina B. Imagen tomada de la referencia 22. _____ 48

- Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de acción de la anfotericina B (AMB).** Imagen creada con BioRender.com. _____ 49
- Figura 12. Estructura de la miltefosina.** Imagen tomada de la referencia 22. _____ 50
- Figura 13. Comparación entre las rutas de descubrimiento de fármacos *de novo* y de reposicionamiento.** Imagen tomada de la referencia 75. _____ 52
- Figura 14. Esquema de un liposoma y una nanopartícula polimérica.** En la parte izquierda de la imagen, esquema de un liposoma. La bicapa de fosfolípidos rodea el núcleo acuoso del liposoma, permitiendo transporte de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. Se muestra la estructura de un solo fosfolípido. En la parte derecha, esquema de una nanopartícula polimérica que puede transportar fármacos hidrofóbicos o hidrofílicos. Imagen creada con BioRender.com. _____ 54
- Figura 15. Fotografía tomada en el microscopio óptico de promastigotes y amastigotes axénicos de la especie *L. chagasi*.** Promastigotes (izquierda) cultivados a 26°C y pH7,4 y amastigotes axénicos (derecha) cultivados a 37°C y pH 5,5. El aumento utilizado fue 1000X. Imagen tomada de la referencia 145. _____ 56
- Figura 16. Fotografía de macrófagos infectados con *Leishmania* spp. y teñidos con Giemsa.** (A) Macrófagos sin tratar. (B) Macrófagos infectados y tratados con 0.02µg/mL de anfotericina B. Las flechas indican los macrófagos infectados. Barra: 50 µm. Imagen tomada de la referencia 178. _____ 59
- Figura 17. Métodos empleados actualmente para la cuantificación del número de amastigotes viables.** (A) Método basado en la lectura de microplacas que emplea parásitos modificados genéticamente para que expresen una proteína infrarroja (iRFP). Registro de la fluorescencia infrarroja emitida por una placa de 384 pocillos. Imagen tomada de la referencia 175. (B) Método basado en la microscopia de alto contenido (HCM) que utiliza parásitos modificados genéticamente para que expresen una proteína fluorescente (GFP). Las células hospedadoras son identificadas gracias a las tinciones del núcleo (DAPI) y del citoplasma. Los parásitos fluorescentes son localizados mediante la proteína GFP. El resultado del análisis se muestra en el panel inferior derecho (citoplasma: contorno verde, amastigotes: contorno amarillo). Imagen modificada de la referencia 129. _____ 60
- Figura 18. Reacción catalizada por la enzima luciferasa aislada de luciérnaga.** En la parte izquierda, un ejemplar de la luciérnaga *Amydetes viviannii* emitiendo bioluminiscencia. Imagen tomada de la referencia 203. En la parte derecha de la imagen, esquema de la reacción química: la luciferasa de luciérnaga oxida la D-Luciferina en oxiluciferina y libera un fotón de luz. Imagen creada con BioRender.com. _____ 63
- Figura 19. Modelos animales que emplean parásitos que expresan genes reporteros.** De izquierda a derecha: modelo de LV en Balb/c infectado con *L. infantum* que expresa una luciferasa aislada de luciérnaga. Imagen tomada de la referencia 182. Modelo de LV en hámster sirio infectado con *L. donovani* que expresa una luciferasa aislada de luciérnaga. Imagen tomada de la

referencia187. Modelo de LC en Balb/c infectado con *L. mexicana* que expresa la proteína fluorescente mCherry. Imagen tomada de la referencia 197. _____ 64

Artículo 1: Bioluminescent imaging identifies thymus, as overlooked colonized organ, in a chronic model of *Leishmania donovani* Mouse Visceral Leishmaniasis

Figure 1. Course of the visceral infection after inoculating different doses of *PpyRE9h* luciferase-expressing *L. donovani* metacyclic promastigotes. (A) Representative ventral images of Balb/c mice infected with several doses of metacyclic parasites (10^6 - 10^9). Heat-maps are scaled on log₁₀, indicating the bioluminescence signal from low (blue) to high (red). The minimum and maximum radiances for the pseudocolour scale are indicated. (B) Quantification of total ventral bioluminescence of whole-body infected mice, expressed as total flux (photons/s), from the experiment represented in panel A. _____ 92

Figure 2. Progression of *PpyRE9h* + *L. donovani* infection over the time. (A) Representative ventral view images of Balb/c mice sequentially taken at different time points over 11 weeks after i.p. inoculation of 1.5×10^9 *PpyRE9h L. donovani* metacyclic parasites (representative of n = 4 - 10 mice per experiment). A "*" indicates the place of inoculation; "+" indicates the expected organs targeted by *L. donovani*, such as liver, spleen, lymph nodes and bone marrow. The new location along the chest, which was later replaced by a bright spot on the sternum is identified with "x". (B) *In vivo* images of the same Balb/c infected mouse that had been shaved in the ventral region in order to locate new anatomical sources of luminescence. "*" indicates the place of inoculation; "+" indicates the expected target organs "x" indicates the new location in the thoracic cage. (C) Quantification of the total bioluminescence of whole-body infected mice, expressed as total flux (photons/s), of the experiment represented in panel A. Means \pm SD (n= 4 - 10 animals) are represented. The gray line indicates the detection threshold determined as the mean (solid line) of the background luminescence of the noninfected control mice. The averages of each time are indicated as red lines. _____ 94

Figure 3. Tissue tropism analysis of *PpyRE9h* + *L. donovani* strain in Balb/c mice. (A) Representative display of the organs that were imaged *ex vivo*, at the end of the experiments. (B) *Ex vivo* imaging of Balb/c mice organs infected with several doses of metacyclic parasites (10^6 to 10^9). "*" mesentery, "x" thymus and "→" fat depots around the kidney. (C) Representative ventral images of Balb/c mice taken at sequential time points over the course of 6 weeks after i.p. or i.v. inoculation of 1.5×10^8 *PpyRE9h* + *L. donovani*. "+" thymus and "*" parasite's inoculation sites. (D) *Ex vivo* imaging of thymus and intestine of Balb/c mice infected intraperitoneally (left) or intravenously (right) with 1.5×10^8 *PpyRE9h* + *L. donovani* promastigotes. _____ 97

Figure 4. Progression of the parasite colonization of thymus dissected from mice infected with *PpyRE9h* + *L. donovani*. (A) Giemsa staining of thymus sections obtained from infected with *PpyRE9h* + *L. donovani* after 11 weeks of infection ("→" amastigotes). (B) *Ex vivo* imaging of thymus

isolated from Balb/c mice infected intraperitoneally with 1.5×10^9 promastigotes, at different times. (C) Parasite burdens estimated by qPCR from mouse thymus sacrificed at 1, 2, 3 and 8 wpi. Each point represents the mean \pm SD of $n = 3$ individuals. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA test: (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). _____ 97

Figure 5. Treatment of chronic *L. donovani* infection with 40 mg/kg/d (MTF40) and 10 mg/kg/d miltefosine (MTF10) for 5 consecutive days by oral gavage in Balb/c mice. (A) Schematic representation of the experimental design. Animals were i.p. infected with 10^9 *L. donovani* metacyclic promastigotes and after 6 wpi were orally treated with MTF40 or MTF10 for 5 consecutive days (blue). Mice were then imaged before starting the treatment (image 1) and 72 h (image 2) and 7 days after the end of treatment (image 3). At the last time point, animals were sacrificed and the parasite burden of the liver, spleen, bone marrow and thymus were determined by qPCR. (B) Representative ventral images of Balb/c mice after treatment with MTF40 and MTF10 for 5 consecutive days at several time points. Mice were imaged before starting the treatment (image 1) and 72 h after (image 2) and 7 days after the end of treatment (image 3). Unt represents the animals treated only with the drug vehicle (water). Images are representative of $n = 3 - 5$ individuals per experiment. (C) Quantification of whole ventral bioluminescence, expressed as total flux (photons/s), from the experiment. Each point represents means \pm SD of n individuals. A noninfected group of mice was imaged for quantification of luminescence background (grey dashed line). Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). (D) *Ex vivo* images of mice organs after treatment with MTF40 or MTF10 for 5 consecutive days. Untreated mice (Unt), Lung (Lu), Liver (Li), Spleen (S), Heart (H), Kidney (K), Thymus (T) and Intestine (I). (E) Parasite burdens estimated by qPCR in untreated (Unt) and MTF40 or MTF10 for 5 consecutive days on liver, spleen, bone marrow and thymus. Each point represents means \pm SD of n animals. Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). _____ 100

Figure 6. Effect of an immune suppressive treatment with cyclophosphamide (CPP) after MTF40 treatment of chronic *L. donovani* mouse VL. (A) Schematic representation of the experimental design. Balb/c mice were infected i.p. with 10^9 metacyclic promastigotes and after 6 wpi were orally treated with MTF40 for 5 consecutive days. Animals were imaged before treatment (6wpi) and 72 h after the end of treatment (7wpi). Some of the animals treated with miltefosine were later immunosuppressed with 200 mg/kg cyclophosphamide administered by i.p. injection every 3 days for three doses maximum and imaged 3 days after the last dose. At the last time point, animals were sacrificed, and the parasite load of the liver, spleen, and femur bone marrow was determined by qPCR. (B) Representative ventral view images of Balb/c mice after treatment with MTF40 alone or combined with cyclophosphamide (MTF + CPP). (Unt) represents the animals treated only with the drug vehicle (water). Mice were imaged before treatment (6wpi), 72 h after the end of MTF40 treatment (7wpi), and 3 days after the last dose of CPP. Images are representative of $n = 3 - 5$ individuals per experiment. (C) Quantification of whole ventral bioluminescence, expressed as total

flux (photons/s), from the experiment. Each point represents means \pm SD of n individuals. A noninfected group of mice was imaged for quantification of luminescence background (grey dashed line). Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). (D) *Ex vivo* images of mice organs after treatment with MTF40 or MTF + CPP. Untreated mice (Unt), Lung (Lu), Liver (Li), Spleen (S), Heart (H), Kidney (K), Thymus (T) and Intestine (I). (E) Parasite burdens estimated by qPCR in untreated (Unt) and MTF40 or MTF + CPP on liver, spleen and bone marrow. Each point represents means \pm SD of n animals. Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). _____ 101

Figure 7. Correlation between both *ex vivo* (top) and *in vivo* (bottom) bioluminescence values and parasite burdens in liver spleen and thymus. Bioluminescence was measured *in vivo* and *ex vivo* in ROIs around the corresponding organs and parasite loads were quantified by q-PCR after animals were sacrificed. The statistic correlation used was the Pearson correlation coefficient. *Ex vivo* correlations (P < 0.001), Spleen *in vivo* correlation (P < 0.001), liver *in vivo* correlation (P < 0.05) and thymus *in vivo* correlation was not significant. _____ 102

Figure S1. Localizations of the patches of black modeling clay in a mouse, whose ventral region was previously cream-depilated in order to prevent the interference of the more brilliant light source over the less potent areas. _____ 117

Artículo 2: *Ex vivo* phenotypic screening of two small repurposing drug collections identifies nifuratel as a potential new treatment against visceral and cutaneous leishmaniasis

Figure 1. Screening strategy cascade leading to prioritization from *in vitro* assays to *in vivo* efficacy in mouse models. A total of 1769 compounds from Anti-Infection Compound Library (MedChemExpress) and Prestwick Chemical Library were evaluated in the *ex vivo* splenic explant assay. Single-point screens carried out in two steps identified 43 hits, of which 12 had already been tested *in vivo*. DR curves identified 16 hits. Once the selectivity requirements were reached, the compounds addressed for further *in vivo* tests were selected according to the available pharmacokinetics data and the administration route (prioritizing drugs with high oral bioavailability) and discarding drugs with exclusive use in veterinary medicine. _____ 123

Figure 2. Results of the screening of 1769 compounds from Anti-Infection Compound Library (MedChemExpress) and Prestwick Chemical Library in the *L. infantum ex vivo* model. (a) Correlation plot between two independent replicates performed for the *L. infantum ex vivo* model assay at 10 μ M single-point compound concentration. Each dot represents a compound. In green are represented the compounds displaying at least 70% inhibition and in red the inactive compounds. (b) *L. infantum ex vivo* assay quality controls. Z' values obtained in *L. infantum ex vivo* assays for both chemical libraries. On the left panel the Z' values for Prestwick Chemical Library and on the right panel from Anti-Infection Compound Library (MedChemExpress). _____ 124

Figure 3. Chemical structures and dose-response curves in uninfected (black) and infected (red) ex vivo splenic explant cultures of the four hits tested in chronic VL model. _____ 128

Figure 4. Treatment of chronic *L. donovani* infection with 50 mg/kg bw/day and at 50 mg/kg bw/bid NFT for 10 consecutive days by oral gavage in Balb/c mice. (a) Schematic representation of the experimental design. Animals were i.p. infected with 10^9 *L. donovani* metacyclic promastigotes and after 8 wpi were orally treated with NFT 50 mg/kg bw/day and NFT 50 mg/kg bw/bid for 10 consecutive days (blue). Mice were imaged before starting the treatment (image 1) and 72 h after the end of the treatment (image 2). At the last time point animals were sacrificed and the parasite burden of the liver, spleen, bone marrow and thymus were determined by qPCR. (b) Representative ventral images of Balb/c mice after treatment with Miltefosine at 40 mg/kg bw/day for 5 consecutive days (M40) as positive control, NFT 50 mg/kg bw/day or NFT 50 mg/kg bw/bid for 10 consecutive days at two-time points. Mice were imaged before starting the treatment (image 1) and 72 h after the end of the treatment (image 2). (Unt) represents the animals treated only with the drug vehicle (0.75% of carboxymethyl cellulose). (c) Quantification of whole ventral bioluminescence, expressed as total flux (photons/s), from the experiment. Each point represents means \pm SD of n individuals. A group of noninfected mice was imaged for quantification of luminescence background (grey dashed line). Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). (d) Ex vivo images of mice organs after treatment with M40 for 5 consecutive days, NFT 50 mg/kg bw/day or NFT 50 mg/kg bw/bid for 10 consecutive days. Untreated mice (Unt), Lung (Lu), Liver (Li), Spleen (S), Heart (H), Kidney (K), Thymus (T) and Intestine (I). (e) Parasite burdens estimated by qPCR in untreated (Unt) and in treated with M40 for 5 consecutive days, NFT 50 mg/kg bw/day or NFT 50 mg/kg bw/bid for 10 consecutive days on liver, spleen, bone marrow and thymus. Each point represents means \pm SD of n animals. Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). _____ 132

Figure 5. Treatment of *L. major* infection with NFT 40 mg/kg bw/day for 5 consecutive days by intralesional injection in Balb/c mice. (a) Schematic representation of the experimental design. Animals were infected in the right hind footpad with 1×10^6 purified metacyclic promastigotes and after 5 wpi were intralesional treated with NFT 40 mg/kg bw/day for 5 consecutive days (blue). At the last time point animals were sacrificed and the parasite burden of the footpad and lymph node were determined by limit dilution assay (LDA). (b) Parasite burdens estimated by LDA in untreated (Unt), and in treated with Glucantime at 28 mg/kg bw/day and NFT 40 mg/kg bw/day for 5 consecutive days on footpad and lymph node. Each point represents means \pm SD of n animals. Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). _____ 132

Figure S1. Dose-response curves in uninfected (black) and infected (red) ex vivo splenic explant cultures of the 12 hits selected after the dose-response screen and not evaluated in the mouse model of VL. _____ 149

Figure S2. Treatment of chronic *L. donovani* infection with SAL 5 mg/kg bw/day, PXT 22.5 mg/kg bw/day and DXT 6 mg/kg bw/day by intraperitoneal injection in Balb/c mice. (a) Schematic representation of the experimental design. Animals were i.p. infected with 10^9 *L. donovani* metacyclic promastigotes and after 8 wpi were intraperitoneally treated with SAL 5 mg/kg bw/day, PXT 22.5 mg/kg bw/day and DXT 6 mg/kg bw/day for 10 consecutive days (blue). Mice were then imaged before starting the treatment (image 1) and 72 h after the end of the treatment (image 2). (b) Representative ventral images of Balb/c mice after treatment with miltefosine 40 mg/kg bw/day for 5 consecutive days (M40) as positive control, SAL 5 mg/kg bw/day, PXT 22.5 mg/kg bw/day and DXT 6 mg/kg bw/day for 10 consecutive days and at two-time points. Mice were imaged before starting the treatment (image 1) and 72 h after the end of the treatment (image 2). (Unt) represents the animals treated only with the drug vehicle. (c) Quantification of whole ventral bioluminescence, expressed as total flux (photons/s), from the experiment. Each point represents means \pm SD of n individuals. A group of noninfected mice was imaged for quantification of luminescence background (grey dashed line). Statistical significance calculated by one-way ANOVA: (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). _____ 150

Figure S3. Dose-response curves of NFT in promastigotes of three different strains: *L. infantum* (Red), *L. donovani* (Green) and *L. major* (Blue). _____ 151

Artículo 3: Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to *Leishmania infantum*-infected macrophages

Figure 1. Schematic representation of the PG–PEG–Mann(n) products. _____ 163

Figure 2. Cellular uptake of mannosylated PG–PEG nanocarrier. (A) PG–PEG–Mann(n)–FITC with n equal to 0, 5, 10 and 20 mannoses were incubated with RAW 264.7 macrophages for 24 h. Macrophages were harvested, and the unbound polymers were removed by acidic treatment. FITC fluorescence intensity was acquired on logarithmic scale and represented versus scatter side. Gate FITC-positive population was established as 2% in untreated cells. Uptake is expressed as %. Values are means \pm SD; (B) Flow cytometry histogram for uptake studies in RAW 264.7 macrophages. X-axis represents fluorescence inside the cells. Control untreated cells (gray), PG–PEG–Mann0–FITC (cyan blue), PG–PEG–Mann5–FITC (red), PG–PEG–Mann10–FITC (dark blue), PG–PEG–Mann20–FITC (green). Black asterisks indicate P values for t-Student's test (B) Comparisons between untreated and PG–PEG–Mann0–FITC (***) and this later and nanoparticles with 5, 10 and 20 mannose moieties. _____ 170

Figure 3. Dextran competition for CD206 receptor decreases the mannose decorated PG–PEG–Mann5–FITC nanoparticle uptake in murine macrophages RAW 264.7 and human THP-differentiated macrophages. (A) RAW 264.7 macrophages and (C) human THP-differentiated macrophages were preincubated for 30 min with or without 5 mg/mL of dextran before the addition of mannosylated nanocarriers. After 24 h incubation at 37 °C with nanoparticle, uptake was quantified

by flow cytometry. Uptake is expressed as%. Values are means \pm SD. Histograms show the Mean Fluorescent Intensity MFI that represents fluorescence inside the cells; (B) RAW 264.7 macrophages and (D) human THP-differentiated macrophages. Control untreated cells (gray), PG-PEG-Mann5-FITC without dextran (red), PG-PEG-Mann5-FITC with dextran (black). Black asterisks indicate P values for t-Student's test (A, C). Comparisons between PG-PEG-Mann5-FITC in dextran-free or dextran containing medium (** $p < 0.001$). _____ 172

Figure 4. Effects of different pharmacological inhibitors on the uptake of PG-PEG-Mann5-FITC. RAW 264.7 macrophages were preincubated for different times with inhibitors, treated with PG-PEGMann5-FITC for 24 h and then fixed and analyzed by flow cytometry. Results are reported as the percentage of uptake relative to untreated cells exposed to NPs (set to 100%). As positive controls were used FluoSphere (1.0 μ m), Transferrin and cholera toxin subunit-B (gray boxes). Values are expressed as normalized percentage of positive cells \pm SD of three independent duplicate experiments. Black asterisks indicate p values for t-Student's test. Comparisons between cells treated with endocytic inhibitors and untreated cells (** $p < 0.001$). _____ 173

Figure 5. Mannosylated nanocarriers reach the acidic compartments of macrophages and colocalize with *L. infantum* parasites in phagolysosomes. (top) Confocal micrographs of uninfected RAW 264.7 macrophages treated for 24 h with PG-PEG-Mann5-FITC, stained with Hoechst 34580 and cresyl violet and visualized *in vivo*; (middle) confocal micrographs of *L. infantum*-infected RAW 264.7 macrophages treated as above; (bottom) confocal micrographs of *L. infantum*-infected THP-1-differentiated macrophages. White scale bars in the bright field microscopy pictures are 5 μ m and 1 mm in the inserts where compartments with a clear localization between nanoparticle (FITC) and *L. infantum* amastigotes (red) is shown. _____ 174

Figure 6. Quantification *iRFP-L. infantum* intracellular amastigotes (FL7) and PG-PEG-Mann5-FITC (FL3) colocalization. Bone marrow derived macrophages were infected with *iRFP-L. infantum* amastigotes. Then, uninfected and infected cultures were treated or non-treated with PG-PEGMann5-FITC nanoparticle. (top) Non infected bone marrow derived macrophages; (bottom) *iRFP-L. infantum*-infected bone marrow derived macrophages; (right) cultures untreated; (left) cultures treated with PG-PEGMann5-FITC for 24 h before cells analyzed by flow cytometry. _____ 177

Figure 7. Curve dose-response of free and conjugated drugs to PG-PEG-Mann5 nanoparticle against intracellular *iRFP-L. infantum*. *Ex vivo* splenic explants were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 96 h with different equivalent concentrations of free-AmB (green), AmB-bz (blue), PG-AmB-PEG-Mann5 (red) and PG-PEG-Mann5 (gray). _____ 179

Figure S1. 1 H-NMR spectrum of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside _____ 189

Figure S2. 1 H-NMR spectrum of 2-bromoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside. _____ 189

Figure S3. 1 H-NMR spectrum of 2-azidoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside.190

Figure S4. ¹H-NMR spectrum of 2-azidoethyl-α-D-mannopyranoside (Mannose-N3).	_____	190
Figure S5. Calibration curve of AmB-EMCH in methanol measured by UV/Vis at 405 nm.	_____	191
Figure S6. Quantification of mannose loading via Anthrone method.	_____	192
Figure S7. (A) Representative release profile of PG-AmB-PEG incubated at pH 4.0 and 7.4 at 37 °C over 25 h. The AmB release (%) was quantified by RP-HPLC. Mean \pm SEM were obtained from triplicates in three independent experiments. (B) Calibration curve for AmB in methanol measured by RP-HPLC at a retention time of 1.1 min with methanol-0.005M EDTA (90:10) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min ⁻¹ under isocratic regime. The injection volume was 25 μ L.	_____	192
Figure S8. Dynamic light scattering measurement showing the size distribution by volume of conjugate. (A) PG-PEG-FITC, (B) PG-PEG-Mann5-FITC, (C) PG-PEG-Mann10-FITC, (D) PG-PEG-Mann20-FITC and (E) PG-AmB-PEG-Mann5.	_____	195
Figure S9. Cellular uptake kinetic profile obtained by flow cytometry for PG-PEG-Mann5-FITC.	_____	196

Discusión general

Figura 1. La infección del timo por *L. donovani* no provoca una atrofia prematura. Número de timocitos en animales infectados y no infectados a diferentes tiempos post-infección. Cada barra representa la media \pm SD del número. _____ 203

Figura 2. La infección del timo por *L. donovani* no altera el proceso de diferenciación de los timocitos. (A) Esquema de los distintos marcadores de superficie expresados en las diferentes fases de la maduración de los timocitos. Imagen creada con BioRender.com. (B) Porcentaje de las principales poblaciones de timocitos (basados en la expresión de CD4, CD8, CD25 y CD44) en animales infectados y no infectados a diferentes tiempos post-infección. Cada barra representa la media \pm SD del número. (** P < 0.01; *** P < 0.001). Los timocitos se marcaron con anticuerpos específicos frente a CD45 (130-110-796), CD3(130-122-943), CD4(130-118-852), CD8(130-111-716), CD44(130-118-695) y CD25(130-120-766) de la compañía Miltenyi Biotec. La adquisición de células fue llevada a cabo en el citómetro de flujo Cytex® Aurora. Los datos se analizaron con el software SpectroFlo®. _____ 204

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMB	Amphotericin B
AQP1	Aquaporina 1
ATP	Adenosín trifosfato
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
BMDMs	Macrófagos derivados de médula ósea
BMM	Bone marrow-derived macrophages
CC₅₀	Cytotoxic concentration 50
CL	Cutaneous leishmaniasis
CPP	Cyclophosphamide
CR1	Complement receptor 1
CR3	Complement receptor 3
CTX-B	Cholera toxin subunit-b
d	días
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Dichloromethane
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
DOX	Doxorubicin
DR	Dose-response
DXT	Docetaxel
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMCH	6-Maleimidocaprohydrazide
ESI	Electrospray ionization
ESI-TOF	Electrospray Ionization Time-of-Flight
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Heat-inactivated fetal calf serum
FDA	Food and drug administration
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FnRs	Fibronectin receptors
GFP	Green fluorescent protein
HCM	High content microscopy
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HTS	High-throughput screening
IC₅₀	Inhibitory concentration 50

IFN-γ	Interferon-gamma
IFP 1.4	Infrared fluorescent protein 1.4
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico síntasa inducible
iRFP	Infrared fluorescent protein
kADN	kinetoplastid ADN
LC	Leishmaniasis cutánea
LDA	Limit dilution assay
LDPK	Leishmaniasis dérmica postkala-azar
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LMT	Leishmania Miltefosina Trasnporter
LPG	Lipophosphoglycan
LV	Leishmaniasis visceral
M10	Miltefosine 10 mg/kg/day
M40	Miltefosine 40 mg/kg/day
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCL	Mucocutaneous leishmaniasis
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MFI	Mean fluorescent intensity
MR	Mannose receptor
MRPA	Multidrug resistance associated protein A
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
NFT	Nifuratel
NIR	Near-infrared
NPs	Nanoparticles
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMDMs	Macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDI	Polydispersity Index
PEG	Polyethylene glycol/ poli(etilenglicol)
PEG400	Polyethylene glycol 400
PEMs	Macrófagos peritoneales
PG	Polyglycerol
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PK	Pharmacokinetics
Akt/ PKB	Protein kinase B
PKC	Proteína quinasa C

PLGA	Poli(láctico-co-glicólico)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate / Forbol 12- miristato 13-acetato
PS	Polystyrene
PXT	Paclitaxel
Qpcr	quantitative PCR
RFP	Red fluorescent protein
RNAs	Ribonucleic acids
RoI	Regions of interest
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rRNA	ribosomal RNA
SAL	Salinomycin
SbIII	Antimonial trivalente
SbV	Antimonial pentavalente
SC	Suero de caballo
SD	Desviación estándar
SEC	Size exclusion chromatography
SI	Selective Index
SIGNR3	Specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin homolog-related 3
TfR	Transferrin
TPP	Target Product Profile
ABC	ATP-binding cassette
Try	Tripanotión
TryP	Triparredoxina peroxidasa
UV-vis	Ultravioleta-visible
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VL	Visceral leishmaniasis
wpi	weeks post-infection

Resumen

La leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por al menos 20 especies del género *Leishmania*. Esta enfermedad es esencialmente una enfermedad zoonótica, transmitida por flebótomos del género *Lutzomya* en América, y del género *Phlebotomus* en África, Asia y Europa. La leishmaniasis cutánea, causada por *L. major* y *L. braziliensis*, se caracteriza por la aparición de una o varias úlceras en el sitio de la picadura. Aunque estas lesiones habitualmente curan espontáneamente causan cicatrices y desfiguraciones que provocan una estigmatización social y problemas psicológicos. Sin embargo, la leishmaniasis visceral, causada por *L. donovani* y *L. infantum*, se caracteriza por hepatoesplenomegalia, fiebre, pérdida de peso y pancitopenia. La LV en ausencia de tratamiento resulta fatal, se estima que causa la muerte de entre 20.000 y 40.000 personas al año.

Los fármacos en los que se basa el tratamiento de la leishmaniasis poseen graves limitaciones; son inseguros, ineficaces en determinadas zonas geográficas por la aparición de resistencias y dependen mayoritariamente de la administración parenteral; lo que dificulta la adherencia al tratamiento y obliga a la hospitalización del paciente. Aunque el desarrollo de nuevos fármacos activos frente a *Leishmania* spp. ha tenido un importante impulso en los últimos años, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de bioimagen y a la incorporación de parásitos transgénicos, la baja predictibilidad de los métodos empleados en los cribados *in vitro* ha provocado que el porcentaje de compuestos descubiertos sea inferior al esperado.

El reposicionamiento de fármacos es una estrategia bien establecida en el descubrimiento y desarrollo de medicamentos, cuyo objetivo es encontrar un nuevo uso a un fármaco ya aprobado por las agencias reguladoras y reducir así el tiempo y el coste necesarios para su comercialización. En una enfermedad desatendida como la leishmaniasis, en la que no solo se necesitan urgentemente nuevos tratamientos, sino que estos deben ser asequibles, el reposicionamiento de fármacos es una aproximación muy apropiada de hecho, el 62,5% de los fármacos actuales, como por ejemplo la anfotericina B, la miltefosina y la pentamidina fueron inicialmente utilizados como agentes antifúngicos, anticancerígenos y antimicrobianos, respectivamente.

Con el objetivo de acelerar el descubrimiento de nuevos fármacos frente a este parásito hemos desarrollado una estrategia alternativa basada en: 1) el cribado

fenotípico de compuestos en un sistema que utiliza explantes esplénicos de ratones infectados y II) la evaluación de la eficacia *in vivo* de los compuestos seleccionados en un modelo murino de leishmaniasis cutánea y mediante imagen en tiempo real en un modelo murino de leishmaniasis visceral.

Llevamos a cabo el cribado *ex vivo* de 1769 compuestos, procedentes de dos librerías de compuestos aprobados mayoritariamente por la EMA y la FDA (Anti-Infection Compound Library (MedChemExpress) y Prestwick Chemical Library), en explantes esplénicos de ratones Balb/c infectados con *L. infantum*. Tras dos rondas selectivas a 10 y 1 μM , se identificaron compuestos que habían pasado desapercibidos para otros autores que llevaron a cabo el cribado en macrófagos infectados *in vitro*. El explante, a diferencia de estas infecciones *in vitro*, es un modelo más próximo a la infección natural y permite identificar los compuestos con actividad frente a *Leishmania* spp. dentro del ambiente inmunopatológico de un hospedador infectado durante semanas por el parásito.

Una de las ventajas de seguir la estrategia del reposicionamiento de fármacos es que disponemos de los perfiles farmacocinéticos de la mayoría de los compuestos testados por lo que fácil y rápidamente pudimos salvar la brecha entre los ensayos *in vitro* y los ensayos *in vivo* y evaluar aquellos compuestos con un buen índice selectivo y propiedades farmacocinéticas adecuadas en modelo de leishmaniasis visceral crónica desarrollado previamente: salinomycin, docetaxel, paclitaxel y nifuratel.

Nuestro modelo de leishmaniasis visceral crónica se basa en la infección de ratones Balb/c con altas dosis de promastigotes estacionarios de la cepa *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3), modificada genéticamente para que exprese la luciferasa PpyRE9h y que tras la administración del sustrato (D-luciferina) emitan luz. El sistema de imagen *in vivo* que hemos desarrollado nos ha permitido evaluar longitudinalmente, en tiempo real y sin necesidad de sacrificar a los animales, la fase aguda y crónica de la leishmaniasis visceral e identificar el timo como un órgano diana de las infecciones por *L. donovani*. La infección del timo por *L. donovani* se observó desde el inicio y permaneció estable a los tiempos estudiados. Los amastigotes de *L. donovani* fueron localizados en la médula del timo, como cabría esperar ya que la corteza del timo está aislada de la circulación sanguínea por la barrera hematotímica.

Además, dado que la bioluminiscencia *in vivo* detectada en las regiones de interés se correlacionó con la carga parasitaria cuantificada por qPCR, nos

permitió evaluar la actividad leishmanicida *in vivo* de los cuatro compuestos seleccionados. El tratamiento con salinomicina, docetaxel y paclitaxel no redujo significativamente la señal bioluminiscente. Sin embargo, la administración por vía oral de 50 mg/kg de nifuratel dos veces al día durante 10 días consiguió eliminar casi el 90% de la carga parasitaria en el bazo, el 97% en timo y casi un 70% en hígado. En cuanto al tratamiento con nifuratel de la leishmaniasis cutánea, su administración intralesional produjo la cura parasitológica, tanto en el sitio de la lesión como en el ganglio que la drena, apuntando a la baja biodisponibilidad del nifuratel en el hígado y en el bazo como la causa de la no erradicación del parásito en estos órganos.

Ante los múltiples fracasos en el desarrollo de fármacos frente a esta enfermedad, otra aproximación que se ha planteado es encapsular aquellos fármacos con baja biodisponibilidad o efectos secundarios en nanopartículas, con el fin de solventar sus limitaciones e incrementar su eficacia y seguridad *in vivo*.

Aunque existen muchos tipos de nanopartículas, nosotros proponemos aprovecharnos del hecho de que la infección por *Leishmania* spp. promueve la polarización de los macrófagos al fenotipo M2, caracterizado por la sobreexpresión del receptor de manosa (CD206) y dirigir la nanopartícula específicamente a los macrófagos infectados decorando su superficie con moléculas de manosa. Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que efectivamente, esta nanopartícula es endocitada preferentemente por los macrófagos infectados y que es capaz de llegar hasta el amastigote, liberar el fármaco y eliminar al parásito.

INTRODUCCIÓN

Género *Leishmania*

El género *Leishmania* pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, clase *Kinetoplastea*. Los kinetoplástidos, a diferencia del resto de organismos, albergan su ADN mitocondrial en una región especializada de este orgánulo, denominada kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto (kADN) se dispone en una única cadena, compuesta por moléculas circulares de ADN entrelazadas. Estos anillos de ADN se dividen atendiendo a su tamaño en maxicírculos (20-40 Kilobases) y minicírculos (0,5-10 Kilobases) (Figura 1). Los maxicírculos, presentes en pocas copias, codifican rRNAs y proteínas de la cadena respiratoria. Mientras que, los minicírculos están presentes en numerosas copias y codifican RNAs guía, que participan en el proceso de edición del ADN ¹⁻³.

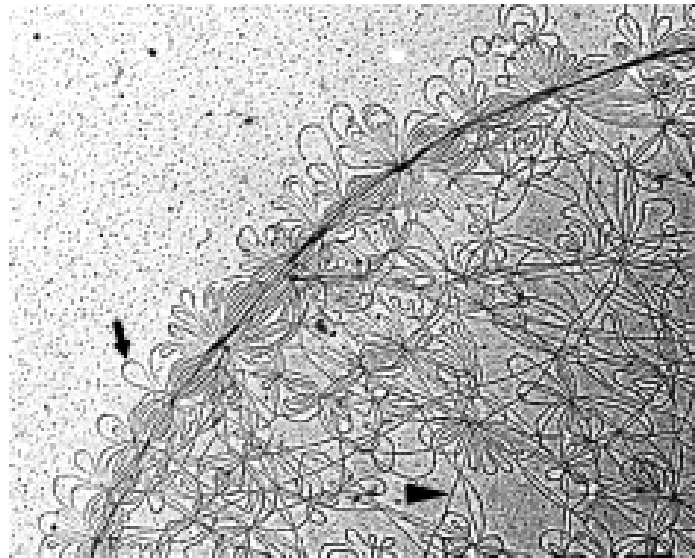


Figura 1. Micrografía electrónica del kADN de un miembro de la clase *Kinetoplastea*. Flecha (→) indica un minicírculo; punta de flecha (▶) señala parte de un maxicírculo. Imagen tomada de la referencia 3.

En el ciclo de vida de *Leishmania* spp. participan como hospedador definitivo un mamífero y como vector de transmisión una hembra de flebótomo del género *Lutzomya* en América, y del género *Phlebotomus* en África, Asia y Europa ^{4,5}. La hembra de flebótomo necesita ingerir sangre para completar correctamente la formación de sus huevos ^{6,7}. Al alimentarse de un mamífero infectado succiona, junto con ella, la forma intracelular del parásito o amastigote (Figura 2(8)). Los amastigotes se localizan en el interior de las células fagocíticas, mayoritariamente macrófagos, y son liberados por el flebótomo al dañar la piel del hospedador durante la toma de sangre ⁸.

Una vez en el intestino medio de la mosca, los amastigotes se diferencian en la forma extracelular del parásito o promastigote. Inicialmente, se transforman en promastigotes procíclicos de forma ovalada y flagelo corto (Figura 2(9)). En el subgénero *Leishmania*, los promastigotes procíclicos se encuentran en el intestino medio, en cambio en el subgénero *Viannia* se localizan mayoritariamente en el intestino posterior. Tras replicarse, los promastigotes procíclicos se diferencian en nectomonas, de forma esbelta y flagelo largo (Figura 2(10)). Los nectomonas migran desde el intestino medio hasta la válvula estomoidal. Algunos de ellos, se adhieren a las microvellosidades del intestino para evitar su expulsión durante la defecación, y favorecer así el establecimiento de la infección. En la válvula estomoidal, los promastigotes nectomonas se transforman en leptomonas (Figura 2(11)), de cuerpo ancho y flagelo corto, que finalmente se replican y diferencian en promastigotes metacíclicos (Figura 2 (12))^{5, 8-10}.

Los promastigotes metacíclicos son la forma infectiva del parásito y se caracterizan por ser de pequeño tamaño y poseer un flagelo muy largo^{11,12}. Si la mosca ingiere sangre por segunda vez, los promastigotes metacíclicos se desdiferencian en una forma semejante a los leptomonas denominada retroleptomonas. Durante esta desdiferenciación el flagelo del promastigote se acorta significativamente y el tamaño de su cuerpo se duplica (Figura 2(13)). A diferencia de los promastigotes metacíclicos, los retroleptomonas son poco móviles y se dividen rápidamente antes de rediferenciarse a la forma infectiva. Provocando así un incremento en el número de promastigotes transmitidos, lo cual aumenta el número de casos, pero no necesariamente su severidad^{5,13}.

Por último, se han descubierto otras dos formas de promastigotes: los haptomonas y los paramastigotes. Los haptomonas, con forma de hoja y flagelo corto, se adhieren al revestimiento cuticular de la válvula estomodeal. Se han descrito como una forma altruista que favorece la transmisión del parásito, al alterar la alimentación de la mosca obstruyendo su esófago. Sin embargo, los paramastigotes, son redondeados y se adhieren al revestimiento cuticular del intestino anterior. Su papel en el ciclo del protozoo se desconoce^{9, 14}.

Durante la ingesta de sangre, la hembra del flebótomo infectada inculca los promastigotes metacíclicos al mamífero, junto con su saliva (Figura 2(1)). La saliva favorece la supervivencia de los pocos parásitos inoculados (entre 10 y 100 por picadura). Posiblemente, la saliva inhibe la activación de macrófagos mediada por IFN- γ y su consiguiente producción de óxido nítrico, principal mecanismo de

eliminación del parásito. Además, contiene compuestos anticoagulantes y vasodilatadores que aumentan el tamaño de la lesión ^{10, 15}.

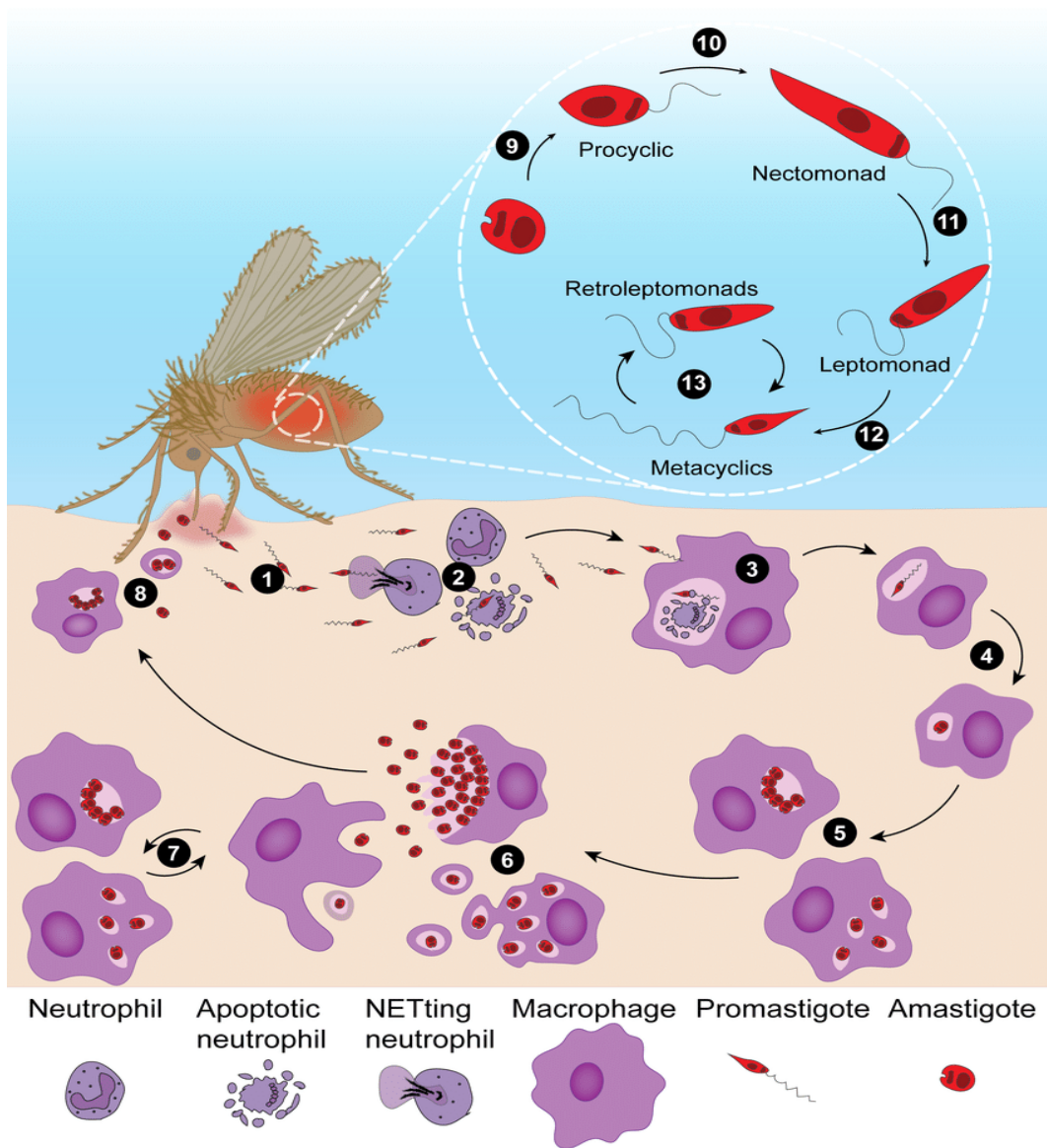


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1. Infección del huésped por la inoculación de promastigotes metacíclicos durante la ingesta de sangre del flebótomo. 2. Reclutamiento de neutrófilos. 3. Infección de macrófagos. 4. Diferenciación a la forma amastigote. 5. Replicación del amastigote por fisión binaria. 6. Los amastigotes abandonan la célula hospedadora. 7. Infección de nuevas células. 8. Ingestión de parásitos y células infectadas por los flebótomos. 9. Diferenciación de los amastigotes en promastigotes procíclicos dentro del tracto digestivo del flebótomo. 10. Diferenciación en nectomonas. 11. Diferenciación en leptomonas. 12. Diferenciación a promastigotes metacíclicos. 13. Diferenciación cíclica entre metacíclicos y retroleptomonas. Imagen tomada de la referencia 16.

Los promastigotes metacíclicos infectan a las células fagocíticas, esencialmente macrófagos (infección directa) y neutrófilos (Figura 2(2)). Los macrófagos

posteriormente fagocitan tanto a los neutrófilos infectados (modelo del caballo de troya) cómo a los parásitos liberados por los neutrófilos apoptóticos (infección silenciosa) (Figura 2(3)). En el macrófago, el parásito reside en fagosomas que tras fusionarse con lisosomas secundarios dan lugar al fagolisosoma o vacuola parasitófora. La vacuola parasitófora es un compartimento ácido (pH=5) rico en péptidos microbicidas y enzimas hidrolíticas. Estas condiciones adversas desencadenan la transformación del promastigote a amastigote, el cual sí es capaz de sobrevivir en este ambiente hostil (Figura 2(4)). El amastigote es pequeño, ovalado e inmóvil y tras replicarse por fisión binaria (Figura 2(5)), abandona la célula (Figura 2(6)). para reinfestar a nuevos macrófagos y células dendríticas (Figura 2(7))^{7,15,17}.

El mecanismo por el que los amastigotes abandonan el macrófago no está claro. La opinión más aceptada es que el macrófago infectado estalla liberando los amastigotes. Sin embargo, datos obtenidos por microscopía sugieren que las vacuolas, que contienen al parásito, son acumuladas en la periferia de las células y liberadas mediante un proceso semejante al de exocitosis¹⁷.

Dependiendo de la especie, las células dendríticas y los macrófagos infectados migran desde el sitio de infección, a los ganglios linfáticos de la piel o al hígado, bazo y médula ósea, causando las distintas enfermedades agrupadas bajo el término leishmaniasis^{4,16,18,19}.

Leishmaniasis

La leishmaniasis o leishmaniosis son un grupo de enfermedades causadas por al menos 20 especies del género *Leishmania*. Excepto en el caso de *Leishmania donovani* y *Leishmania tropica* cuyo reservorio principal es el ser humano, la leishmaniasis es esencialmente una enfermedad zoonótica en la que los perros y los roedores actúan como reservorios principales²⁰⁻²².

Actualmente, esta enfermedad continua su expansión y es endémica en 97 países, de acuerdo con el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS)²⁰. En los últimos años, la urbanización y la deforestación han creado un ambiente óptimo para la supervivencia del vector. Favoreciendo el establecimiento de ciclos de transmisión urbanos y domésticos que, junto con la existencia de conflictos armados, la migración y otros factores sociales (escasos ingresos y bajo nivel educativo), son factores de riesgo^{4,20,23}.

La leishmaniasis ocupa el segundo lugar en mortalidad y el séptimo en pérdida de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) entre las enfermedades tropicales olvidadas. Sin embargo, es ignorada incluso dentro de su área. Esta relegación se debe fundamentalmente a su compleja epidemiología y ecología, junto a la escasez y subestimación de los datos de incidencia actual, dada su localización en zonas geográficas con sistemas sanitarios débiles ²⁴⁻²⁶.

Las cuatro principales manifestaciones clínicas son leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis visceral y leishmaniasis dérmica postkala-azar ²⁰.

Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea (LC) es causada por aquellas especies de *Leishmania* que infectan a macrófagos localizados en la piel y en los ganglios linfáticos adyacentes. En América estas especies son *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. guayanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* mientras que en Europa Asia y África esta enfermedad es causada por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* ^{27,28}.

Aunque la LC es endémica en 88 países, las regiones del Mediterráneo Oriental (74%) y de América (18%) declaran más del 90% de los nuevos casos (Figura 3). En 2018, se informaron oficialmente más de 250.000 nuevos casos de LC, siguiendo la tendencia ascendente de los últimos años ²⁰. Sin embargo, basándose en estudios que han calculado la diferencia entre los casos detectados y los declarados en Argentina, y en Guatemala y Jordania, se estimó que al año se producen entre 0,7 y 1,2 millones de nuevos casos ²⁶.

La leishmaniasis cutánea generalmente cura de forma espontánea, pero causa cicatrices y desfiguraciones que provocan una estigmatización social y problemas psicológicos ^{27,28}.

La LC se presenta como una o varias lesiones en el sitio de la picadura, localizado normalmente en zonas no cubiertas del cuerpo como la cara, los antebrazos y la parte baja de las piernas. Las lesiones múltiples suelen corresponderse con diferentes picaduras, aunque en ocasiones pueden deberse a la propagación linfática del parásito. Inicialmente las lesiones son pápulas que aumentan de tamaño durante semanas o meses hasta convertirse en nódulos. Meses después, estos nódulos se transforman en úlceras o incluso en placas hiperqueratósicas en el caso de las especies presentes en África, Asia y Europa (Figura 4).

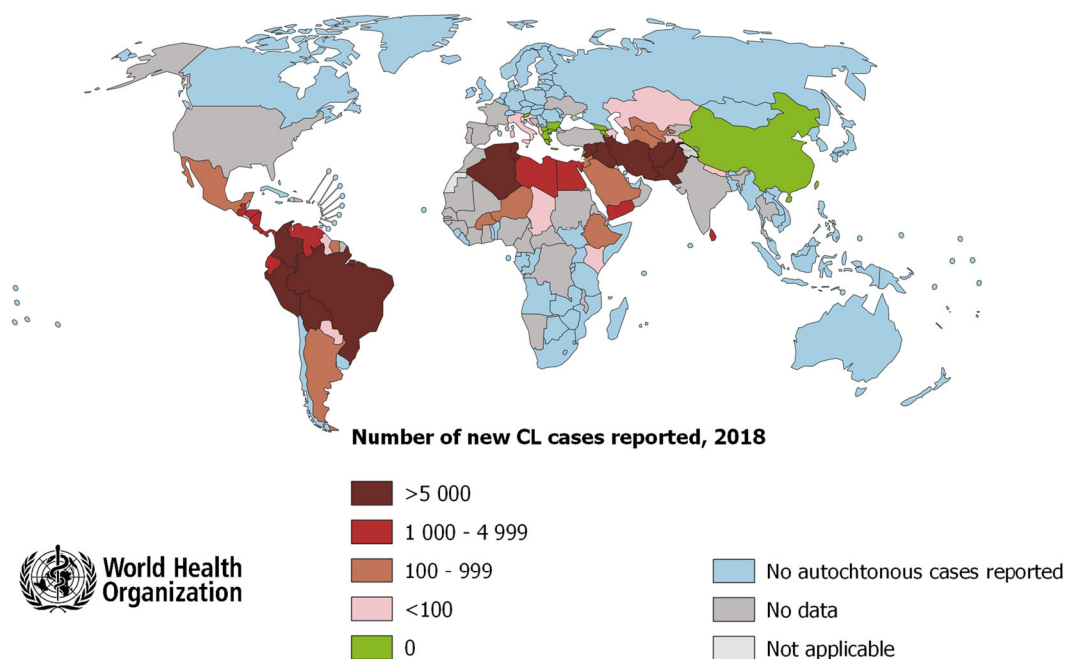


Figura 3. Situación de endemicidad de la leishmaniasis cutánea (LC) en el 2018 en el mundo. Imagen modificada de la referencia 20.

Las lesiones causadas por *L. major*, *L. tropica* y *L. mexicana* curan espontáneamente en el plazo de un año, dejando cicatrices permanentes. Sin embargo, las lesiones debidas a la infección por *L. braziliensis*, *L. guayanensis* y *L. panamensis* (todas ellas del subgénero *Viannia*) son más graves y requieren de varios años para cicatrizar pudiendo originar una leishmaniasis mucocutánea ^{27,28}.

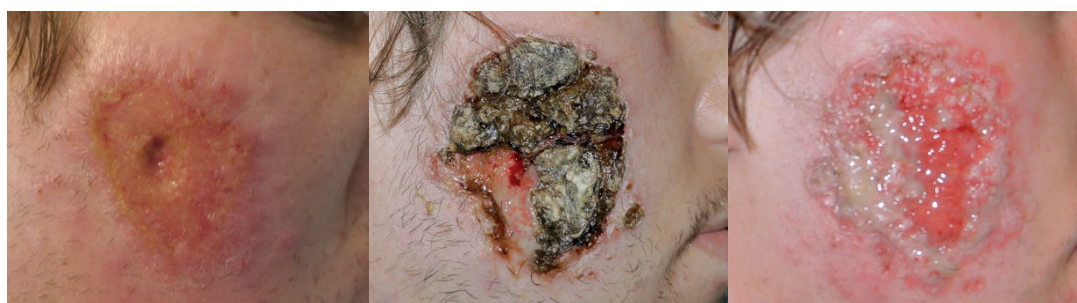


Figura 4. Evolución de la lesión en un paciente con leishmaniasis cutánea contraída en Bolivia. Imagen tomada de la referencia 27.

Existen tres variantes de la leishmaniasis cutánea relacionadas con la respuesta inmunitaria del hospedador: leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis cutánea diseminada y leishmaniasis recidivans ^{27,28}.

La leishmaniasis cutánea difusa cura de forma espontánea y es causada por *L. amazonensis*, *L. aethiopica* y *L. mexicana*. Se caracteriza por la aparición

generalizada de múltiples lesiones nodulares semejantes a las observadas en la lepra lepromatosa. Estos nódulos no son ulcerosos ni sensibles al tacto y a menudo aparecen alejados del lugar de la picadura ^{27,28}.

La leishmaniasis cutánea diseminada sucede en América del Sur y se define por la aparición de más de diez lesiones nodulares y ulcerosas localizadas en dos o más partes del cuerpo. Además, es frecuente la afectación de las mucosas. La inmunosupresión es un factor de riesgo tanto para leishmaniasis cutánea difusa como para la diseminada ²⁷.

Por último, la leishmaniasis recidivans sucede tras la cicatrización de las lesiones causadas por *L. tropica*, incluso décadas después de la infección inicial. Las nuevas lesiones rodean la antigua cicatriz y puede expandirse progresivamente ²⁸.

La LC puede tratarse de forma sistémica o local dependiendo de la característica de la lesión, la especie etiológica y el riesgo inminente de progresar a enfermedad mucocutánea. El tratamiento sistémico recomendado por la OMS es la administración de antimoniales pentavalentes (20 mg/Kg/día por vía intramuscular o intravenosa) durante 10-20 días, dependiendo de la especie. El tratamiento local recomendado es una pomada de 15% de paromomicina/12% de cloruro de metilbencetonio dos veces al día durante 20 días. En el caso de las especies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. infatum* también se recomienda el uso de antimoniales intralesionales (1-5 ml por sesión) cada 3-7 días (1-5 sesiones) ²⁹.

Además, existen terapias locales físicas, como la termoterapia y la crioterapia, que poseen altas tasas de éxito. Estas terapias pueden ser de gran utilidad para los pacientes a los que se les restringe los tratamientos anteriores, como por ejemplo en mujeres embarazadas, así como en infecciones resistentes a fármacos ^{21,30}. La termoterapia consiste en destruir directamente los parásitos al aplicar calor en los tejidos infectados con un láser de CO₂. Aunque, requiere la administración de anestesia local, la aplicación directa de calor favorece la cicatrización de las lesiones ^{29,30}. La crioterapia utiliza nitrógeno líquido (a-195°C) y causa la muerte del protozoo al provocar la formación de hielo en su interior. Sus principales efectos secundarios son edema y eritema en el sitio de aplicación, e hiper o hipopigmentación ^{29,30}.

Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) es causada por la expansión de determinadas especies de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. guayanensis* y *L. panamensis*) desde las capas superficiales de la piel al tejido mucocutáneo subyacente. El 10% de las personas infectadas por *L. braziliensis* desarrollan LMC, incluso años después de la resolución de la primera lesión. La mayoría de los casos se localizan en América del Sur, especialmente en Brasil y Perú. Se caracteriza por la destrucción de las mucosas y el cartílago oro-nasofaríngeo, provocando desfiguraciones graves (Figura 5). Además, esta destrucción del tejido mucocutáneo dificulta la función respiratoria y la nutrición de la persona, pudiendo provocar su muerte por malnutrición o por neumonía por aspiración. También las personas que padecen LMC a menudo fallecen por infecciones secundarias ^{27,28}.



Figura 5. Lesiones causadas por leishmaniasis mucocutánea grave. En la parte izquierda de la figura, lesión que afecta a la fosa nasal derecha, al labio superior y al surco nasal. En la parte derecha de la figura, lesión que afecta a la úvula y al paladar blando adyacente. Imagen tomada de la referencia 27.

Aunque, la LMC normalmente no responde al tratamiento, la OMS recomienda el uso de antimoniales pentavalentes (20 mg/Kg/día por vía intramuscular o intravenosa) durante 30 días ²⁹.

Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral (LV) es causada por *L. donovani*, en Asia y África, y por *L. infantum*, en la cuenca mediterránea y América. Estas dos especies de *Leishmania* infectan a las células dendríticas y a los macrófagos localizados en el sistema reticuloendotelial, principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea. Aunque tradicionalmente se ha clasificado a la especie *L. tropica* como agente

causante de LC, casos de LV debidos a cepas de *L. tropica* viscerotropicas han sido documentados ^{27,28}.

A pesar de que la LV es endémica en 78 países, la región del Este de África (45%), el subcontinente indio (28%) y Brasil (20%) reportan más del 90% de los nuevos casos (Figura 6). Desde el 2011 el número de casos reportados de LV ha disminuido paulatinamente. Esta disminución se debe al programa de eliminación instaurado por la OMS en el sudeste asiático, que ha promovido una reducción en el número de casos declarados por esta región ²⁰. Sin embargo, Alvar *et al.* estimaron que al año suceden entre 200.000 y 400.000 casos nuevos de LV. Apoyándose en dos estudios que concluyeron que el número real de casos frente al número reportado era entre 4,2 y 8,1 veces mayor en la India y aproximadamente 1,8 veces superior en Brasil ²⁶.

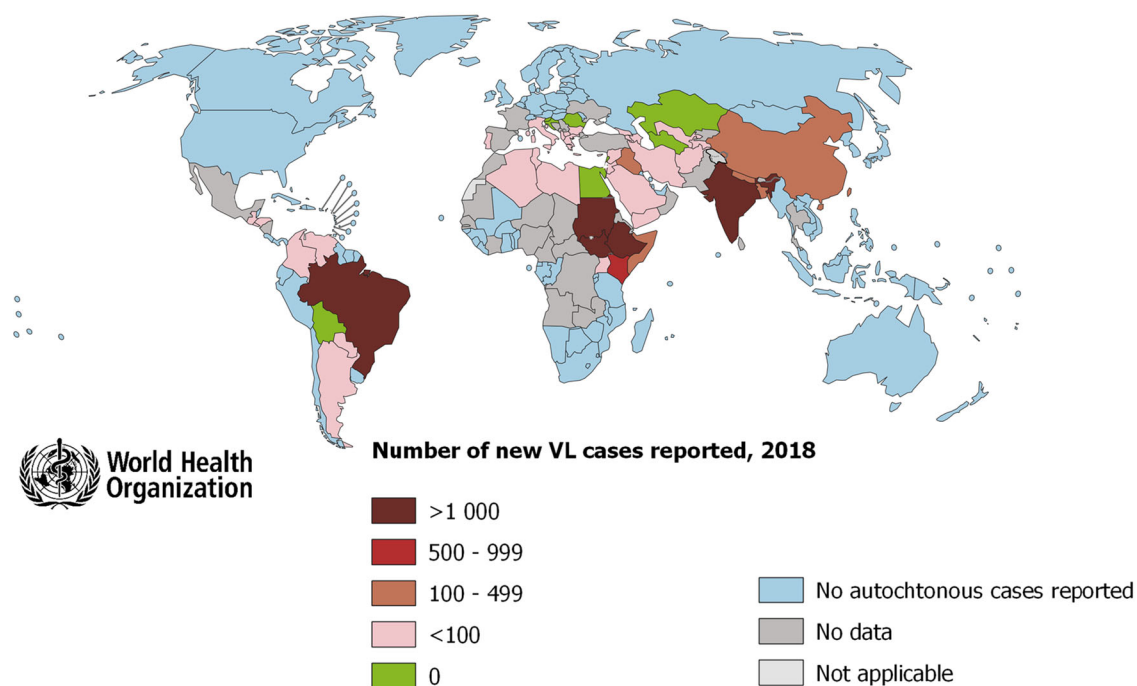


Figura 6. Situación de endemias de la leishmaniasis visceral (LV) en el 2018 en el mundo. Imagen modificada de la referencia 20.

La LV resulta fatal en más del 95% de los casos si no se trata. A diferencia del número de casos, la tasa de fatalidad de la LV se ha incrementado levemente en los últimos 4 años, desde el 2,1% al 3,3 % de media, alcanzando sus máximos en países como Brasil con un 10,6% y Paraguay con un 26,3% ²⁰. Sin embargo, la tasa de fatalidad real de la LV es mucho mayor, ya que una gran parte de las muertes ocurre fuera de los hospitales, y no son reconocidas. Empleando una tasa de

fatalidad global del 10% y asumiendo que prácticamente todas las muertes son por LV, Alvar *et al.* estimaron que al año fallecen entre 20.000 y 40.000 personas por leishmaniasis ²⁶.

La LV puede aparecer de forma aguda o años más tarde tras un episodio de inmunodepresión. Los síntomas característicos de la LV son hepatoesplenomegalia y fiebre persistente e irregular. Además, es común que los pacientes padezcan hipergammaglobulinemia, pérdida de peso y pancitopenia, especialmente en las fases avanzadas de la enfermedad. La pancitopenia e inmunosupresión, causadas por la proliferación del parásito en la médula ósea, aumentan el riesgo de sufrir infecciones secundarias que junto con la anemia pueden conducir a la muerte del paciente ^{27,28}.

Otro síntoma menos frecuente de la LV y que origina su nombre hindi: kala-azar (significa “fiebre negra”) es la hiperpigmentación de la piel. Esta hiperpigmentación de la piel se debe a un aumento de la producción de hormona adrenocorticotropa (ACTH), inducido por citoquinas ^{27, 28}.

La coinfección con el VIH es uno de los principales retos en el control de la LV porque no solo aumenta el riesgo de padecerla en varios cientos de veces, sino que las formas desarrolladas, por las personas coinfectadas, son más severas y difíciles de tratar ^{20,28}.

El tratamiento para LV recomendado por la OMS depende del agente causal y del área geográfica. La LV causada por *L. infantum* en la cuenca del Mediterráneo, oriente medio y Asia central debe tratarse con Ambisome® como fármaco de primera elección (3-5 mg/kg/día por vía intravenosa durante 3-6 días hasta un total de 18-21 mg/kg). Como segunda elección con antimoniales pentavalentes (20 mg/Kg/día por vía intramuscular o intravenosa) durante 28 días o como tercera elección con anfotericina B desoxicolato (0,75-1.0 mg/kg/día por vía intravenosa, diariamente o en días alternativos durante 20-30 dosis, con una dosis total de 2-3 g). El tratamiento de la LV causada por *L. donovani* en África consiste en antimoniales pentavalentes (20 mg/Kg/día por vía intramuscular o intravenosa) junto con paromomicina (15 mg/Kg/día por vía intramuscular), durante 17 días. Sin embargo, la aparición de resistencias en el subcontinente indio ha reemplazado los antimoniales como fármaco de primera elección por el uso de anfotericina B liposomal en dosis repetidas (3-5 mg/Kg/día por infusión administrada en un período de 3 a 5 días, con una dosis total de 15 mg /kg) o en dosis única (10 mg/kg

por infusión) ^{29,31-33}. Con el fin de evitar el desarrollo temprano de resistencias también se utilizan combinaciones de una única dosis de Ambisome® con miltefosina durante 8 días o con paromomicina durante 11 días ³⁴.

Leishmaniasis dérmica postkala-azar

La leishmaniasis dérmica postkala-azar (LDPK) sucede tras el tratamiento de la LV causada por *L. donovani*. Actualmente no se comprende su patogenia por completo, pero está relacionada con una respuesta inmune exacerbada por parte del hospedador en contra de los parásitos residuales de la piel inducida por IFN- γ ^{27,28}.

En Asia, la LDPK ocurre en el 5-10% de los casos 2 o 3 años después de finalizar el tratamiento frente a la LV. Mientras que en África sucede hasta en el 50% de los casos, pero dentro del primer año tras el tratamiento ²⁷.



Figura 7. Lesiones causadas por leishmaniasis dérmica postkala-azar (LDPK). En la parte izquierda de la figura, erupción maculopapular eritematosa en un niño. En la parte derecha de la figura, erupción macular hipopigmentada en un adulto. Imagen tomada de la referencia 27.

La LDPK se caracteriza por la aparición de erupciones alrededor de la boca y el tronco que pueden extenderse gradualmente. En África, predomina la erupción maculopapular eritematosa, que cura espontáneamente en el 85% de los casos durante los 12 primeros meses. Sin embargo, en Asia prevalece la erupción macular hipopigmentada, que no cura de forma natural (Figura 7). Generalmente estas lesiones son problemas estéticos, pero es importante tratarlas porque pueden actuar como reservorios durante décadas ^{20, 27,28}.

El tratamiento recomendado por la OMS para la LDPK es anfotericina B a una dosis de 1 mg/kg/ día entre 60-80 infusiones intravenosas durante 4 meses. En el subcontinente indio se recomienda una dosis más alta (50-100 mg) durante 3 meses ³¹.

Principales fármacos leishmanicidas en uso clínico

Antimoniales Pentavalentes

Los antimoniales pentavalentes han estado disponibles durante casi 70 décadas, y constituyen la primera línea de tratamiento frente a la leishmaniasis. Sus dos principales formulaciones son el antimoniato de meglumina (Glucantime ®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®) (Figura 8) ^{29, 35,36}.

A pesar de que el modo de acción de los antimoniales pentavalentes no ha sido establecido por completo, sus principales mecanismos de acción son: I) inhibir la glicolisis y la oxidación de los ácidos grasos, causando una disminución de ATP en el protozoo, II) inhibir a la Tripanotión reductasa, esencial en la defensa del parásito frente al estrés oxidativo y III) provocar la fragmentación del ADN del protozoo, induciendo así su muerte por un proceso semejante a la apoptosis ^{35,37-41}.

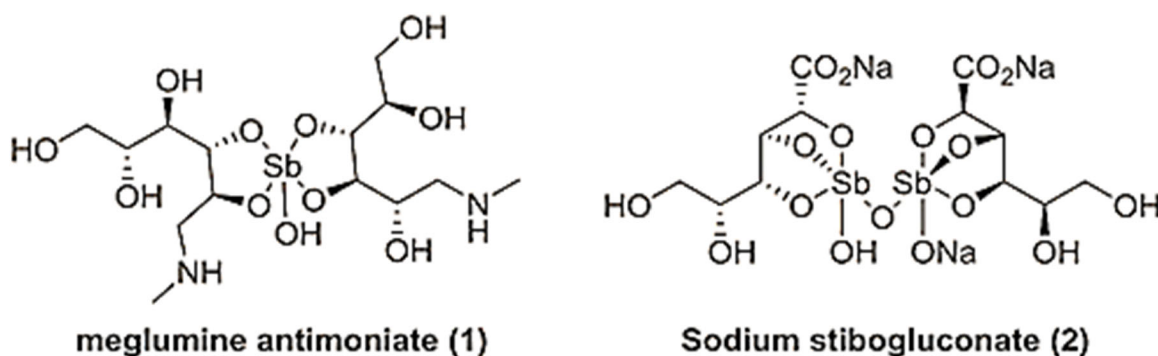


Figura 8. Estructura de los antimoniales pentavalentes en uso clínico. Imagen tomada de la referencia 22.

Por último, los antimoniales pentavalentes también poseen un efecto inmunomodulador sobre la célula del hospedador. En concreto, se ha descrito que activan rutas de señalización vía PI3K (fosfoinositol 3-quinasa), PKC (proteína quinasa C) y MAPKs (proteínas quinasa activadas por mitógenos), las cuales eliminan al parásito mediante la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico ^{38,42}.

Los antimoniales pentavalentes poseen un bajo coste y requieren de dosis bajas para ser eficaces. Sin embargo, el uso de estos compuestos está limitado por la necesidad de administraciones parenterales diarias, la aparición de resistencias y su gran toxicidad. Los efectos adversos incluyen irritación local, náuseas, vómitos, anorexia, artralgia, mialgia, alteraciones cardíacas y aumento de las enzimas hepáticas y pancreáticas ^{29,40,43}.

Los antimoniales pentavalentes (SbV) sólo son activos, tras ser reducidos a su forma trivalente (SbIII). Los SbV pueden ser reducidos por la célula hospedadora, y el SbIII formado es transportado al parásito por la Aquaporina 1 (AQP1), o pueden entrar directamente en el amastigote y ser convertidos a SbIII en su interior. Finalmente, el SbIII, tras ser conjugado con el tripanotión, es secuestrado en el interior de una vesícula intracelular por MRPA (Multidrug resistance associated protein A) o expulsado fuera del parásito ^{29,35,36,38,41,43}.

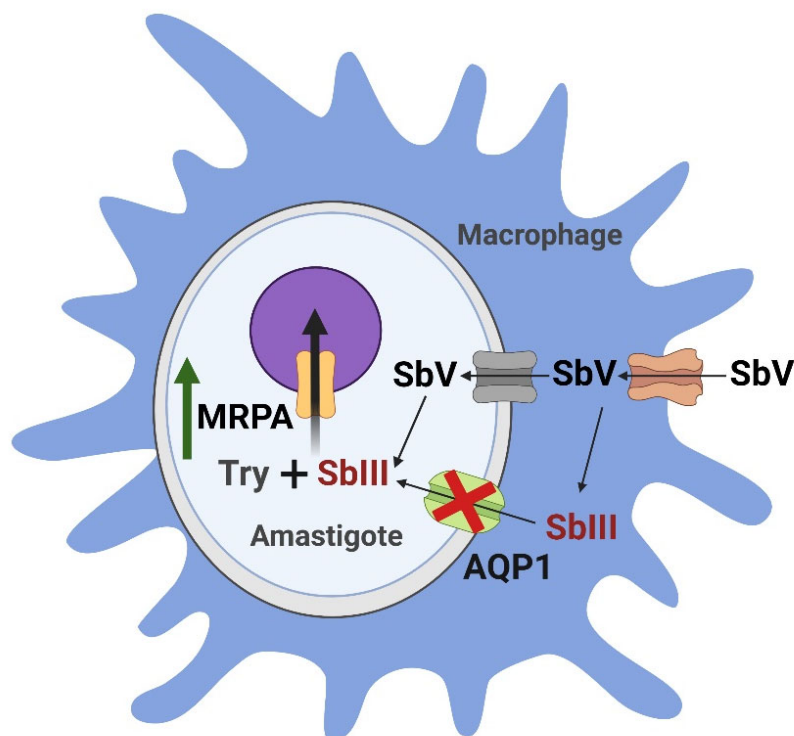


Figura 9. Mecanismos moleculares de la resistencia a antimoniales pentavalentes en cepas aisladas de *Leishmania* spp. La figura muestra un amastigote en el interior de un macrófago. Explica los métodos de entrada de los antimoniales y los mecanismos intracelulares empleados por el parásito para expresar el fenotipo resistente. AQP1 (aquaporina 1), MRPA (multidrug resistance associated protein A), SbV (antimonial pentavalente), SbIII (antimonial trivalente), Try (Tripanotión). Imagen creada con BioRender.com.

Después de la aparición de graves resistencias en Bihar y Nepal, los antimoniales pentavalentes dejaron de ser el fármaco de elección en la India. Las cepas de *L. donovani*, aisladas de pacientes en ambas áreas, poseen diferentes mecanismos de resistencia (Figura 9). El primer mecanismo de resistencia observado consiste en inactivar el gen de la AQP1, reduciendo así la entrada de fármaco activo (SbIII) en el parásito. El segundo mecanismo se basa en sobreexpresar la proteína MRPA, inactivando así la mayor parte del fármaco localizado en el parásito (Figura 9). Habitualmente, las cepas resistentes que sobreexpresan MRPA también sobreexpresan la enzima Triparredoxina peroxidasa (TryP). La TryP favorece la conjugación del SbIII, ya que aumenta los niveles de tripanotión reducido en el parásito ^{35,38,40,41,43}.

Finalmente, en cepas resistentes de laboratorio se han descrito otros mecanismos de resistencia como la sobreexpresión de los transportadores encargados de expulsar al SbIII fuera de la célula y la incapacidad de reducir el SbV a su forma activa ³⁹⁻⁴¹.

Anfotericina B

La anfotericina B se ha utilizado como antifúngico durante los últimos 70 años y como leishmanicida desde la década de los sesenta (Figura 10). Es el fármaco de elección en la India tras la pérdida de eficacia de los antimoniales pentavalentes ^{29,35,43}.

La anfotericina B provoca la muerte del parásito al unirse al ergosterol de su membrana y formar poros en ella (Figura 11) ^{29,35,44,45}. Dada su baja biodisponibilidad y su insolubilidad en agua, la anfotericina B se administra por vía intravenosa y unida a micelas de desoxicolato (Fungizone®).

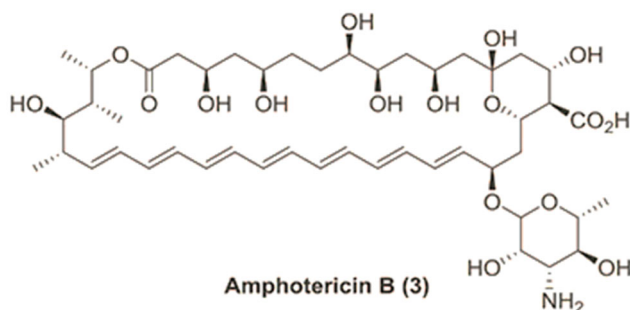


Figura 10. Estructura de la anfotericina B. Imagen tomada de la referencia 22.

Los pacientes tratados con anfotericina B deben ser hospitalizados por largos periodos de tiempo, ya que frecuentemente padecen efectos adversos graves como fiebre, hipocalcemia, miocarditis y nefrotoxicidad ^{29, 31,35,37}.

Con el objetivo de disminuir estos efectos secundarios, se desarrollaron varias formulaciones lipídicas de anfotericina B. Sin embargo, solo la forma liposomal AmBisome® está actualmente aprobada por la FDA. A pesar de que al encapsular la anfotericina B en un liposoma se redujo significativamente su toxicidad, el uso del Ambisome® está restringido a los países desarrollados debido a su elevado coste (25 veces superior al de la anfotericina B convencional) ^{29,31, 37,46,47}.

Actualmente, la OMS promueve el uso de una única dosis de Ambisome®. Este régimen posee claras ventajas desde el punto de vista de la salud pública, ya que no requiere la hospitalización del paciente ni varias administraciones. Sin embargo, la dosis administrada en esta única inyección no difiere mucho del mínimo necesario para tratar la enfermedad, existiendo así el riesgo de que esta monoterapia, al no ser siempre curativa, seleccione parásitos resistentes al fármaco ⁴³.

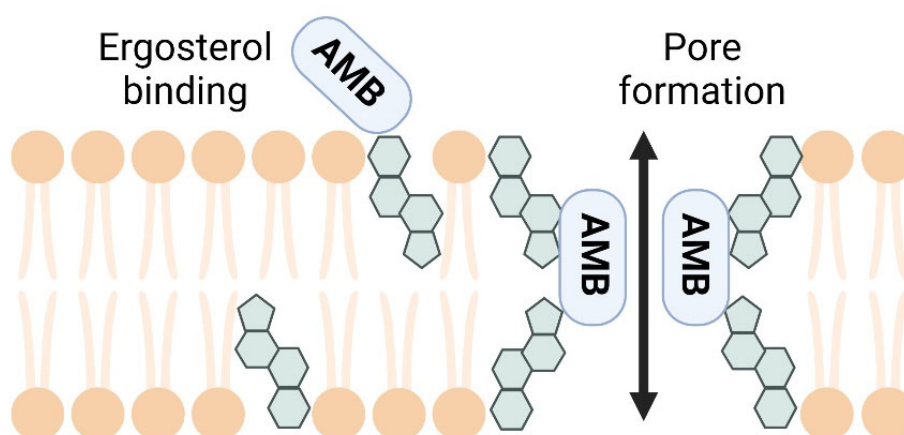


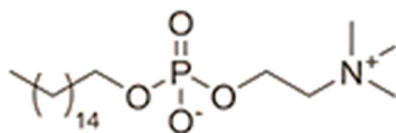
Figura 11. Representación esquemática del mecanismo de acción de la anfotericina B (AMB). Imagen creada con BioRender.com.

Aunque el fenómeno de resistencia ha sido considerado de bajo riesgo para la anfotericina B, ya se han notificado casos en la India. La cepa resistente de *L. donovani* aislada del paciente había reemplazado el ergosterol de su membrana por colesterol exógeno ^{37,43}.

Miltefosina

La miltefosina es un análogo de la fosfatidilcolina, empleado originariamente como antineoplásico (Figura 12). Actualmente, es el único fármaco de vía oral aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis ^{29,32,44}.

La miltefosina posee principalmente dos mecanismos de acción: I) inhibir la síntesis del ergosterol, componente esencial de la membrana del parásito e II) inhibir a la Citocromo C oxidasa, provocando así la despolarización de la membrana mitocondrial y la disminución de los niveles de ATP en el protozoo. Además, la miltefosina provoca la muerte de la célula hospedadora, al inhibir la vía de señalización Akt/PKB que promueve la supervivencia ^{35,43,37,48-50}.



Miltefosine (5)

Figura 12. Estructura de la miltefosina. Imagen tomada de la referencia 22.

Los efectos secundarios del tratamiento con miltefosina frecuentemente son alteraciones gastrointestinales, como vómitos, diarrea y dolor abdominal. Además, puede provocar hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogenicidad. Dada la larga vida media de la miltefosina aproximadamente una semana, y sus efectos teratogénicos, las mujeres en edad fértil deben tomar anticonceptivos desde el inicio del tratamiento hasta tres meses después de su finalización ^{29,31,37,38,48}.

Después de apenas una década de uso, la aparición de resistencias frente a la miltefosina conllevó una gran pérdida de efectividad en la India y en Nepal. Actualmente solo se recomienda su uso en combinación con otros fármacos en esta región ^{29,31,47,48}.

La miltefosina entra en el parásito por dos vías diferentes: es endocitada tras unirse a la cara externa de la membrana o bien mediante la traslocación del transportador de membrana LMT (*Leishmania* Miltefosina Transporter). Las resistencias observadas en aislados clínicos de *L. donovani* se deben a una reducción de la

entrada de miltefosina al parásito a causa de la inactivación o delección del gen del LMT ^{35,38,39,49}.

Por último, en cepas resistentes de laboratorio se ha descrito otro mecanismo de resistencia a miltefosina basado en la disminución de su concentración intracelular, mediante la sobreexpresión de los transportadores ABC encargados de expulsar al fármaco fuera del parásito ⁵⁰.

Desarrollo de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis

Actualmente, el tratamiento de la leishmaniasis se basa únicamente en la quimioterapia, ya que, pese a los numerosos intentos realizados ⁵⁰⁻⁶², no existe una vacuna eficaz ⁶³. Sin embargo, dada la pérdida de eficacia y la elevada toxicidad de estos tratamientos es necesario desarrollar nuevos fármacos ^{29,64-66}. En los últimos años, el desarrollo de fármacos leishmanicidas más seguros, asequibles y eficaces ha sufrido un gran impulso ya que, gracias a la colaboración de entidades supranacionales, como DNDi, centros de investigación públicos y privados e instituciones académicas se han iniciado los ensayos clínicos de un gran número de compuestos ⁶⁷⁻⁷².

Estrategias aplicadas en el desarrollo de nuevos tratamientos

En el desarrollo de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis, se han seguido principalmente cuatro estrategias: I) descubrimiento de fármacos *de novo*, II) reposicionamiento de fármacos, III) combinación de dos o más fármacos y IV) nanoencapsulación de fármacos.

Descubrimiento de fármacos *de novo*

El descubrimiento de fármacos *de novo* consiste en cribar nuevos compuestos de síntesis química y/o de origen natural e identificar aquellos con actividad antiparasitaria ⁷³.

Reposicionamiento de fármacos

El reposicionamiento de fármacos consiste en encontrarle un nuevo uso a un fármaco aprobado frente a otra enfermedad. Esta estrategia permite reducir el tiempo y el coste necesarios para la comercialización del fármaco, ya que el desarrollo preclínico y clínico puede basarse en los datos farmacocinéticos y de seguridad ya conocidos (Figura 13) ^{74,75}.

Dado el elevado coste (~ 800 millones de dólares) y tiempo (entre 10-17 años) necesarios para la comercialización de un nuevo fármaco junto con la baja probabilidad de éxito ($\leq 10\%$), la estrategia del reposicionamiento de fármacos es especialmente atractiva para enfermedades, como la leishmaniasis, en la que los ingresos salariales del paciente medio no supera los 2 dólares al día ⁷⁶ y el desarrollo urgente de un nuevo fármaco rentable, simplemente, no es una operación económicamente viable para las grandes compañías farmacéuticas. De hecho, dos de los principales tratamientos contra la leishmaniasis, la anfotericina B y la miltefosina, provienen del reposicionamiento de fármacos ^{29,65,73,77-79}.

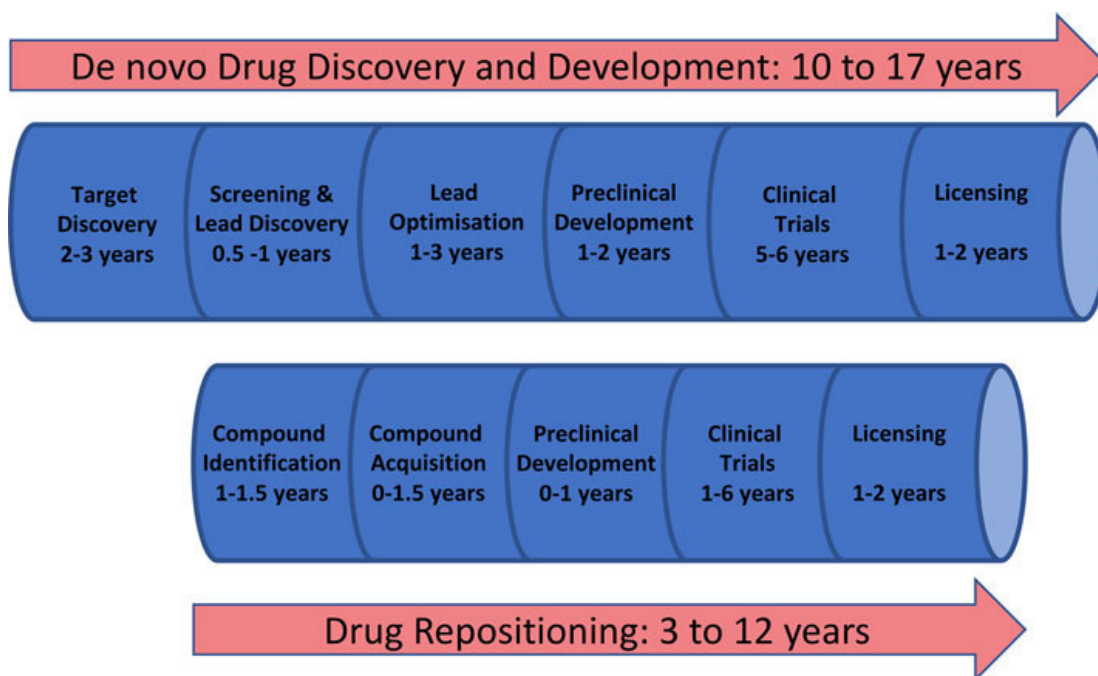


Figura 13. Comparación entre las rutas de descubrimiento de fármacos *de novo* y de reposicionamiento. Imagen tomada de la referencia 75.

Terapia combinada

La terapia combinada consiste en utilizar simultáneamente dos o más fármacos, con mecanismos de acción distintos, que posean efectos sinérgicos o aditivos. Al combinar ambos compuestos, administramos una dosis más baja de cada uno de ellos, reduciendo sus efectos secundarios y el riesgo de seleccionar parásitos resistentes ^{29,64,77,80}. Actualmente, se está aplicando en África como primera línea de tratamiento frente a la LV la combinación de antimoniales pentavalentes + paramomicina, sin embargo, la administración es muy dolorosa y requiere la

hospitalización del paciente. Por ello en los últimos años, se han testado combinaciones que eviten el uso de la paramomicina. A saber, una única dosis de Ambiosome® combinada con 10 días consecutivos de miltefosina o con 10 días consecutivos de estibogluconato de sodio. Sin embargo, en los ensayos clínicos en fase II, ninguna de estas combinaciones mejoró los resultados del tratamiento de elección ⁸¹.

Nanoencapsulación de fármacos

La nanoencapsulación se basa en usar una nanopartícula como vehículo para un fármaco. Aunque se han empleado varios tipos de nanopartículas en el tratamiento de la leishmaniasis (nanoemulsiones, nanopartículas metálicas, niosomas etc), las más utilizadas son los liposomas y las nanopartículas poliméricas ⁸²⁻⁹³.

Los liposomas son vesículas cuya membrana está formada por una bicapa de fosfolípidos. Mientras que los fármacos hidrofílicos son encapsulados en el núcleo, los fármacos hidrofóbicos se localizan entre las dos capas de su membrana (Figura 14). Finalmente, los liposomas liberan los compuestos al ser internalizados y degradados por la célula o tras la fusión de las membranas liposomal y celular ^{82,94-97}.

Las nanopartículas poliméricas son estructuras lineales o ramificadas compuestas generalmente por poli(etilenglicol) (PEG), poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polisacáridos (como el quitosano y el alginato) y polímeros proteicos (como la albúmina) (Figura 14). El fármaco puede estar conjugado covalentemente a la nanopartícula, formando un profármaco macromolecular, o encapsulado no covalentemente en su interior. La liberación del profármaco está desencadenada por la rotura del enlace que une el fármaco con la nanopartícula. Sin embargo, la liberación del fármaco encapsulado requiere un cambio en la estructura del polímero ^{82,94-97}.

La nanoencapsulación de un compuesto permite: I) reducir sus efectos secundarios, II) mejorar su biodisponibilidad, y III) facilitar nuevas vías de administración, como la vía oral, al aumentar la solubilidad en agua del compuesto y protegerlo de una rápida degradación ^{82,94-97}. Además, en la superficie de la nanopartícula pueden conjugarse receptores, ligandos o moléculas de señalización que permiten dirigir el fármaco a tejidos y tipos celulares específicos. En el tratamiento de la leishmaniasis, las nanopartículas se han recubierto con azúcares, como la manosa, la galactosa

y la fucosa, para favorecer su reconocimiento e internalización por los macrófagos, que sobreexpresan los receptores de este tipo de azúcares ^{96,98-107}.

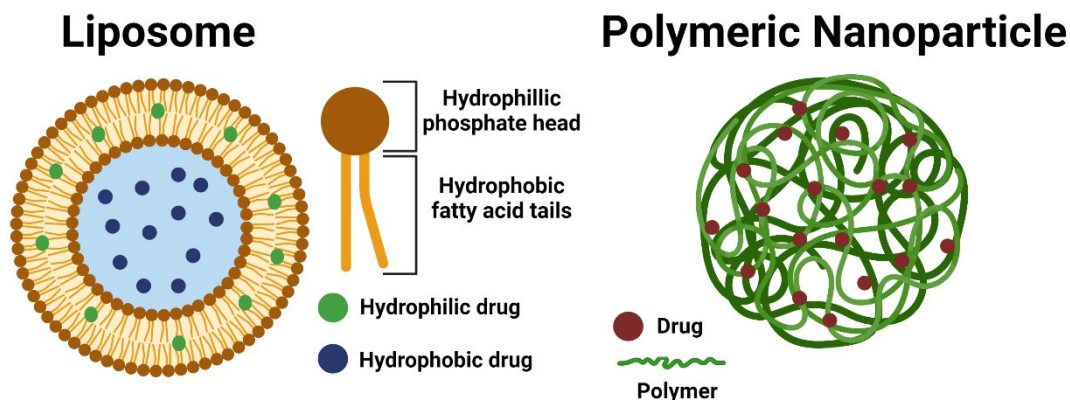


Figura 14. Esquema de un liposoma y una nanopartícula polimérica. En la parte izquierda de la imagen, esquema de un liposoma. La bicapa de fosfolípidos rodea el núcleo acuoso del liposoma, permitiendo transporte de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. Se muestra la estructura de un solo fosfolípido. En la parte derecha, esquema de una nanopartícula polimérica que puede transportar fármacos hidrofóbicos o hidrofílicos. Imagen creada con BioRender.com.

Evaluación de la actividad leishmanicida *in vitro*

Las fases iniciales del descubrimiento de fármacos incluyen la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad y actividad leishmanicida de grandes librerías de compuestos. Actualmente, la identificación de los compuestos activos frente a *Leishmania* ("hits") se lleva a cabo en cribados de alto rendimiento (HTS del inglés High-throughput screening) frente al parásito completo (ensayos fenotípicos) o frente a una proteína específica (ensayos dirigidos a diana). Aunque se basan en paradigmas opuestos, ambos enfoques se complementan entre sí. La deconvolución o identificación de la diana terapéutica de compuestos seleccionados en ensayos fenotípicos, además de ser una ventaja para su desarrollo clínico (facilita su optimización, el control de las resistencias etc), puede ser la base para nuevos ensayos basados en diana ^{65,66,73,77,79,108-110}.

Ensayos dirigidos a diana

Una diana terapéutica es una proteína que es esencial para la supervivencia del parásito, pero que está ausente o, al menos, es estructuralmente diferente en el hospedador. Sin embargo, la mayoría de los compuestos leishmanicidas seleccionados por inhibir o interferir con ellas, finalmente, no eran capaces de matar al parásito ^{64,77,108,110}. La principal razón de esta falta de actividad es que las

numerosas dianas descritas hasta la fecha en *Leishmania*¹¹⁰⁻¹²⁴ no están realmente validadas química y genéticamente¹²⁵.

Ensayos fenotípicos

Los ensayos basados en células, son el punto de partida en el proceso de búsqueda de nuevos fármacos frente a *Leishmania*, dada la ausencia de dianas realmente validadas en este parásito^{73,79,80,109,125}.

Actualmente, no existe un consenso claro sobre que ensayo es el óptimo en términos de reproductibilidad, relevancia biológica e intensidad de trabajo¹²⁶⁻¹²⁹.

En un inicio, los compuestos eran testados frente a la forma extracelular del parásito porque, a diferencia del amastigote, que requiere una célula hospedadora, el promastigote es fácil y barato de cultivar a gran escala, permitiendo evaluar rápidamente y con un bajo coste un gran número de compuestos (Figura 15)¹²⁹⁻¹³⁶. Sin embargo, dado que los amastigotes y los promastigotes son muy diferentes tanto morfológicamente como bioquímicamente, el uso de estos últimos conlleva el riesgo de identificar compuestos inactivos frente a la forma clínicamente relevante^{129, 137}. Siquera-Neto *et al.*, Zulfiqar *et al.* y De Muylder *et al.* observaron que, respectivamente, un 96%, 79% y 56% de los compuestos activos en el ensayo frente a promastigotes, eran inactivos frente a la forma intracelular (falsos positivos)^{131,138,139}.

Posteriormente, se desarrollaron cultivos de amastigotes axénicos con el objetivo de cribar los compuestos frente al estadio causante de la enfermedad sin el inconveniente de necesitar una célula hospedadora^{128,140-142}. Los amastigotes axénicos son amastigotes adaptados a crecer fuera de la célula hospedadora en un medio que mimetiza las condiciones de la vacuola parasitófora (Figura 15)^{128,129,140,141,143}. Existen dos métodos para obtener amastigotes axénicos: I) desencadenar la transformación de promastigote a amastigote incrementando la temperatura de cultivo, y II) aislar directamente los amastigotes de un tejido infectado. El primer intento de cultivo de amastigotes axénicos exitoso fue en *L. pifanoi* en 1984 y, desde entonces, se han cultivado amastigotes axénicos de un gran número de especies¹⁴⁴⁻¹⁴⁹.

Aunque los amastigotes axénicos morfológicamente y bioquímicamente son similares a los amastigotes derivados de una lesión^{143, 150}, en términos de expresión génica son más semejantes a los promastigotes¹⁵¹⁻¹⁵³. Evidenciando que

las condiciones de cultivo de los amastigotes axénicos (temperatura elevada y pH ácido) pueden inducir la diferenciación del parásito, pero no reemplazar las interacciones hospedador-amastigote ni su impacto en la expresión génica e infectividad ^{152,154}.

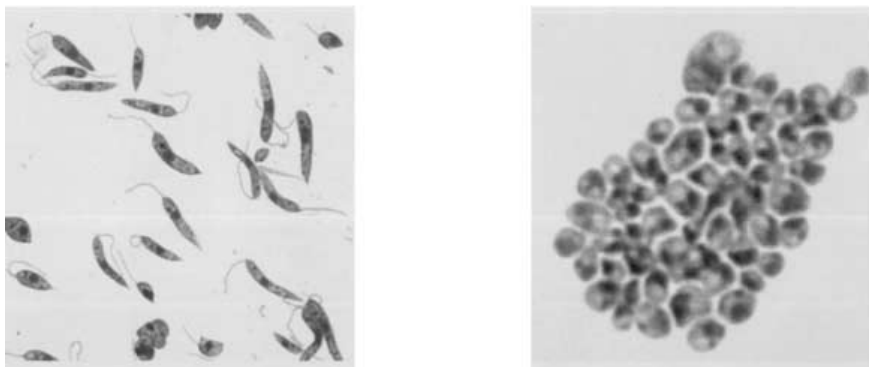


Figura 15. Fotografía tomada en el microscopio óptico de promastigotes y amastigotes axénicos de la especie *L. chagasi*. Promastigotes (izquierda) cultivados a 26°C y pH 7,4 y amastigotes axénicos (derecha) cultivados a 37°C y pH 5,5. El aumento utilizado fue 1000X. Imagen tomada de la referencia 145.

A pesar de que los amastigotes axénicos surgieron como una alternativa más fisiológica, los porcentajes de falsos positivos obtenidos en los distintos ensayos, un 69% por Peña *et al.* y un 78% por De Rycker *et al.*, no son significativamente mejores que los observados anteriormente en los ensayos de promastigotes ^{129,155}. Nuhs *et al.* propusieron que el elevado porcentaje de falsos positivos obtenido por De Rycker *et al.* se debe a que el ensayo no sólo identificó compuestos que eliminan al parásito, sino que también seleccionó aquellos compuestos que ralentizan su crecimiento (citostáticos)¹²⁹. Estos compuestos citostáticos suelen ser inactivos frente a los amastigotes intracelulares, ya que, a diferencia de los amastigotes axénicos, que crecen exponencialmente, los intracelulares apenas se dividen y poseen un metabolismo ralentizado ^{128,155,156}. No obstante, esta no es la principal causa de la falta de correlación entre ambos modelos ya que, tras optimizar el ensayo, el porcentaje de falsos positivos observado por Nuhs *et al.* continuó siendo elevado (51%) ¹²⁹.

La discordancia entre los resultados obtenidos en las formas libres del parásito (promastigotes y amastigotes axénicos) y los resultados en los amastigotes intracelulares, se debe tanto a las diferencias biológicas anteriores como a la localización del parásito en el fagolisosoma ^{127,129,138,156}.

En el ensayo de promastigotes/amastigotes axénicos, el parásito está expuesto directamente al compuesto y, por tanto, éste solo debe atravesar su membrana para ejercer su acción. Sin embargo, para que una molécula sea activa frente al amastigote intracelular ésta debe ser capaz de alcanzarlo, atravesando dos membranas más (la membrana celular del macrófago y la membrana de la vacuola parasitófora). Asimismo, los compuestos deben soportar cambios significativos del pH y ser estables en el ambiente del fagolisosoma (caracterizado por un pH ácido y la presencia de enzimas lisosomales y de radicales libres) ^{129,131,138,143,155,156}. Por último, los ensayos en las formas libres del parásito no detectan profármacos, es decir compuestos que para ser activos deben ser previamente metabolizados por la célula hospedadora, como sucede con los antimoniales pentavalentes. ^{131,157}.

Estas diferencias entre los distintos modelos y su efecto en la acción de los compuestos confirman que los amastigotes intracelulares son el modelo más apropiado para llevar a cabo el cribado de compuestos frente a *Leishmania* ^{137, 139,158, 159}.

Tradicionalmente, la selección de compuestos en modelos intracelulares *in vitro* ha empleado ambas formas del parásito ^{128,130,131,138,155,160}, siendo los amastigotes los que reproducen con mayor exactitud lo que sucede en el hospedador ^{129,161}. Generalmente, se utilizan amastigotes aislados de tejido, sin embargo, su uso a gran escala es difícil de conseguir, y habitualmente se sustituyen por amastigotes axénicos ¹²⁹.

Independientemente de la forma del parásito empleada, es crucial eliminar los parásitos no internalizados durante la infección, porque pueden reinfectar a las células vecinas e interferir en los resultados. Lavar los parásitos extracelulares sin dañar a las células hospedadoras puede ser problemático ^{127,129,162}. Tegazzini *et al.* propone añadir suero de caballo (SC) al medio de cultivo ya que observó que el SC elimina los parásitos extracelulares, tras pocas horas de incubación, reduciendo el número de lavados y el riesgo de dañar a las células ¹⁶².

Como célula hospedadora, se han utilizado diferentes tipos de macrófagos primarios y líneas celulares tanto de origen murino como humano Tabla 1.

Tabla 1. Diferentes poblaciones de macrófagos empleadas como célula hospedadora en infecciones *in vitro* de *Leishmania* spp.

Célula hospedadora	Origen	Método de diferenciación	Abreviatura	Referencia
Células primarias				
Macrófagos peritoneales	Murino	-	PEMs	160, 163,164,165
Macrófagos derivados de médula ósea	Murino	Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)	BMDMs	166,167,168,169
Macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica	Humano	Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)	PBMDMs	170
Líneas celulares				
THP-1	Humano	Forbol 12- miristato 13-acetato (PMA)	-	129,131,137,138,155,162
U937	Humano	Forbol 12- miristato 13-acetato (PMA)	-	171,172

Las células primarias imitan con más precisión lo que ocurre en el hospedador que las líneas celulares, pero son incompatibles con las necesidades de los cribados a gran escala ^{129,162}. La actividad leishmanicida de los compuestos depende de la célula hospedadora utilizada en el cribado. Cada tipo celular posee un origen y nivel de infección diferente, que repercuten en la acción del compuesto ^{173,174}. Por ejemplo, Seifert *et al.* observó que el estibogluconato de sodio es 56 veces más potente frente a *L. donovani* en PBMDM que en THP-1 diferenciadas ¹⁷³.

Alternativamente a las infecciones *in vitro*, se han llevado a cabo cribados de alto rendimiento en explantes de bazo y de ganglio linfático de animales infectados. El explante, a diferencia de las infecciones *in vitro*, contiene toda la variedad de células del órgano y las citoquinas secretadas por estas. Dado el papel clave que juega la respuesta inmune del hospedador tanto en la patogénesis de la leishmaniasis como en la eficacia de muchos de los fármacos actuales, testar los compuestos dentro del ambiente inmunopatológico de un hospedador infectado supone una gran ventaja sobre las infecciones *in vitro*. Además, este modelo permite: I) evaluar los compuestos en una infección crónica establecida durante semanas, lo cual se asemeja más a las infecciones humanas, y II) seleccionar compuestos que

interfieran con las vías metabólicas del amastigote intracelular y/o con la respuesta inmune promotora de la enfermedad ^{126,127,175}.

Los cribados frente a amastigotes intracelulares son laboriosos. Clásicamente, la cuantificación de la carga parasitaria se ha llevado a cabo mediante recuento microscópico. Tras teñir las células infectadas con el colorante Giemsa, se determina el número de células infectadas y el número de amastigotes por célula en 50-300 macrófagos (Figura 16). Esta técnica es tediosa y dificulta el testado de varios compuestos a la vez ^{140,142,176-178}. Por este motivo, el cribado de grandes librerías de compuestos mayoritariamente se ha llevado a cabo en dos pasos: un cribado primario en una forma libre del parásito, para reducir el tamaño de la librería, y un cribado secundario en amastigotes intracelulares de los compuestos activos en el ensayo anterior, para confirmar su actividad frente a la forma intracelular ^{128-131,139,143,156,161,179}.

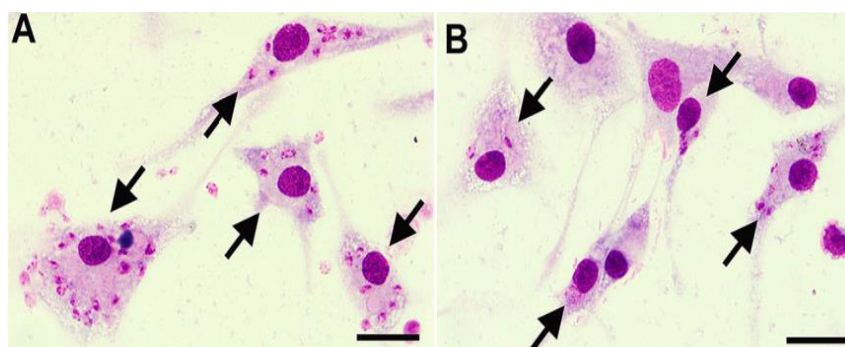


Figura 16. Fotografía de macrófagos infectados con *Leishmania* spp y teñidos con Giemsa. (A) Macrófagos sin tratar. (B) Macrófagos infectados y tratados con 0.02µg/mL de anfotericina B. Las flechas indican los macrófagos infectados. Barra: 50 µm. Imagen tomada de la referencia 178.

Sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías y a la incorporación de parásitos transgénicos, se ha incrementado el rendimiento de estos ensayos en amastigotes intracelulares y se ha solventado la necesidad de seguir esta estrategia en dos pasos. Los cribados de alto rendimiento actuales estiman el número de amastigotes viables mediante dos tipos de métodos: los basados en la lectura de microplacas y los basados en la microscopia de alto contenido (HCM) ^{127,129,176,177}.

Los métodos basados en la lectura de microplacas determinan indirectamente el número de amastigotes en todo el pocillo. Mientras que los HCM cuentan directamente el número de células infectadas, el número de amastigotes por célula y el número de macrófagos, permitiendo estos últimos discriminar entre la actividad derivada de matar específicamente al parásito versus la actividad debida a dañar a

la célula hospedadora ^{129,137,156}. Si bien los HCM proporcionan un análisis célula a célula más completo, son métodos complejos únicamente llevados a cabo en infecciones *in vitro* y que requieren de un equipamiento costoso e inalcanzable para algunos laboratorios (Figura 17) ^{129,175}.

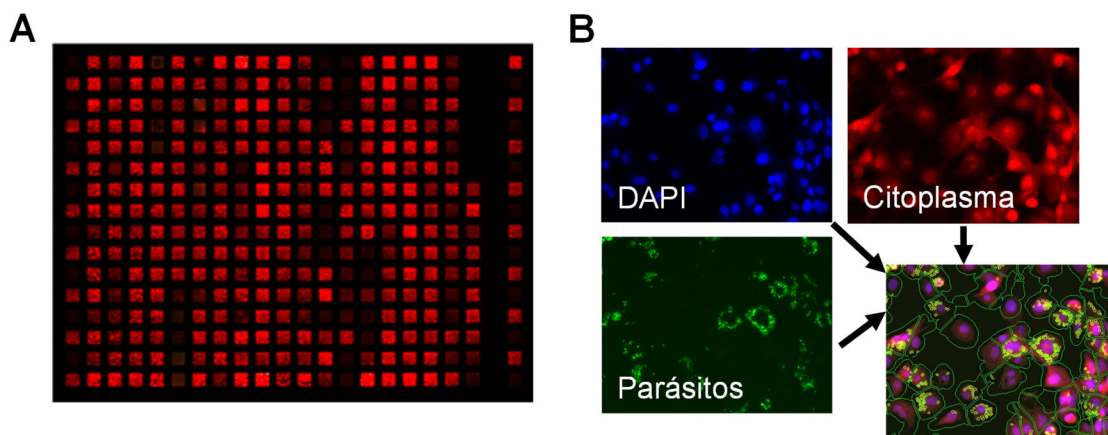


Figura 17. Métodos empleados actualmente para la cuantificación del número de amastigotes viables. (A) Método basado en la lectura de microplacas que emplea parásitos modificados genéticamente para que expresen una proteína infrarroja (iRFP). Registro de la fluorescencia infrarroja emitida por una placa de 384 pocillos. Imagen tomada de la referencia 175. (B) Método basado en la microscopia de alto contenido (HCM) que utiliza parásitos modificados genéticamente para que expresen una proteína fluorescente (GFP). Las células hospedadoras son identificadas gracias a las tinciones del núcleo (DAPI) y del citoplasma. Los parásitos fluorescentes son localizados mediante la proteína GFP. El resultado del análisis se muestra en el panel inferior derecho (citoplasma: contorno verde, amastigotes: contorno amarillo). Imagen modificada de la referencia 129.

En los métodos basados en la lectura de microplacas, los parásitos han sido modificados genéticamente para que sinteticen proteínas fluorescentes o enzimas como la luciferasa o la β -lactamasa. La fluorescencia/bioluminiscencia emitida o la cantidad de sustrato fabricado por los parásitos transfectados es directamente proporcional a la viabilidad del parásito ^{127, 180,181}.

En los HCM, existen dos técnicas para localizar y contar a los parásitos: I) usar parásitos modificados genéticamente para que expresen genes reporteros o II) teñir el núcleo del parásito con un colorante fluorescente, como DAPI. Esta segunda técnica supone una gran ventaja sobre la primera ya que permite testar compuestos en diferentes especies, incluyendo aislados clínicos, sin la necesidad de modificarlos genéticamente ^{129,137}. Además, evita las limitaciones del uso de genes reporteros como la posibilidad de resistencias cruzadas conferidas por la resistencia al antibiótico de selección o las posibles consecuencias biológicas provocadas por la alteración de la arquitectura génomica ¹⁸¹.

Evaluación de la actividad *in vivo*

La eficacia de los compuestos identificados *in vitro*, con buenas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, debe ser verificada en modelos animales, antes de iniciar un ensayo clínico con humanos. Estos modelos, a diferencia de los ensayos *in vitro*, permiten determinar la actividad y la seguridad de un compuesto teniendo en cuenta su biodisponibilidad ^{65,181,182}.

El mejor modelo animal es aquel que recrea fielmente la enfermedad humana, en cuanto a su etiología, fisiopatología, sintomatología y respuesta a los agentes terapéuticos. Durante las últimas décadas, se han desarrollado muchos modelos experimentales, aunque ninguno de ellos reproduce con precisión la leishmaniasis humana. Los modelos en roedores han servido como paso previo a estudiar la enfermedad en otros animales como perros o primates no humanos. El ratón Balb/c y el hámster dorado o sirio son los modelos más utilizados en el descubrimiento de fármacos porque son baratos, fáciles de manejar y requieren una menor cantidad de compuesto, en especial el ratón Balb/c que es de menor tamaño ^{65,181-183}.

Los resultados obtenidos con estos modelos se ven influidos por varios parámetros experimentales, como la base genética, la cepa de *Leishmania*, la vía de inoculación o el lugar de la infección, la dosis del parásito y la coadministración con la saliva del flebótomo ^{65,183-186}.

Modelo animal leishmaniasis visceral

Existe cierta controversia sobre cuál es el mejor modelo animal para ser usado en LV. Mientras que el modelo de hámster reproduce estrictamente la progresión de la leishmaniasis visceral humana, caracterizada por un incesante aumento de la carga parasitaria, caquexia progresiva, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hiper-gammaglobulinemia y, finalmente, la muerte, el modelo murino deriva en una infección subclínica alejada de la enfermedad observada en humanos, y caracterizada por un control prematuro de la carga parasitaria en hígado, mediado por IL-12, iNOS e IFN- γ , y una baja carga parasitaria en bazo ^{65,181,183,185,187}.

Sin embargo, los ratones Balb/c infectados con altas dosis se han propuesto como un modelo adecuado de LV crónica dado que desarrollan rasgos característicos de la enfermedad como hepatoesplenomegalia, pérdida de células estromales gp38, remodelación de la zona marginal esplénica, agotamiento de las células T,

alteración de la migración de las células dendríticas y pérdida de centros germinales foliculares ^{65,182,189-191}.

Modelo animal leishmaniasis cutanea

Los modelos de roedores son los más utilizados en el descubrimiento de nuevos fármacos frente a la LC. El amplio espectro de la LC en humanos se puede observar en las diferentes cepas de ratón. Tras la infección con *L. major*, los ratones Balb/c presentan úlceras en el lugar de inoculación que posteriormente visceralizan. Mientras que otras cepas de ratón, como C57BL/6, son relativamente resistentes a la infección, ya que sólo desarrollan pequeñas lesiones en el lugar de inoculación que al cabo de unas semanas curan ^{184,192}.

Actualmente, el modelo Balb/c infectado con *L. major* es uno de los modelos más extendidos en el testado de compuestos. Además de ser un modelo muy reproducible, la idea de utilizar ratones Balb/c, en los que la LC progresa rápidamente, se basa en que, si los ratones Balb/c pueden curarse de la enfermedad del parásito, probablemente las cepas de ratón resistentes también ^{184,193,194}.

Por último, el hámster sirio se emplea como modelo para las cepas de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, como *L. braziliensis*, dada la baja susceptibilidad de los ratones a su infección. En el hámster la enfermedad crónica asemejándose a los casos de LC que no resuelven espontáneamente ^{184,195,196}.

Imagen *in vivo* a tiempo real

Tradicionalmente, las cargas parasitarias en los tejidos eran cuantificadas mediante tres técnicas: I) recuento microscópico de amastigotes en frotis teñidos con Giemsa II) ensayo de dilución límite y III) amplificación del ADN del parásito por q-PCR. Estas técnicas conllevan mucho tiempo, son laboriosas y, a excepción de la q-PCR, poco sensibles. Además, la obtención de datos precisos y relevantes requiere el sacrificio de un gran número de animales ^{181,184,197}.

Sin embargo, la incorporación de la imagen *in vivo* a tiempo real ha permitido superar estas limitaciones y acelerar el desarrollo de fármacos leishmanicidas. Con esta técnica no invasiva se pueden: I) realizar estudios longitudinales con un número reducido de animales y en los que cada animal es su propio control, reduciendo así la variabilidad de los resultados, II) detectar la expansión del

parásito a un lugar anatómico inesperado, y III) localizar de forma precisa los parásitos, superponiendo las señales en un mapa de tejidos y órganos o utilizando un sistema de rayos X que algunos sistemas de imagen tienen acoplado ^{182,184,198-200}.

La imagen *in vivo* a tiempo real se basa en el uso de parásitos transgénicos fluorescentes y bioluminiscentes. Los parásitos bioluminiscentes utilizados expresan una enzima denominada luciferasa, habitualmente aislada de *Renilla* spp. o de luciérnaga. Las luciferasas catalizan una reacción de oxidación que libera fotones de luz. La detección de las proteínas bioluminiscentes, a diferencia de las fluorescentes, requiere por tanto la administración previa del sustrato de la reacción, lo cual incrementa significativamente su coste (Figura 18) ^{175,186,197-199,201-203}.

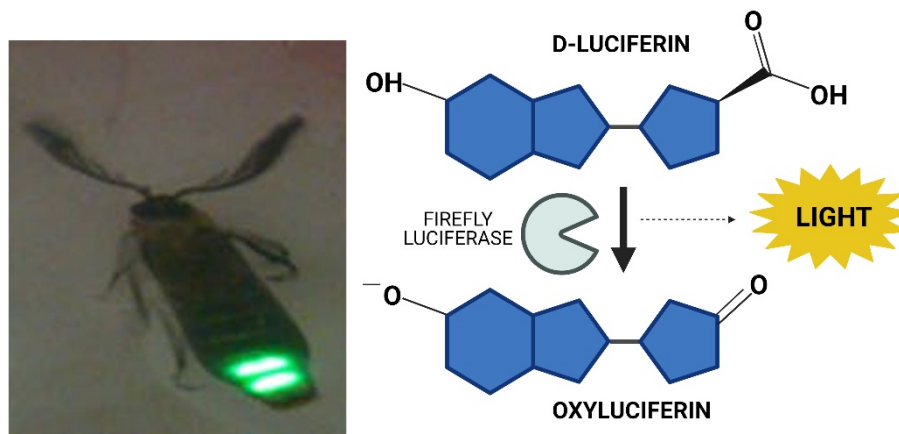


Figura 18. Reacción catalizada por la enzima luciferasa aislada de luciérnaga. En la parte izquierda, un ejemplar de la luciérnaga *Amydetes viviannii* emitiendo bioluminiscencia. Imagen tomada de la referencia 203. En la parte derecha de la imagen, esquema de la reacción química: la luciferasa de luciérnaga oxida la D-Luciferina en oxiluciferina y libera un fotón de luz. Imagen creada con BioRender.com.

La luz emitida por la luciferasa de luciérnaga oscila entre los 550 nm (verde lima) y los 620 nm (rojo). Mientras que la luciferasa de *Renilla* spp. está acoplada a una proteína fluorescente, semejante a la GFP, que desplaza la emisión del espectro azul (480 nm) al verde (535 nm). Los parásitos fluorescentes empleados expresan generalmente proteínas cuyos picos de emisión se localizan entre el espectro verde e infrarrojo (GFP, RFP mCherry, IFP1.4, iRFP) ^{175,184,187,199,201,202}.

En los modelos de LV, donde los parásitos se localizan en tejidos profundos (hígado, bazo y médula ósea), sólo los modelos bioluminiscentes tienen suficiente sensibilidad para visualizar la infección en ratones y hámsters. Sin embargo, la escasa penetración de la luz de excitación de las proteínas fluorescentes y la autofluorescencia de los tejidos, limita el uso de la fluorescencia a los modelos de LC, dónde los parásitos se localizan en lugares poco profundos como la almohadilla plantar. Incluso el uso de proteínas fluorescentes desplazadas al rojo y rojo lejano que mejoran la sensibilidad, ya que la absorción y dispersión de luz por parte de los tejidos en esos espectros es significativamente menor que en el espectro verde, no es suficiente para hacer el seguimiento de la enfermedad en tejidos profundos (Figura 19) ^{175,182,184,187,198,199,201,202}.

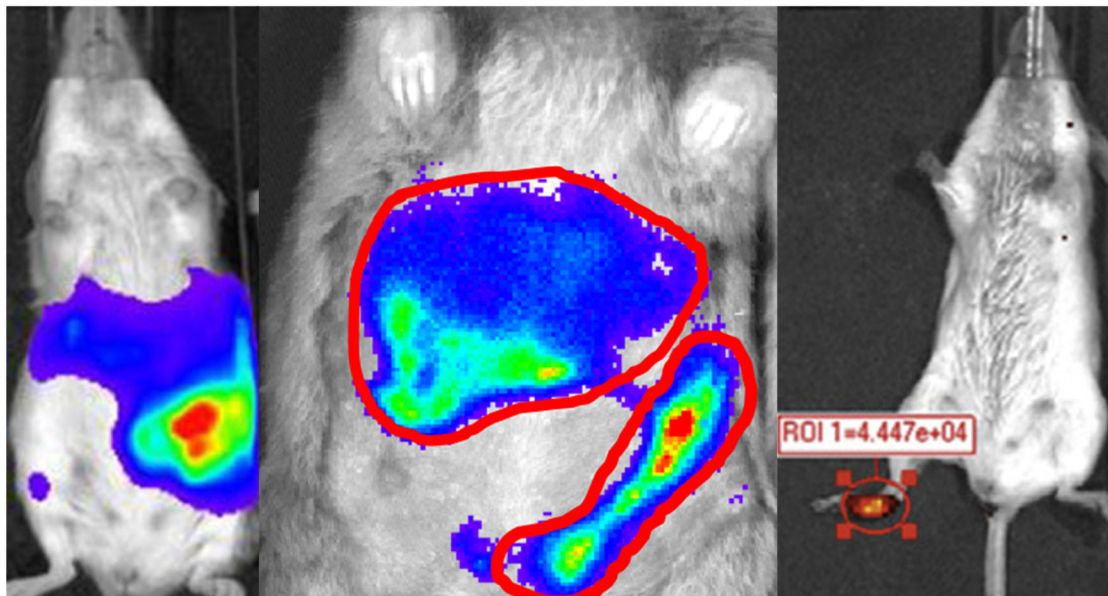


Figura 19. Modelos animales que emplean parásitos que expresan genes reporteros. De izquierda a derecha: modelo de LV en Balb/c infectado con *L. infantum* que expresa una luciferasa aislada de luciérnaga. Imagen tomada de la referencia 182. Modelo de LV en hámster sirio infectado con *L. donovani* que expresa una luciferasa aislada de luciérnaga. Imagen tomada de la referencia 187. Modelo de LC en Balb/c infectado con *L. mexicana* que expresa la proteína fluorescente mCherry. Imagen tomada de la referencia 197.

Referencias

- (1) Cavalcanti, D. P., de Souza, W. (2018) The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning*. 2018, 9603051.
- (2) Liu Y, Englund P. T. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. *Mol. Microbiol.* 64(3), 676-690.
- (3) Klingbeil, M. M., Drew, M. E., Liu, Y., Morris, J. C., Motyka, S. A., Saxowsky, T. T., Wang, Z., Englund, P. T. (2001) Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication. *Protist.* 152(4), 255-262.
- (4) Esch, K. J, Petersen, C. A. (2013) Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(1), 58-85.
- (5) Alcolea, P. J., Alonso, A., Molina, R., Jiménez, M., Myler, P. J., Larraga, V. (2019) Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. *PLoS Negl Trop Dis.* 13(5), e0007288.
- (6) Halada, P., Hlavackova, K., Dvorak, V., Volf, P. (2018) Identification of immature stages of phlebotomine sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle. *Insect Biochem. Mol Biol.* 93, 47-56.
- (7) Kato, H., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Uezato, H., Mimori, T., Hashiguchi, Y. (2010) Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7(3), 814-826.
- (8) Bates, P. A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37(10), 1097-1106.
- (9) Gossage, S. M., Rogers, M. E, Bates, P. A. (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* 33(10), 1027-1034.
- (10) Sacks, D., Kamhawi, S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 453-483.
- (11) da Silva, R., Sacks, D. L. (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect. Immun.* 55(11), 2802-2806.
- (12) Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G. (2018) Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat. Microbiol.* 3(5), 548-555.
- (13) Kamhawi, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22(9), 439-445.
- (14) Gluenz, E., Wheeler, R. J., Hughes, L., Vaughan, S. (2015) Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. *Methods Cell Biol.* 127, 509-542.
- (15) Handman, E. (1999) Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol.* 44, 1-39.

- (16) Ferreira, T. (2019). Relevance of multi-species phenotypic assays in *Leishmania* early drug discovery.
- (17) Handman, E., Bullen, D. V. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18(8), 332-334.
- (18) Colmenares, M., Kar, S., Goldsmith-Pestana, K., McMahon-Pratt, D. (2002) Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 Suppl 1:S3-7.
- (19) Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., Siqueira-Neto, J. L. (2012) Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 28(2), 11-19.
- (20) WHO. (2020) Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *WHO.* 95, 265-280.
- (21) Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., Gilaberte, Y. (2021) Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr.* 112, 601-618.
- (22) Koovits, P. J., Dessoy, M. A., Matheeussen, A., Maes, L., Caljon, G., Ferreira, L. L. G., Chelucci, R. C., Michelin-Duarte, S., Andricopulo, A. D., Campbell, S., Kratz, J. M., Mowbray, C. E., Dias, L. C. (2020) Hit-to-lead optimization of a benzene sulfonamide series for potential antileishmanial agents. *RSC Med. Chem.* 11(11), 1267-1274.
- (23) Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27(2), 123-147.
- (24) GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. (2016) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 388(10053), 1459-1544.
- (25) GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators. (2016) Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 388(10053), 1603-1658.
- (26) Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 7(5), e35671.
- (27) Burza, S., Croft, S. L., Boelaert, M. (2018) Leishmaniasis. *Lancet.* 392(10151), 951-970.
- (28) McGwire, B. S., Satoskar, A. R. (2014) Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 107(1), 7-14.
- (29) Roatt, B. M., de Oliveira Cardoso, J. M., De Brito, R. C. F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., Reis, A. B. (2020) Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104(21), 8965-8977.

- (30) Aronson, N. E., Joya, C. A. (2019) Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 33(1), 101-117.
- (31) Sundar, S., Singh, A. (2018) Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. *Parasitology.* 145(4), 481-489.
- (32) Gradoni, L., López-Vélez, R., Mokni, M. (2017) Manual on case management and surveillance of leishmaniasis in the WHO European Region. *WHO.*
- (33) Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A. A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroge, S., Manduku, V., Mutuma, G., Apadet, L., Lodenyo, H., Mutea, D., Kirigi, G., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tafes, H., Mekonnen, Y., Makonnen, E., Ndegwa, S., Sagaki, P., Kimutai, R., Kesusu, J., Owiti, R., Ellis, S., Wasunna, M. (2012) Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(6), e1674.
- (34) Balasegaram, M., Ritmeijer, K., Lima, M. A., Burza, S., Ortiz Genovese, G., Milani, B., Gaspani, S., Potet, J., Chappuis, F. (2012) Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 17(4), 493-510.
- (35) Loiseau, P. M., Bories, C. (2006) Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(5), 539-550.
- (36) Frézard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R. R. (2009) Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules.* 14(7), 2317-2336.
- (37) Ghorbani, M., Farhoudi, R. (2017) Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 25-40.
- (38) Haldar, A. K., Sen, P., Roy, S. (2011) Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol. Biol. Int.* 571242.
- (39) Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B., Sereno, D. (2011) *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res.* 109(5), 1225-1232.
- (40) Ashutosh, Sundar, S., Goyal, N. (2007) Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J. Med. Microbiol.* 56(Pt 2), 143-153.
- (41) Frézard, F., Monte-Neto, R., Reis, P. G. (2014) Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. *Biophys. Rev.* ;6(1), 119-132.
- (42) Mookerjee Basu, J., Mookerjee, A., Sen, P., Bhaumik, S., Sen, P., Banerjee, S., Naskar, K., Choudhuri, S. K., Saha, B., Raha, S., Roy, S. (2006) Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(5), 1788-1797.

- (43) Ponte-Sucré, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., Papadopoulou, B. (2017) Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(12), e0006052.
- (44) Chattopadhyay, A., Jafurulla, M. (2011) A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416(1-2), 7-12.
- (45) Goldsmith, D. R., Perry, C. M. (2004) Amphotericin B lipid complex: in visceral leishmaniasis. *Drugs.* 64(17), 1905-1913.
- (46) Antoniadou, A., Dupont, B. (2005) Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? *J. Mycol. Med.* 15, 230–238.
- (47) Sundar, S., Chakravarty, J. (2013) Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert. Opin. Pharmacother.* 14(1), 53-63.
- (48) . Ventin, F., Cincurá, C., Machado, P. R. L. (2018) Safety and efficacy of miltefosine monotherapy and pentoxifylline associated with pentavalent antimony in treating mucosal leishmaniasis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 16(3), 219-225.
- (49) Reimão, J. Q., Pita Pedro, D. P., Coelho, A. C. (2020) The preclinical discovery and development of oral miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis: a case history. *Expert. Opin. Drug Discov.* 15(6), 647-658.
- (50) Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., de Vries, P.J. (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(11), 2576-2597.
- (51) Fiuza, J. A., Gannavaram, S., Santiago Had, C., Selvapandiyam, A., Souza, D. M., Passos, L. S., de Mendonça, L. Z., Lemos-Giunchetti Dda, S., Ricci, N. D., Bartholomeu, D. C., Giunchetti, R. C., Bueno, L. L., Correa-Oliveira, R., Nakhasi, H. L., Fujiwara, R. T. (2015) Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. *Vaccine.* 33(2), 280-288.
- (52) Anand, S., Madhubala, R. (2015) Genetically Engineered Ascorbic acid-deficient Live Mutants of *Leishmania donovani* induce long lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. *Sci. Rep.* 5, 10706.
- (53) Dey, R., Dagur, P. K., Selvapandiyam, A., McCoy, J. P., Salotra, P., Duncan, R., Nakhasi, H. L. (2013) Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice. *J. Immunol.* 190(5), 2138-2149.
- (54) Bruhn, K. W., Birnbaum, R., Haskell, J., Vanchinathan, V., Greger, S., Narayan, R., Chang, P. L., Tran, T. A., Hickerson, S. M., Beverley, S. M., Wilson, M. E., Craft, N. (2012) Killed but metabolically active *Leishmania infantum* as a novel whole-cell vaccine for visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(4), 490-498.

- (55) Dantas-Torres, F. (2006) Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.* 141(1-2), 1-8.
- (56) Chakravarty, J., Kumar, S., Trivedi, S., Rai, V. K., Singh, A., Ashman, J. A., Laughlin, E. M., Coler, R. N., Kahn, S. J., Beckmann, A. M., Cowgill, K. D., Reed, S. G., Sundar, S., Piazza, F. M. (2011) 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.* 29(19), 3531-3537.
- (57) Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T., Roy, S. (2005) Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 174(11), 7160-7171.
- (58) Bertholet, S., Goto, Y., Carter, L., Bhatia, A., Howard, R. F., Carter, D., Coler, R. N., Vedvick, T. S., Reed, S. G. (2009) Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine.* 27(50), 7036-7045.
- (59) Miura, R., Kooriyama, T., Yoneda, M., Takenaka, A., Doki, M., Goto, Y., Sanjoba, C., Endo, Y., Fujiyuki, T., Sugai, A., Tsukiyama-Kohara, K., Matsumoto, Y., Sato, H., Kai, C. (2015) Efficacy of recombinant canine distemper virus expressing *Leishmania* antigen against *Leishmania* challenge in dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(7), e0003914.
- (60) Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Argüello, M. B., Alcamí, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J. M., Courtenay, O. (2009) A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 27(7), 1080-1086.
- (61) Samant, M., Gupta, R., Kumari, S., Misra, P., Khare, P., Kushawaha, P. K., Sahasrabudhe, A. A., Dube, A. (2009) Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 183(1), 470-479.
- (62) Riede, O., Seifert, K., Oswald, D., Endmann, A., Hock, C., Winkler, A., Salguero, F. J., Schroff, M., Croft, S. L., Juhls, C. (2015) Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine. *Gene Ther.* 22(8), 628-635.
- (63) Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., Singh, S. (2016) Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit. Vectors.* 9(1), 277.
- (64) Reguera, R. M., Calvo-Álvarez, E., Alvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R. (2014) Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4(3), 355-357.

- (65) Balaña-Fouce, R., Pérez-Pertejo, M. Y., Domínguez-Asenjo, B., Gutiérrez-Corbo, C., Reguera, R. M. (2019) Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discov. Today*. 24(5), 1209-1216.
- (66) Keller, T. H., Shi, P. Y., Wang, Q. Y. (2011) Anti-infectives: can cellular screening deliver? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15(4), 529-533.
- (67) Alves, F., Bilbe, G., Blesson, S., Goyal, V., Monnerat, S., Mowbray, C., Muthoni Ouattara, G., Pécoul, B., Rijal, S., Rode, J., Solomos, A., Strub-Wourgaft, N., Wasunna, M., Wells, S., Zijlstra, E. E., Arana, B., Alvar, J. (2018) Recent development of visceral leishmaniasis treatments: successes, pitfalls, and perspectives. *Clin. Microbiol. Rev.* 31(4), e00048-18.
- (68) Khare, S., Nagle, A. S., Biggart, A., Lai, Y. H., Liang, F., Davis, L. C., Barnes, S. W., Mathison, C. J., Myburgh, E., Gao, M. Y., Gillespie, J. R., Liu, X., Tan, J. L., Stinson, M., Rivera, I. C., Ballard, J., Yeh, V., Groessl, T., Federe, G., Koh, H. X., Venable, J. D., Bursulaya, B., Shapiro, M., Mishra, P. K., Spraggon, G., Brock, A., Mottram, J. C., Buckner, F. S, Rao, S. P., Wen, B. G., Walker, J. R., Tuntland, T., Molteni, V., Glynn, R. J., Supek, F. (2016) Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*. 537(7619), 229-233.
- (69) Thomas, M. G., De Rycker, M., Ajakane, M., Albrecht, S., Álvarez-Pedraglio, A. I., Boesche, M., Brand, S., Campbell, L., Cantizani-Perez, J., Cleghorn, L. A. T., Copley, R. C. B., Crouch, S. D., Daugan, A., Drewes, G., Ferrer, S., Ghidelli-Disse, S., Gonzalez, S., Gresham, S. L., Hill, A. P., Hindley, S. J., Lowe, R. M., MacKenzie, C. J., MacLean, L., Manthri, S., Martin, F., Miguel-Siles, J., Nguyen, V. L., Norval, S., Osuna-Cabello, M., Woodland, A., Patterson, S., Pena, I., Quesada-Campos, M. T., Reid, I. H., Revill, C., Riley, J., Ruiz-Gomez, J. R., Shishikura, Y., Simeons, F. R.C., Smith, A., Smith, V. C., Spinks, D., Stojanovski, L., Thomas, J., Thompson, S., Underwood, T., Gray, D. W., Fiandor, J. M., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., Read, K. D., Miles, T. J. (2019) Identification of GSK3186899/DDD853651 as a preclinical development candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Med. Chem.* 62(3), 1180-1202.
- (70) Wyllie, S., Brand, S., Thomas, M., De Rycker, M., Chung, C. W., Pena, I., Bingham, R. P., Bueren-Calabuig, J. A., Cantizani, J., Cebrian, D., Craggs, P. D., Ferguson, L., Goswami, P., Hobrath, J., Howe, J., Jeacock, L., Ko, E. J., Korczynska, J., MacLean, L., Manthri, S., Martinez, M. S., Mata-Cantero, L., Moniz, S., Nühs, A., Osuna-Cabello, M., Pinto, E., Riley, J., Robinson, S., Rowland, P., Simeons, F. R. C., Shishikura, Y., Spinks, D., Stojanovski, L., Thomas, J., Thompson, S., Viayna Gaza, E., Wall, R. J., Zuccotto, F., Horn, D., Ferguson, M. A. J., Fairlamb, A. H., Fiandor, J. M., Martin, J., Gray, D. W., Miles, T. J., Gilbert, I. H., Read, K. D., Marco, M., Wyatt, P. G. (2019) Preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis that acts through proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116(19), 9318-9323.
- (71) Wyllie, S., Thomas, M., Patterson, S., Crouch, S., De Rycker, M., Lowe, R., Gresham, S., Urbaniak, M. D., Otto, T. D., Stojanovski, L., Simeons, F. R. C., Manthri, S., MacLean, L. M., Zuccotto, F., Homeyer, N., Pflaumer, H., Boesche, M., Sastry, L., Connolly, P., Albrecht, S., Berriman, M.,

Drewes, G., Gray, D. W., Ghidelli-Disse, S., Dixon, S., Fiandor, J. M., Wyatt, P. G., Ferguson, M. A. J., Fairlamb, A. H., Miles, T. J., Read, K. D., Gilbert, I. H. (2018) Cyclin-dependent kinase 12 is a drug target for visceral leishmaniasis. *Nature*. 560(7717), 192-197.

(72) Gupta, S., Yardley, V., Vishwakarma, P., Shivahare, R., Sharma, B., Launay, D., Martin, D., Puri, S. K. (2015) Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(2), 518-527.

(73) Nwaka, S., Hudson, A. (2006) Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5(11), 941-955.

(74) Charlton, R. L., Rossi-Bergmann, B., Denny, P. W., Steel, P. G. (2018) Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology*. 145(2), 219-236.

(75) Guha, M. (2015). Repositioning existing drugs for cancer treatment. *The Pharmaceutical Journal* 294, 7867.

(76) Autor desconocido (2002). New treatment for leishmaniasis is 95% effective. *Bulletin of the World Health Organization, WHO*. 80 (8), 688.

(77) Field, M. C., Horn, D., Fairlamb, A. H., Ferguson, M. A. J., Gray, D. W., Read, K. D., De Rycker, M., Torrie, L. S., Wyatt, P. G., Wyllie, S., Gilbert, I. H. (2017) Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(7), 447. Erratum for: *Nat. Rev. Microbiol.* 15(4), 217-2231.

(78) Andrews, K. T., Fisher, G., Skinner-Adams, T. S. (2014) Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4(2), 95-111.

(79) Nagle, A. S., Khare, S., Kumar, A. B., Supek, F., Buchynskyy, A., Mathison, C. J., Chennamaneni, N. K., Pendem, N., Buckner, F. S., Gelb, M. H., Molteni, V. (2014) Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chem. Rev.* 114(22), 11305-11347.

(80) Uliana, S. R. B., Trinconi, C. T., Coelho, A. C. (2018) Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 145(4), 464-480.

(81) Wasunna, M., Njenga, S., Balasegaram, M., Alexander, N., Omollo, R., Edwards, T., Dorlo, T. P., Musa, B., Ali, M. H., Elamin, M. Y., Kirigi, G., Juma, R., Kip, A. E., Schoone, G. J., Hailu, A., Olobo, J., Ellis, S., Kimutai, R., Wells, S., Khalil, E. A., Strub, Wourgaft, N., Alves, F., Musa, A. (2016) Efficacy and Safety of AmBisome in Combination with Sodium Stibogluconate or Miltefosine and Miltefosine Monotherapy for African Visceral Leishmaniasis: Phase II Randomized Trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(9), e0004880.

(82) Abu Ammar, A., Nasereddin, A., Ereqat, S., Dan-Goor, M., Jaffe, C. L., Zussman, E., Abdeen, Z. (2019) Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. *Drug Deliv. Transl. Res.* 9(1), 76-84.

- (83) Abamor, E. S., Allahverdiyev, A. M., Bagirova, M., Rafailovich, M. (2017) Meglumine antimoniate-TiO₂@Ag nanoparticle combinations reduce toxicity of the drug while enhancing its antileishmanial effect. *Acta Trop.* 169, 30-42.
- (84) Nadhman, A., Khan, M. I., Nazir, S., Khan, M., Shahnaz, G., Raza, A., Shams, D. F., Yasinzai, M. (2016) Annihilation of *Leishmania* by daylight responsive ZnO nanoparticles: a temporal relationship of reactive oxygen species-induced lipid and protein oxidation. *Int. J. Nanomedicine.* 11, 2451-2461.
- (85) Santos, D. C. M. D., de Souza, M. L. S., Teixeira, E. M., Alves, L. L., Vilela, J. M. C., Andrade, M., Carvalho, M. D. G., Fernandes, A. P., Ferreira, L. A. M., Aguiar, M. M. G. (2018) A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. *J. Drug Target.* 26(4), 357-364.
- (86) Hunter, C. A., Dolan, T. F., Coombs, G. H., Baillie, A. J. (1988) Vesicular systems (niosomes and liposomes) for delivery of sodium stibogluconate in experimental murine visceral leishmaniasis. *J. Pharm. Pharmacol.* 40(3), 161-165.
- (87) Casa, D. M., Scariot, D. B., Khalil, N. M., Nakamura, C. V., Mainardes, R. M. (2018) Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. *Exp. Parasitol.* 192, 12-18.
- (88) Sinha, R., Roychoudhury, J., Palit, P., Ali, N. (2015) Cationic liposomal sodium stibogluconate (SSG), a potent therapeutic tool for treatment of infection by SSG-sensitive and -resistant *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(1), 344-355.
- (89) Roychoudhury, J., Sinha, R., Ali, N. (2011) Therapy with sodium stibogluconate in stearylamine-bearing liposomes confers cure against SSG-resistant *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One.* 6(3), e17376.
- (90) Medda, S., Mukhopadhyay, S., Basu, M. K. (1999) Evaluation of the *in-vivo* activity and toxicity of amphotericin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms. *J. Antimicrob. Chemother.* 44(6), 791-794.
- (91) Minodier, P., Retornaz, K., Horelt, A., Garnier, J. M. (2003) Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17(2) 183-188.
- (92) Mohamed-Ahmed, A. H., Seifert, K., Yardley, V., Burrell-Saward, H., Brocchini, S., Croft, S. L. (2013) Antileishmanial activity, uptake, and biodistribution of an amphotericin B and poly(α -Glutamic Acid) complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(10), 4608-4614.
- (93) Nafari, A., Cheraghipour, K., Sepahvand, M., Shahrokhi, G., Gabal, E., Mahmoudvand, H. (2020) Nanoparticles: new agents toward treatment of leishmaniasis. *Parasite Epidemiol. Control.* 10, e00156.
- (94) Saleem, K., Khursheed, Z., Hano, C., Anjum, I., Anjum, S. (2019) Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recent advances and challenges. *Nanomaterials (Basel).* 9(12), 1749.

- (95) Prasanna, P., Kumar, P., Kumar, S., Rajana, V. K., Kant, V., Prasad, S. R., Mohan, U., Ravichandiran, V., Mandal, D. (2021) Current status of nanoscale drug delivery and the future of nano-vaccine development for leishmaniasis - A review. *Biomed. Pharmacother.* 141, 111920.
- (96) Varma, D. M., Redding, E. A., Bachelder, E. M., Ainslie, K. M. (2021) Nano- and microformulations to advance therapies for visceral leishmaniasis. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7(5), 1725-1741.
- (97) Chaubey, P., Mishra, B. (2014) Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. *Carbohydr. Polym.* 101, 1101-1108.
- (98) Chaubey, P., Mishra, B., Mudavath, S. L., Patel, R. R., Chaurasia, S., Sundar, S., Suvarna, V., Monteiro, M. (2018) Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against *Leishmania donovani*. *Int. J. Biol. Macromol.* 111, 109-120.
- (99) Chaubey, P., Patel, R. R., Mishra, B. (2014) Development and optimization of curcumin-loaded mannosylated chitosan nanoparticles using response surface methodology in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 11(8), 1163-1181.
- (100) Shahnaz, G., Edagwa, B. J., McMillan, J., Akhtar, S., Raza, A., Qureshi, N. A., Yasinzai, M., Gendelman, H. E. (2017) Development of mannose-anchored thiolated amphotericin B nanocarriers for treatment of visceral leishmaniasis. *Nanomedicine (Lond)*. 12(2), 99-115.
- (101) Barros, D., Costa Lima, S. A., Cordeiro-da-Silva, A. (2015) Surface functionalization of polymeric nanospheres modulates macrophage activation: relevance in leishmaniasis therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 10(3), 387-403.
- (102) Singodia, D., Verma, A., Verma, R. K., Mishra, P. R. (2012) 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*. 8(4), 468-477.
- (103) Raay, B., Medda, S., Mukhopadhyay, S., Basu, M. K. (1999) Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian J. Biochem Biophys.* 36(4), 248-251.
- (104) Jain, K., Verma, A. K., Mishra, P. R., Jain, N. K. (2015) Surface-engineered dendrimeric nanoconjugates for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59(5), 2479-2487.
- (105) Rathore, A., Jain, A., Gulbake, A., Shilpi, S., Khare, P., Jain, A., Jain, S. K. (2011) Mannosylated liposomes bearing Amphotericin B for effective management of visceral Leishmaniasis. *J. Liposome Res.* 21(4), 333-340.
- (106) Banerjee, G., Nandi, G., Mahato, S. B., Pakrashi, A., Basu, M. K. (1996) Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 38(1), 145-50.

- (107) Davis, A. J., Murray, H. W., Handman, E. (2004) Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol.* 20(2), 73-76.
- (108) Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., Maes, L. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 106(3), 290-302.
- (109) Brindha, J., Balamurali, M. M., Chanda, K. (2021) An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases-Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Front. Chem.* 12;9, 622286.
- (110) Cavalli, A., Bolognesi, M. L. (2009) Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Med. Chem.* 52(23), 7339-7359.
- (111) Holloway, G. A., Charman, W. N., Fairlamb, A. H., Brun, R., Kaiser, M., Kostewicz, E., Novello, P. M., Parisot, J. P., Richardson, J., Street, I. P., Watson, K. G., Baell, J. B. (2009) Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(7), 2824-2833.
- (112) Walker, R. G., Thomson, G., Malone, K., Nowicki, M. W., Brown, E., Blake, D. G., Turner, N. J., Walkinshaw, M. D., Grant, K. M., Mottram, J. C. (2011) High throughput screens yield small molecule inhibitors of *Leishmania* CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(4), e1033.
- (113) French, J. B., Yates, P. A., Soysa, D. R., Boitz, J. M., Carter, N. S., Chang, B., Ullman, B., Ealick, S. E. (2011) The *Leishmania donovani* UMP synthase is essential for promastigote viability and has an unusual tetrameric structure that exhibits substrate-controlled oligomerization. *J. Biol. Chem.* 286(23), 20930-20941.
- (114) Yadav, S., Kuldeep, J., Siddiqi, M. I., Goyal, N. (2020) TCP1 γ subunit is indispensable for growth and infectivity of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64(8), e00669-20.
- (115) Grewal, J. S., Catta-Preta, C. M. C., Brown, E., Anand, J., Mottram, J. C. (2019) Evaluation of clan CD C11 peptidase PNT1 and other *Leishmania mexicana* cysteine peptidases as potential drug targets. *Biochimie.* 166, 150-160.
- (116) Das, B. B., Ganguly, A., Majumder, H. K. (2008) DNA topoisomerases of *Leishmania*: the potential targets for anti-leishmanial therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 625, 103-115.
- (117) Brannigan, J. A., Smith, B. A., Yu, Z., Brzozowski, A. M., Hodgkinson, M. R., Maroof, A., Price, H. P., Meier, F., Leatherbarrow, R.J., Tate, E. W., Smith, D. F., Wilkinson, A. J. (2010) N-myristoyltransferase from *Leishmania donovani*: structural and functional characterisation of a potential drug target for visceral leishmaniasis. *J. Mol. Biol.* 396(4), 985-999.
- (118) Dinesh, N., Pallerla, D. S., Kaur, P. K., Kishore, B. N., Singh, S. (2014) Exploring *Leishmania donovani* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. *Microb. Pathog.* 66, 14-23.
- (119) Henderson, D. M., Hanson, S., Allen, T., Wilson, K., Coulter-Karis, D. E., Greenberg, M. L., Hershfield, M. S., Ullman, B. (1992) Cloning of the gene encoding *Leishmania donovani* S-

adenosylhomocysteine hydrolase, a potential target for antiparasitic chemotherapy. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53(1-2), 169-183.

(120) Hidalgo-Zarco, F., González-Pazanowska, D. (2001) Trypanosomal dUTPases as potential targets for drug design. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2(4), 389-397.

(121) Raj, S., Saha, G., Sasidharan, S., Dubey, V. K., Saudagar, P. (2019) Biochemical characterization and chemical validation of *Leishmania* MAP Kinase-3 as a potential drug target. *Sci. Rep.* 9(1), 16209.

(122) Bhardwaj, R., Das, M., Singh, S., Chiranjivi, A. K., Prabhu, S. V., Singh, S. K., Dubey, V. K. (2017) Evaluation of CAAX prenyl protease II of *Leishmania donovani* as potential drug target: Infectivity and growth of the parasite is significantly lowered after the gene knockout. *Eur. J. Pharm. Sci.* 102, 156-160.

(123) Padmanabhan, P. K., Mukherjee, A., Singh, S., Chattopadhyaya, S., Gowri, V. S., Myler, P. J., Srinivasan, N., Madhubala, R. (2005) Glyoxalase I from *Leishmania donovani*: a potential target for anti-parasite drug. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337(4), 1237-1248.

(124) Sebastián-Pérez, V., Hendrickx, S., Munday, J. C., Kalejaiye, T., Martínez, A., Campillo, N. E., de Koning, H., Caljon, G., Maes, L., Gil, C. (2018) Cyclic nucleotide-specific phosphodiesterases as potential drug targets for anti-leishmania therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62(10), e00603-18.

(125) Jones, N. G., Catta-Preta, C. M. C., Lima, A. P. C. A., Mottram, J.C. (2018) Genetically validated drug targets in *Leishmania*: current knowledge and future prospects. *ACS Infect. Dis.* 4(4):467-477.

(126) Peniche, A. G., Osorio, Y., Renslo, A. R., Frantz, D. E., Melby, P. C., Travi, B. L. (2014) Development of an *ex vivo* lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(1), 78-87.

(127) Osorio, Y., Travi, B. L., Renslo, A. R., Peniche, A. G., Melby, P. C. (2011) Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel *ex vivo* splenic explant model system. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(2), e962.

(128) Nühs, A., De Rycker, M., Manthri, S., Comer, E., Scherer, C. A., Schreiber, S. L., Ioset, J. R., Gray, D. W. (2015) Development and validation of a novel *Leishmania donovani* screening cascade for high-throughput screening using a novel axenic assay with high predictivity of leishmanicidal intracellular activity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(9), e0004094.

(129) De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., Cameron, S., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., Frearson, J. A., Fairlamb, A. H., Gray, D. W. (2013) Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(7), 2913-2922. Erratum in: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(12), 7622.

- (130) Annang, F., Pérez-Moreno, G., García-Hernández, R., Cordon-Obras, C., Martín, J., Tormo, J. R., Rodríguez, L., de Pedro, N., Gómez-Pérez, V., Valente, M., Reyes, F., Genilloud, O., Vicente, F., Castanys, S., Ruiz-Pérez, L. M., Navarro, M., Gamarro, F., González-Pacanowska, D. (2015) High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease. *J. Biomol Screen.* 20(1), 82-91.
- (131) Siqueira-Neto, J. L., Song, O. R., Oh, H., Sohn, J. H., Yang, G., Nam, J., Jang, J., Cechetto, J., Lee, C. B., Moon, S., Genovesio, A., Chatelain, E., Christophe, T., Freitas-Junior, L. H. (2010) Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(5), e675.
- (132) Sharlow, E. R., Close, D., Shun, T., Leimgruber, S., Reed, R., Mustata, G., Wipf, P., Johnson, J., O'Neil, M., Grögl, M., Magill, A. J., Lazo, J. S. (2009) Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania major* using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(11), e540.
- (133) Mikus, J., Steverding, D. (2000) A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol. Int.* 48(3), 265-269.
- (134) Valiathan, R., Dubey, M. L., Mahajan, R. C., Malla, N. (2006) *Leishmania donovani*: effect of verapamil on *in vitro* susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Exp. Parasitol.* 114(2), 103-108.
- (135) Bodley, A. L., McGarry, M. W., Shapiro, T. A. (1995) Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *J. Infect. Dis.* 172(4), 1157-1159.
- (136) Nolan, L., & Bouchard, B. (2005). A rapid *in vitro* system for screening the effect of experimental compounds on nonadhering cell lines. *Current Microbiology*, 23, 277-279.
- (137) Siqueira-Neto, J. L., Moon, S., Jang, J., Yang, G., Lee, C., Moon, H. K., Chatelain, E., Genovesio, A., Cechetto, J., Freitas-Junior, L. H. (2012) An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(6), e1671.
- (138) Zulfiqar, B., Jones, A. J., Sykes, M. L., Shelper, T. B., Davis, R. A., Avery, V. M. (2017) Screening a natural product-based library against kinetoplastid parasites. *Molecules.* 22(10), 1715.
- (139) De Muylder, G., Ang, K. K., Chen, S., Arkin, M. R., Engel, J. C., McKerrow, J.H. (2011) A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(7), e1253.
- (140) Fumarola, L., Spinelli, R., Brandonisio, O. (2004) *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res. Microbiol.* 155(4), 224-230.
- (141) Callahan, H. L., Portal, A. C., Devereaux, R., Grogl, M. (1997) An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(4), 818-822.

- (142) Sereno, D., Cordeiro da Silva, A., Mathieu-Daude, F., Ouaisi, A. (2007) Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol. Int.* 56(1), 3-7.
- (143) Shimony, O., Jaffe, C. L. (2008) Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. *J. Microbiol. Methods.* 75(2), 196-200.
- (144) Debrabant, A., Joshi, M. B., Pimenta, P. F., Dwyer, D. M. (2004) Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *Int. J. Parasitol.* 34(2), 205-217.
- (145) Somanna, A., Mundodi, V., Gedamu, L. (2002) *In vitro* cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms. *Acta Trop.* 83(1), 37-42.
- (146) Teixeira, M. C., de Jesus, Santos, R., Sampaio, R. B., Pontes-de-Carvalho, L., dos-Santos, W. L. (2002) A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* 88(11), 963-968.
- (147) Doyle, P. S., Engel, J. C., Pimenta, P. F., da Silva, P. P., Dwyer, D. M. (1991) *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37 degrees C. *Exp. Parasitol.* 73(3), 326-334.
- (148) Bates, P. A. (1993) Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol. Today.* 9(4), 143-146.
- (149) Pan, A. A. (1984) *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp. Parasitol.* 58(1), 72-80.
- (150) Gupta, N., Goyal, N., Rastogi, A. K. (2001) *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 17(3), 150-153.
- (151) Holzer, T. R., McMaster, W. R., Forney, J. D. (2006) Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146(2), 198-218.
- (152) Rochette, A., Raymond, F., Corbeil, J., Ouellette, M., Papadopoulou, B. (2009) Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165(1), 32-47.
- (153) Li, Q., Zhao, Y., Ni, B., Yao, C., Zhou, Y., Xu, W., Wang, Z., Qiao, Z. (2008) Comparison of the expression profiles of promastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania donovani* using serial analysis of gene expression. *Parasitol. Res.* 103(4), 821-828.
- (154) Pescher, P., Blisnick, T., Bastin, P., Späth, G. F. (2011) Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cell Microbiol.* 13(7), 978-991.
- (155) Peña, I., Pilar Manzano, M., Cantizani, J., Kessler, A., Alonso-Padilla, J., Bardera A. I., Alvarez, E., Colmenarejo, G., Cotillo, I., Roquero, I., de Dios-Anton, F., Barroso, V., Rodriguez, A., Gray, D. W., Navarro, M., Kumar, V., Sherstnev, A., Drewry, D. H., Brown, J. R., Fiandor, J. M., Julio Martin, J. (2015) New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. *Sci. Rep.* 5, 8771.

- (156) Don, R., Ioset, J. R. (2013) Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. 141(1), 140-146.
- (157) Sereno, D., Lemesre, J. L. (1997) Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(5), 972-976.
- (158) Buckner, F. S., Wilson, A. J. (2005) Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania amastigotes* grown in macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(5), 600-605.
- (159) Pérez-Cordero, J. J., Lozano, J. M., Cortés, J., Delgado, G. (2011) Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides*. 32(4), 683-690.
- (160) Khare, S., Nagle, A. S., Biggart, A., Lai, Y. H., Liang, F., Davis, L. C., Barnes, S. W., Mathison, C. J., Myburgh, E., Gao, M. Y., Gillespie, J. R., Liu, X., Tan, J. L., Stinson, M., Rivera, I. C., Ballard, J., Yeh, V., Groessl, T., Federe, G., Koh, H. X., Venable, J. D., Bursulaya, B., Shapiro, M., Mishra, P. K., Spraggon, G., Brock, A., Mottram, J. C., Buckner, F. S., Rao, S. P., Wen, B. G., Walker, J. R., Tuntland, T., Molteni, V., Glynne, R. J., Supek, F. (2016) Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*. 537(7619), 229-233.
- (161) Kima, P. E. (2007) The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int. J. Parasitol.* 37(10), 1087-1096.
- (162) Tegazzini, D., Díaz, R., Aguilar, F., Peña, I., Presa, J. L., Yardley, V., Martin, J. J., Coteron, J. M., Croft, S. L., Cantizani, J. (2016) A replicative *in vitro* assay for drug discovery against *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(6), 3524-3532.
- (163) Cardoso Santos, C., Meuser Batista, M., Inam Ullah, A., Rama Krishna Reddy, T., Soeiro M. N. C. (2021) Drug screening using shape-based virtual screening and *in vitro* experimental models of cutaneous Leishmaniasis. *Parasitology*. 148(1), 98-104.
- (164) Bruno de Sousa, C., Gangadhar, K. N., Morais, T. R., Conserva, G. A., Vizetto-Duarte, C., Pereira, H., Laurenti, M. D., Campino, L., Levy, D., Uemi, M., Barreira, L., Custódio, L., Passero, L. F., Lago, J. H., Varela, J. (2017) Antileishmanial activity of meroditerpenoids from the macroalgae *Cystoseira baccata*. *Exp. Parasitol.* 174, 1-9.
- (165) Tadele, M., Abay, S. M., Makonnen, E., Hailu, A. (2020) *Leishmania donovani* growth inhibitors from Pathogen Box compounds of Medicine for Malaria Venture. *Drug Des. Devel. Ther.* 14, 1307-1317.
- (166) Lamotte, S., Aulner, N., Späth, G. F., Prina, E. (2019) Discovery of novel hit compounds with broad activity against visceral and cutaneous *Leishmania* species by comparative phenotypic screening. *Sci. Rep.* 9(1), 438.
- (167) Ayotte, Y., Bilodeau, F., Descoteaux, A., LaPlante, S. R. (2018) Fragment-Based Phenotypic Lead Discovery: Cell-Based Assay to Target Leishmaniasis. *ChemMedChem*. 13(14), 1377-1386.
- (168) Aulner, N., Danckaert, A., Rouault-Hardoin, E., Desrivot, J., Helynck, O., Commere, P. H., Munier-Lehmann, H., Späth, G. F., Shorte, S. L., Milon, G., Prina, E. (2013) High content analysis of

primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(4), e2154.

(169) Eren, R. O., Kopelyanskiy, D., Moreau, D., Chapalay, J. B., Chambon, M., Turcatti, G., Lye, L. F., Beverley, S. M., Fasel, N. (2018) Development of a semi-automated image-based high-throughput drug screening system. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 10, 242-253.

(170) Berman, J. D., Lee, L. S. (1984) Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. *J. Parasitol.* 170(2), 220-225.

(171) Taylor, V. M., Muñoz, D. L., Cedeño, D. L., Vélez, I. D., Jones, M. A., Robledo, S.M. (2010) *Leishmania tarentolae*: utility as an *in vitro* model for screening of antileishmanial agents. *Exp. Parasitol.* 126(4), 471-475.

(172) Ochoa, R., García, E., Robledo, S. M., Cardona, G. W. (2019) Virtual and experimental screening of phenylfuranalcones as potential anti-*Leishmania* candidates. *J. Mol. Graph Model.* 91, 164-171.

(173) Seifert, K., Escobar, P., Croft, S. L. (2010) *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J. Antimicrob Chemother.* 65(3), 508-511.

(174) Maia, C., Rolão, N., Nunes, M., Gonçalves, L., Campino, L. (2007) Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 103(2), 150-155.

(175) Calvo-Álvarez, E., Stamatakis, K., Punzón, C., Álvarez-Velilla, R., Tejería, A., Escudero-Martínez, J. M., Pérez-Pertejo, Y., Fresno, M., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2015) Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(3), e0003666.

(176) Lang, T., Goyard, S., Lebastard, M., Milon, G. (2005) Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol.* 7(3), 383-392.

(177) Forestier, C. L., Späth, G. F., Prina, E., Dasari, S. (2015) Simultaneous multi-parametric analysis of *Leishmania* and of its hosting mammal cells: A high content imaging-based method enabling sound drug discovery process. *Microb. Pathog.* 88, 103-108.

(178) Intakhan, N., Chanmol, W., Somboon, P., Bates, M. D., Yardley, V., Bates, P. A., Jariyapan, N. (2020) Antileishmanial activity and synergistic effects of amphotericin B deoxycholate with allicin and andrographolide against *Leishmania martiniquensis* *in vitro*. *Pathogens.* 9(1), 49.

(179) St George, S., Bishop, J. V., Titus, R. G., Selitrennikoff, C. P. (2006) Novel compounds active against *Leishmania major*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(2), 474-479.

(180) Mandal, S., Maharjan, M., Ganguly, S., Chatterjee, M., Singh, S., Buckner, F. S., Madhubala, R. (2009) High-throughput screening of amastigotes of *Leishmania donovani* clinical isolates against drugs using a colorimetric beta-lactamase assay. *Indian J. Exp. Biol.* 47(6), 475-479.

- (181) Gupta, S.; Nishi. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J. Med. Res.* 133(1), 27-39.
- (182) Álvarez-Velilla, R., Gutiérrez-Corbo, M. D. C., Punzón, C., Pérez-Pertejo, M. Y., Balaña-Fouce, R., Fresno, M., Reguera, R.M. (2019) A chronic bioluminescent model of experimental visceral leishmaniasis for accelerating drug discovery. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13(2), e0007133.
- (183) Saini, S., Rai, A. K. (2020) Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: Opportunities and challenges. *Parasite Immunol.* 42(10), e12768.
- (184) Mears, E. R., Modabber, F., Don, R., Johnson, G. E. (2015) A Review: The current *in vivo* models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015 9(9), e0003889.
- (185) Reimão, J. Q., Oliveira, J.C., Trinconi, C.T., Cotrim, P. C., Coelho, A. C., Uliana, S. R. (2015) Generation of luciferase-expressing *Leishmania infantum* chagasi and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioimaging. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(2), e0003556.
- (186) Loeuillet, C., Bañuls, A. L., Hide, M. (2016) Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit. Vectors.* 9, 144.
- (187) Rouault, E., Lecoœur, H., Meriem, A. B., Minoprio, P., Goyard, S., Lang, T. (2017) Imaging visceral leishmaniasis in real time with golden hamster model: Monitoring the parasite burden and hamster transcripts to further characterize the immunological responses of the host. *Parasitol. Int.* 66(1), 933-939.
- (188) Ato, M., Stäger, S., Engwerda, C. R., Kaye, P. M. (2002) Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat. Immunol.* 3(12), 1185-1191.
- (189) Engwerda, C. R., Ato, M., Cotterell, S. E., Mynott, T. L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P. M., Kaye, P. M. (2002) A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am. J. Pathol.* 161(2), 429-37.
- (190) Smelt, S. C., Engwerda, C. R., McCrossen, M., Kaye, P. M. (1997) Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 158(8), 3813-3821.
- (191) Joshi, T., Rodriguez, S., Perovic, V., Cockburn, I. A., Stäger, S. (2009) B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog.* 5(5), e1000431.
- (192) Sacks, D. L., Melby, P. C. (2001) Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr. Protoc. Immunol.* 19.
- (193) Masic, A., Valencia Hernandez, A. M., Hazra, S., Glaser, J., Holzgrabe, U., Hazra, B., Schurig, U. (2015) Cinnamic acid bornyl ester derivatives from *Valeriana wallichii* exhibit antileishmanial *in vivo* activity in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *PLoS One.* 10(11), e0142386.

- (194) Metwally, D. M., Al-Olayan, E. M., El-Khadragy, M. F., Alkathiri, B. (2016) Anti-leishmanial activity (*in vitro* and *in vivo*) of allicin and allicin cream using *Leishmania major* (sub-strain Zymowme LON4) and Balb/c Mice. *PLoS One*. 11(8), e0161296.
- (195) DeKrey, G. K., Lima, H. C., Titus, R. G. (1998) Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* 66(2), 827-829.
- (196) Gomes-Silva, A., Valverde, J. G., Ribeiro-Romão, R. P., Plácido-Pereira, R. M., Da-Cruz, A.M. (2013) Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*. 140(6), 771-779.
- (197) Melo, G. D., Goyard, S., Lecoœur, H., Rouault, E., Pescher, P., Fiette, L., Boissonnas, A., Minoprio, P., Lang, T. (2017) New insights into experimental visceral leishmaniasis: real-time *in vivo* imaging of *Leishmania donovani* virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(9), e0005924.
- (198) Lang, T., Lecoœur, H., Prina, E. (2009) Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol.* 25(10), 464-473.
- (199) Millington, O. R., Myburgh, E., Mottram, J. C., Alexander, J. (2010) Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 126(3), 310-317.
- (200) Melo, G. D., Goyard, S., Fiette, L., Boissonnas, A., Combadiere, C., Machado, G. F., Minoprio, P., Lang, T. (2017) Unveiling cerebral leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. *Sci. Rep.* 7(1), 8454.
- (201) Avci, P., Karimi, M., Sadasivam, M., Antunes-Melo, W. C., Carrasco, E., Hamblin, M. R. (2018) *In-vivo* monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. *Virulence*. 9(1), 28-63.
- (202) Calvo-Álvarez, E., Guerrero, N. A., Alvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Requena, J. M., Punzón, C., Llamas, M. Á., Arévalo, F. J., Rivas, L., Fresno, M., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2012) 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.* 6(11), e1927.
- (203) Viviani, V. R., Gabriel, G. V. M., Bevilaqua, V. R., Simões, A. F., Hirano, T., Lopes-de-Oliveira, P.S. (2018) The proton and metal binding sites responsible for the pH-dependent green-red bioluminescence color tuning in firefly luciferases. *Sci Rep.* 8(1), 17594.

OBJETIVOS

- I. Desarrollar y validar un sistema de imagen *in vivo* que permita llevar a cabo el seguimiento en tiempo real de la infección para evaluar la actividad antiparasitaria de compuestos, en animales infectados con una cepa de *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3) modificada genéticamente para que exprese la proteína bioluminiscente PpyRE9h.
- II. Evaluar *in vitro* la actividad leishmanicida de 1769 compuestos sintéticos procedentes de las librerías Anti-Infection Compound (MedChemExpress) y Prestwick Chemical, utilizando un método de cribado de alto rendimiento (HTS) basado en explantes esplénicos *ex vivo* obtenidos de ratones Balb/c infectados con *L. infantum* modificada genéticamente para que exprese la proteína fluorescente iRFP.
- III. Evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de los compuestos con actividad leishmanicida y un índice selectivo alto identificados en el Objetivo II, y cuyas propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas estén disponibles en bases bibliométricas. Para ello se propone usar tanto el modelo murino de LV crónica desarrollado en el Objetivo I como un modelo de LC.
- IV. Caracterizar, optimizar y validar el uso de nanopartículas de poliglicerol decoradas con manosa (sintetizadas por el grupo del Dr. Marcelo Calderón de la Universidad del País Vasco (UPV)) como vehículo de fármacos leishmanicidas en infecciones *in vitro*.

ARTÍCULO 1

Bioluminescent imaging identifies thymus, as overlooked colonized organ, in a chronic model of *Leishmania donovani* mouse visceral leishmaniasis

Bárbara Domínguez-Asenjo¹, Camino Gutiérrez-Corbo¹, Yolanda Pérez-Pertejo¹, Salvador Iborra², Rafael Balaña-Fouce^{1*}, Rosa M. Reguera^{1*}

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

¹Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of León, 24071 León, Spain.

²Department of Immunology, Ophthalmology and ENT. Complutense University School of Medicine and 12 de Octubre Health Research Institute (imas12), 28040 Madrid, Spain.

* Corresponding authors

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.

ARTÍCULO 2

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*, Rosa M Reguera^{1*}

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

Department of Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of León, 24071 León, Spain.

* Corresponding authors: These authors contributed equally

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 nitrofurantoin, 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 intralésional 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.

ARTÍCULO 3

Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to *Leishmania infantum*-infected macrophages

Laura I. Vossen ^{1†}, **Bárbara Domínguez-Asenjo** ^{2†}, Camino Gutiérrez-Corbo², M. Yolanda Pérez-Pertejo², Rafael Balaña-Fouce², 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.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100915>

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.

DISCUSIÓN GENERAL

El reducido arsenal terapéutico en el que se basa el tratamiento de la leishmaniasis debe de ser reemplazado con urgencia, ya que los fármacos que actualmente lo conforman poseen graves limitaciones (elevada toxicidad, baja eficacia, administración parenteral, alto coste de producción), que dificultan la adherencia al tratamiento y obligan a la hospitalización del paciente ^{1,2}. Aunque el desarrollo de nuevos fármacos activos frente a *Leishmania* spp. ha tenido un importante impulso en los últimos años, la baja predictibilidad de los métodos empleados en los cribados *in vitro* ha provocado que el porcentaje de compuestos descubiertos sea inferior al esperado. Así, por ejemplo, el cribado de una reducida librería de fármacos aprobados como es la librería Prestwick (aproximadamente 1000 compuestos) frente a *L. guayanensis* solo identificó dos compuestos con actividad leishmanicida; disulfiram y antimicina A ³. El incremento del número de compuestos a analizar tampoco ha supuesto una mejora significativa, ya que campañas que han partido de 600.000 compuestos, tras llevar a cabo ensayos en promastigotes e infecciones *in vitro*, apenas seleccionaron siete nuevos compuestos con actividad leishmanicida. Dos de estos compuestos fueron evaluados *in vivo* y a pesar de su elevada potencia y sus buenas características farmacocinéticas no fueron eficaces frente a un modelo murino de LC ⁴.

A raíz de estos resultados, los esfuerzos se han centrado mayoritariamente en identificar nuevas series químicas con actividad antiparasitaria moderada para su posterior optimización ⁵. Desafortunadamente, este enfoque conlleva una alta tasa de abandono y largas campañas de optimización que en la mayoría de las ocasiones no obtienen compuestos activos *in vivo* ⁶. Con el objetivo de acelerar el descubrimiento de nuevos fármacos frente a este parásito hemos desarrollado una estrategia alternativa basada en: I) el cribado fenotípico de compuestos en un sistema que utiliza explantes esplénicos de ratones infectados y II) la evaluación de la eficacia *in vivo* de los compuestos seleccionados en un modelo murino de LC y mediante imagen en tiempo real en un modelo murino de LV.

Primeramente y con el fin de desarrollar un modelo animal que nos permitiera evaluar sencilla y rápidamente la eficacia *in vivo* de un compuesto frente a la LV crónica, desarrollamos y validamos un modelo animal basado en la infección de ratones Balb/c con promastigotes metacíclicos de la cepa *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3), modificada genéticamente para que exprese la luciferasa PpyRE9h ⁷.

Las infecciones de ratones Balb/c aunque no son el modelo ideal para recrear la

LV humana dado que la mayoría de los parásitos en hígado son eliminados mediante una respuesta inflamatoria granulomatosa semejante a la observada en pacientes asintomáticos y por tanto es considerado como un modelo de LV subclínica, a altas dosis infectivas, en el bazo, la infección crónica provocando daño tisular y alteraciones inmunológicas similares a las halladas en pacientes de LV⁸⁻¹¹.

El uso de parásitos bioluminiscentes nos ha permitido estudiar longitudinalmente e individualmente la evolución de la infección sin necesidad de sacrificar animales reduciendo significativamente el tiempo y el número de estos. También hemos podido obtener una imagen completa en tiempo real de la infección, que nos ha permitido identificar la inesperada colonización del timo por *L. donovani*⁷. Como era de esperar, dado que la corteza del timo está aislada del torrente sanguíneo por la barrera hematotímica¹², los amastigotes de *L. donovani* fueron localizados en la médula⁷. El parásito ha podido llegar al timo de dos formas directamente desde la circulación (infección directa) o en el interior de células infectadas en la médula ósea (caballo de Troya)¹³.

Una vez desarrollado y validado el modelo animal, llevamos a cabo el cribado *ex vivo* de 1769 compuestos, procedentes de dos librerías de compuestos aprobados mayoritariamente por la EMA y la FDA (Anti-Infection Compound Library (MedChemExpress) y Prestwick Chemical Library), en explantes esplénicos de ratones Balb/c infectados con *L. infantum*¹⁴. Como hemos comentado anteriormente, el bazo de un ratón Balb/c recrea la forma crónica de la LV humana, por lo que los explantes esplénicos murinos reproducen mucho mejor las condiciones observadas en una infección natural que los macrófagos primarios infectados *in vitro*. El explante, a diferencia de las infecciones *in vitro*, contiene el repertorio celular completo, incluyendo no solo a los macrófagos sino a otras células del sistema inmune como células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T y B, fibroblastos etc. Además, dichas células están sometidas a la manipulación y depresión inmune que el parásito ejerce sobre el hospedador. Es decir, el modelo de cribado fenotípico basado en explantes esplénicos no solo es un modelo más próximo a la infección natural, sino que permite identificar compuestos con actividad frente a *Leishmania* spp. dentro del ambiente inmunopatológico de un hospedador que ha estado infectado durante semanas^{15,16}. La respuesta inmune del hospedador influye enormemente en la eficacia de los compuestos, por ejemplo, los antimoniales pentavalentes requieren de la participación de las células T del hospedador para resolver la infección. En ausencia de esta respuesta, como puede

sucedir por ejemplo en pacientes inmunocomprometidos, los antimoniales pentavalentes no son capaces de eliminar al parásito ¹⁷⁻¹⁹.

Nuestro sistema después de dos rondas selectivas a 10 y 1 μM respectivamente detectó compuestos ¹⁴ que habían pasado desapercibidos en un modelo clásico donde macrófagos diferenciados desde médula ósea fueron infectados con parásitos ³, si bien es cierto que las *Leishmania* spp. utilizadas en ambos estudios no fue coincidente.

Gracias a que en el reposicionamiento de fármacos los perfiles farmacocinéticos están disponibles, fácil y rápidamente pudimos salvar la brecha entre los ensayos *in vitro* y los ensayos *in vivo* y seleccionar aquellos compuestos que presentaron un buen índice selectivo y propiedades farmacocinéticas adecuadas para su evaluación *in vivo* ^{20,21}. Finalmente se seleccionaron y testaron 4 compuestos frente al modelo de LV crónica: salinomicina (SAL), docetaxel (DXT), paclitaxel (PXT) y nifuratel (NFT).

La administración por vía oral de 50 mg/kg de NFT dos veces al día durante 10 días consiguió eliminar casi el 90% de la carga parasitaria en el bazo, el 97% en timo y casi un 70% en hígado en el modelo de LV. Sin embargo, la administración intralesional del NFT en el modelo de LC produjo la cura parasitológica, tanto en el sitio de la lesión como en el ganglio que la drena, apuntando a la baja biodisponibilidad del NFT en el hígado y en el bazo como la causa de la no erradicación del parásito en estos órganos ¹⁴.

Aunque durante muchos años, los compuestos heterocíclicos, como el NFT, fueron excluidos de los programas de descubrimiento de fármacos por sus posibles efectos mutagénicos y carcinogénicos, recientemente las compañías farmacéuticas les han vuelto a incorporar con gran éxito ^{22,23}. En el caso del NFT, su seguridad está ampliamente avalada por su uso durante más de 30 años, bajo el nombre comercial de Macmiror e Inimur, en el tratamiento de infecciones genitourinarias producidas por *Trichomana vaginales* y *Neisseria gonorrhoeae* ^{24,25}. A diferencia de otros fármacos, no se han descrito fenómenos de resistencias al NFT y su administración a mujeres embarazadas no ha mostrado efectos teratogénicos ²⁶⁻³⁰. Su ya conocida trayectoria como antiprotozoario junto con sus buenos resultados *in vitro* e *in vivo*, sitúan al NFT como una alternativa prometedora para el tratamiento de la LV por vía oral y el de la LC por vía intralesional ¹⁴.

Ante los múltiples fracasos en el desarrollo de fármacos frente a esta enfermedad,

otra aproximación que se ha planteado es la encapsulación de aquellos fármacos con baja biodisponibilidad o efectos secundarios en nanopartículas, como es el caso del AmBiosome®. La nanoencapsulación permite solventar estas limitaciones y mejorar la eficacia y seguridad *in vivo* ³¹⁻³³.

Existen muchos tipos de nanotransportadores, nosotros hemos elegido una nanopartícula de poliglicerol (PG) unido a polietilenglicol (PEG) para mejorar su biodisponibilidad ³⁶. La infección por *Leishmania* spp. promueve la polarización de los macrófagos al fenotipo M2, caracterizado por la expresión en superficie de receptores de lectina tipo C como Dectin-1, el receptor de manosa o CD206 y SIGNR3 ³⁴. Además, en monocitos y macrófagos aislados de lesiones de pacientes con leishmaniasis dérmica post kala-azar se observó un fenotipo M2 con una mayor expresión de CD206 y arginasa-1 ³⁵. Por todo ello, nos planteamos si al decorar la superficie de la nanopartícula de PG-PEG con moléculas de manosa, esta sería internalizada mayoritariamente por los macrófagos infectados por *Leishmania* spp. Los resultados obtenidos en cultivos celulares de macrófagos diferenciados desde médula ósea indican que efectivamente la mayoría de las nanopartículas son endocitadas preferentemente por los macrófagos infectados mientras que los no infectados rara vez acumulan algún conjugado en su interior ³⁷. Finalmente, también se demostró que esta nanopartícula, al igual que su predecesora ³⁸, es capaz de alcanzar al amastigote en la vacuola parasitófora, donde específicamente se dan las condiciones necesarias (pH 4) para que el fármaco se libere y ejerza su acción ³⁷.

Además de los trabajos publicados, se ha continuado con una nueva línea de investigación que estudia las posibles consecuencias de la colonización del timo por *L. donovani*.

El timo es el órgano central que recibe a los precursores hematopoyéticos procedentes de la médula ósea e induce tolerancia central por delección clonal positiva y negativa de timocitos autorreactivos, sobreviviendo solo aquellos capaces de reconocer células del propio individuo ^{13,39}.

La infección del timo por diferentes patógenos puede provocar: I) una atrofia prematura ^{13,40}, II) cambios en su estructura que alteran su funcionamiento, provocando la liberación de células T inmaduras, como sucede en las infecciones causadas por *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma cruzi* y VIH, o la liberación de células T autorreactivas, como ocurre en la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) ^{13,41-44} y III) el desarrollo de células T que toleran

específicamente al patógeno, como se ha observado en las infecciones por *Mycobacterium avium* ^{13, 45}.

En primer lugar, analizamos la celularidad del timo a lo largo de cuatro semanas de infección. Para ello, el número total de timocitos fue determinado microscópicamente en las suspensiones celulares obtenidas tras homogeneizar el timo a través de una malla de 100 µm de tamaño de poro. Como se muestra en la Figura 1, no hubo un cambio significativo en el número de timocitos a lo largo de la fase aguda de la infección.

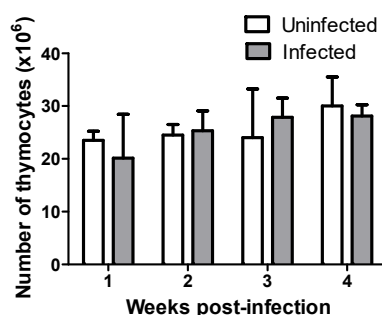


Figura 1. La infección del timo por *L. donovani* no provoca una atrofia prematura. Número de timocitos en animales infectados y no infectados a diferentes tiempos post-infección. Cada barra representa la media ± SD del número.

A continuación, estudiamos las distintas fases del proceso de maduración de los timocitos (Figura 2A). Para ello las células fueron marcadas con los siguientes anticuerpos de la compañía Miltenyi Biotec: anti-CD45-FITC (130-110-796), anti-CD3-APC (130-122-943), anti-CD4-PerCP-Vio700 (130-118-852), anti-CD8-Vioblue (130-111-716), anti-CD44-APC-Vio770 (130-118-695), anti-CD25-PE (130-120-766) y analizadas por citometría de flujo. Curiosamente, observamos que el porcentaje de timocitos DN4, pero no de DN1, DN2 o DN3, aumento en la primera semana de infección por *L. donovani* y que volvió a niveles semejantes a los observados en los animales no infectados desde la segunda semana post-infección hasta el último tiempo analizado (semana 4 post-infección) (Figura 2B). Esto sugiere una alteración muy temprana pero puntual de la diferenciación de los timocitos causada por la presencia de parásitos (detectados desde la primera semana de infección). Además, se observó un incremento de los timocitos positivos solo a CD8 (CD8SP) en la primera semana de infección, que al igual que el porcentaje de DN4, volvió a niveles semejantes a los de los animales no infectados en las siguientes semanas (Figura 2B). Este incremento posiblemente se corresponde con un intento fallido por parte del hospedador de eliminar al parásito,

ya que, a diferencia de lo que sucede en las infecciones por *Salmonella*⁴⁶, la infección por *Leishmania* spp. crónica en el timo y solo se observó una ligera bajada no significativa de la carga parasitaria en la tercera semana postinfección⁷. Por el contrario, los timocitos positivos solo a CD4 (CD4SP) no sufrieron ningún cambio significativo a lo largo de las cuatro primeras semanas de infección (Figura 2B).

En resumen, estos resultados muestran que la infección por *L. donovani*, no causa una atrofia prematura del timo ni altera el proceso de diferenciación de los timocitos, al igual que sucede en las infecciones por *M. tuberculosis* y *M. avium*^{13,45}.

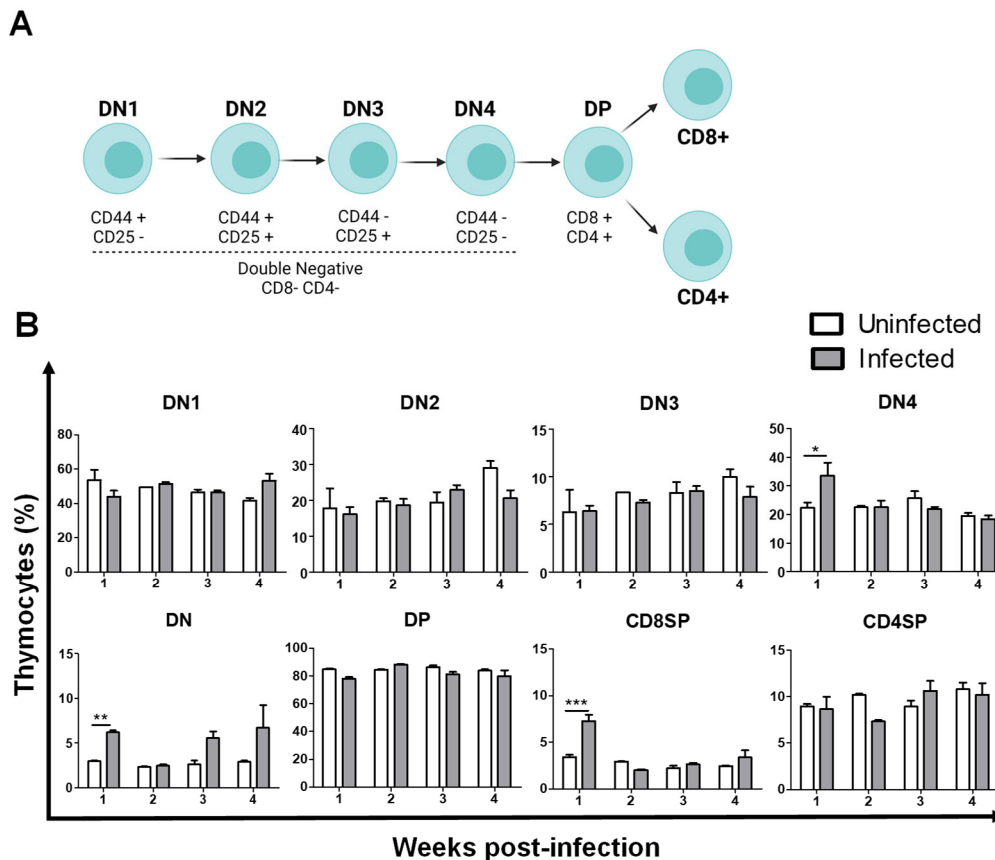


Figura 2. La infección del timo por *L. donovani* no altera el proceso de diferenciación de los timocitos. (A) Esquema de los distintos marcadores de superficie expresados en las diferentes fases de la maduración de los timocitos. Imagen creada con BioRender.com. (B) Porcentaje de las principales poblaciones de timocitos (basados en la expresión de CD4, CD8, CD25 y CD44) en animales infectados y no infectados a diferentes tiempos post-infección. Cada barra representa la media \pm SD del número. (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Los timocitos se marcaron con anticuerpos específicos frente a CD45 (130-110-796), CD3(130-122-943), CD4(130-118-852), CD8(130-111-716), CD44(130-118-695) y CD25(130-120-766) de la compañía Miltenyi Biotec. La adquisición de células fue llevada a cabo en el citómetro de flujo Cytex® Aurora. Los datos se analizaron con el software SpectroFlo®.

Referencias

- (1) Sasidharan, S., Saudagar, P. (2021) Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitol. Res.* 120(5), 1541-1554.
- (2) Grifferty, G., Shirley, H., McGloin, J., Kahn, J., Orriols, A., Wamai, R. (2021) Vulnerabilities to and the socioeconomic and psychosocial impacts of the leishmaniasis: A Review. *Res. Rep. Trop. Med.* 12, 135-151.
- (3) Eren, R. O., Kopelyanskiy, D., Moreau, D., Chapalay, J. B., Chambon, M., Turcatti, G., Lye, L. F., Beverley, S. M., Fasel, N. (2018) Development of a semi-automated image-based high-throughput drug screening system. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 10, 242-253.
- (4) Ortiz, D., Guiguemde, W. A., Hammill, J. T., Carrillo, A. K., Chen, Y., Connelly, M., Stalheim, K., Elya, C., Johnson, A., Min, J., Shelat, A., Smithson, D. C., Yang, L., Zhu, F., Guy, R. K., Landfear, S. M. (2017) Discovery of novel, orally bioavailable, antileishmanial compounds using phenotypic screening. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(12), e0006157.
- (5) Ferreira, R. A. A., Junior, C. O.R., Martinez, P. D.G., Koovits, P. J., Soares, B. M., Ferreira, L. L. G., Michelin-Duarte, S., Chelucci, R. C., Andricopulo, A. D., Galuppo, M. K., Uliana, S. R. B., Matheussen, A., Caljon, G., Maes, L., Campbell, S., Kratz, J. M., Mowbray, C. E., Dias, L. C. (2021) 2-aminobenzimidazoles for leishmaniasis: from initial hit discovery to *in vivo* profiling. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15(2), e0009196.
- (6) Katsuno, K., Burrows, J. N., Duncan, K., Hooft van Huijsduijnen, R., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C. E., Schmatz, D., Warner, P., Slingsby, B. T. (2015) Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14(11), 751-758.
- (7) Domínguez-Asenjo, B., Gutiérrez-Corbo, C., Pérez-Pertejo, Y., Iborra, S., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2021) Bioluminescent imaging identifies thymus, as overlooked colonized organ, in a chronic model of *Leishmania donovani* mouse visceral leishmaniasis. *ACS Infect. Dis.* 7(4), 871-883.
- (8) Murray, H. W. (2001) Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 82(5), 249-267.
- (9) Engwerda, C. R., Ato, M., Cotterell, S. E., Mynott, T. L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P. M., Kaye, P. M. (2002) A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am. J. Pathol.* 161(2), 429-437.
- (10) Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., and Engwerda, C. R. (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol. Rev.* 201, 239-253.
- (11) Mukherjee, P., Ghosh, A. K., Ghose, A. C. (2003) Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. *Immunol. Lett.* 86(2):131-138.

- (12) Raviola, E., and Karnovsky, M. J. (1972) Evidence for a blood thymus barrier using electron-opaque tracers. *J. Exp. Med.* 136, 466–498.
- (13) Nunes-Alves, C., Nobrega, C., Behar, S. M., Correia-Neves, M. (2013) Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunol.* 34(10), 502-510.
- (14) Domínguez-Asenjo, B., Gutiérrez-Corbo, C., Álvarez-Bardón, M., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2021) *Ex vivo* phenotypic screening of two small repurposing drug collections identifies nifuratel as a potential new treatment against visceral and cutaneous leishmaniasis. *ACS Infect. Dis.* 7(8):2390-2401.
- (15) Osorio, Y., Travi, B. L., Renslo, A. R., Peniche, A. G., Melby, P. C. (2011) Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel *ex vivo* splenic explant model system. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(2), e962.
- (16) Calvo-Álvarez, E., Stamatakis, K., Punzón, C., Álvarez-Velilla, R., Tejería, A., Escudero-Martínez, J. M., Pérez-Pertejo, Y., Fresno, M., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. (2015) Infrared fluorescent imaging as a potent tool for *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(3), e0003666.
- (17) Murray, H. W., Oca, M. J., Granger, A. M., Schreiber, R. D. (1989) Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. Experimental visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 83(4), 1253-1257.
- (18) Murray, H. W., Granger, A. M., Mohanty, S. K. (1991) Response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis: T cell-dependent but interferon-gamma- and interleukin-2-independent. *J. Infect. Dis.* 163(3), 622-624.
- (19) Haldar, A. K., Sen, P., Roy, S. (2011) Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol. Biol. Int.* 2011, 571242.
- (20) Li, C., Liu, B., Chang, J., Groessl, T., Zimmerman, M., He, Y. Q., Isbell, J., Tuntland, T. (2013) A modern *in vivo* pharmacokinetic paradigm: combining snapshot, rapid and full PK approaches to optimize and expedite early drug discovery. *Drug Discov. Today.* 18(1-2), 71-78.
- (21) Charlton, R. L., Rossi-Bergmann, B., Denny, P. W., Steel, P.G. (2018) Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology.* 145(2), 219-236.
- (22) Wyllie, S., Roberts, A. J., Norval, S., Patterson, S., Foth, B. J., Berriman, M., Read, K. D., and Fairlamb, A. H. (2016) Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in *Leishmania*. *PLoS Pathog.* 12, e1005971.
- (23) Patterson, S., and Wyllie, S. (2014) Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* 30, 289–298.
- (24) Fowler, W., and Hussain, M. (1968) Nifuratel (Magmilor) in trichomonal vaginitis. *Br. J. Vener. Dis.* 44, 331–333.

- (25) Churcher, G. M., and Evans, A. J. (1969) Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by nifuratel. *Br. J. Vener. Dis.* 45, 149–150.
- (26) Mendling, W., and Mailland, F. (2002) Microbiological and pharmaco-toxicological profile of nifuratel and its favourable risk/benefit ratio for the treatment of vulvo-vaginal infections. A review. *Arzneim. Forsch.* 52, 8–13.
- (27) Sundar, S., and Chakravarty, J. (2015) An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 237–252.
- (28) Sundar, S., and Singh, A. (2018) Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. *Parasitology* 145, 481–489.
- (29) Dorlo, T. P., Rijal, S., Ostyn, B., de Vries, P. J., Singh, R., Bhattarai, N., Uranw, S., Dujardin, J. C., Boelaert, M., Beijnen, J. H., and Huitema, A. D. (2014) Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. *J. Infect. Dis.* 210, 146–153.
- (30) Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., and Singh, S. (2017) Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites Vectors* 10, 49.
- (31) Saleem, K., Khursheed, Z., Hano, C., Anjum, I., Anjum, S. (2019) Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recent advances and challenges. *Nanomaterials (Basel)*.9(12), 1749.
- (32) Prasanna, P., Kumar, P., Kumar, S., Rajana, V. K., Kant, V., Prasad, S. R., Mohan, U., Ravichandiran, V., Mandal, D. (2021) Current status of nanoscale drug delivery and the future of nano-vaccine development for leishmaniasis - A review. *Biomed. Pharmacother.* 141, 111920.
- (33) Varma, D. M., Redding, E. A., Bachelder, E. M., Ainslie, K. M. (2021) Nano- and microformulations to advance therapies for visceral leishmaniasis. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7(5), 1725-1741.
- (34) Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olgarnier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J. L., Auwerx, J., Neyrolles, O., Pipy, B., Coste, A. (2013) The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity.* 38(5), 1038-1049.
- (35) Mukhopadhyay, D., Mukherjee, S., Roy, S., Dalton, J. E., Kundu, S., Sarkar, A., Das, N. K., Kaye, P. M., Chatterjee, M. (2015) M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(10), e0004145.
- (36) Owens, D. E., Peppas, N.A. (2006) Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307(1), 93-102.
- (37) Vossen, L. I., Domínguez-Asenjo, B., Gutiérrez-Corbo, C., Pérez-Pertejo, M. Y., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Calderón, M. (2020) Mannose-decorated dendritic polyglycerol nanocarriers drive antiparasitic drugs to *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Pharmaceutics.* 12(10), 915.
- (38) Gutierrez-Corbo, C., Dominguez-Asenjo, B., Vossen, L. I., Pérez-Pertejo, Y., Muñoz-Fenández, M. A., Balaña-Fouce, R., Calderón, M., Reguera, R. M. (2017) PEGylated dendritic polyglycerol

conjugate delivers doxorubicin to the parasitophorous vacuole in *Leishmania infantum* infections. *Macromol. Biosci.* 17(10).

(39) Nobrega, C., Nunes-Alves, C., Cerqueira-Rodrigues, B., Roque, S., Barreira-Silva, P., Behar, S. M., Correia-Neves, M. (2013) T cells home to the thymus and control infection. *J. Immunol.* 190(4), 1646-1658.

(40) Luo, M., Xu, L., Qian, Z., Sun, X. (2021) Infection-associated thymic atrophy. *Front. Immunol.* 12:652538.

(41) Elsaesser, H. J., Mohtashami, M., Osokine, I., Snell, L. M., Cunningham, C. R., Boukhaled, G. M., McGavern, D. B., Zúñiga-Pflücker, J. C., Brooks, D. G. (2020) Chronic virus infection drives CD8 T cell-mediated thymic destruction and impaired negative selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 117(10), 5420-5429.

(42) Carbajosa, S., Gea, S., Chillón-Marinas, C., Poveda, C., Del Carmen Maza, M., Fresno, M., Gironès, N. (2017) Altered bone marrow lymphopoiesis and interleukin-6-dependent inhibition of thymocyte differentiation contribute to thymic atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection. *Oncotarget.* 8(11), 17551-17561.

(43) Francelin, C., Paulino, L. C., Gameiro, J., Verinaud, L. (2011) Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4(+) CD8(+) thymocytes in experimentally infected mice. *Immunobiology.* 216(10),1148-1154.

(44) Weiss, L., Roux, A., Garcia, S., Demouchy, C., Haeffner-Cavaillon, N., Kazatchkine, M. D., Gougeon, M. L. (1998) Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* 178(4), 1158-1162.

(45) Nobrega, C., Roque, S., Nunes-Alves, C., Coelho, A., Medeiros, I., Castro, A. G., Appelberg, R., Correia-Neves, M. (2010) Dissemination of Mycobacteria to the thymus renders newly generated T cells tolerant to the invading pathogen. *J. Immunol.* 184(1), 351-358.

(46) Ross, E. A., Coughlan, R. E., Flores-Langarica, A., Lax, S., Nicholson, J., Desanti, G. E., Marshall, J. L., Bobat, S., Hitchcock, J., White, A., Jenkinson, W. E., Khan, M., Henderson, I. R., Lavery, G. G., Buckley, C. D., Anderson, G., and Cunningham, A. F. (2012) Thymic function is maintained during *Salmonella*-induced atrophy and recovery. *J. Immunol.* 189, 4266-4274.

CONCLUSIONES

- I. El sistema de imagen *in vivo* basado en bioluminiscencia es un método sensible y reproducible que permite evaluar longitudinalmente, en tiempo real y sin necesidad de sacrificar a los animales, la fase aguda y crónica de la infección causada por *L. donovani*. La bioluminiscencia *in vivo* detectada en las regiones de interés se correlacionó con la carga parasitaria cuantificada por qPCR, lo que permite acelerar el descubrimiento de fármacos leishmanicidas. El seguimiento mediante imagen *in vivo* ha permitido la identificación de un nuevo órgano diana en las infecciones por *L. donovani*; el timo.
- II. El uso de ensayos *ex vivo* basados en explantes esplénicos de ratones Balb/c infectados permitió identificar en la librería Prestwick nuevos compuestos activos (“hits”) frente a *Leishmania* spp. que no se detectaron en ensayos clásicos utilizando infecciones intracelulares en macrófagos derivados de médula ósea.
- III. La administración oral del nifuratel, en un modelo de leishmaniasis visceral causada por *L. donovani*, causó una reducción de >80% en la carga parasitaria. Por otro lado, la administración intralesional del nifuratel, en un modelo de leishmaniasis cutánea causada por *L. major*, produjo la cura parasitológica.
- IV. El uso de nanopartículas de poliglicerol decoradas en superficie con PEG y grupos de manosa, permitió la liberación del fármaco cargado en el fagolisosoma de macrófagos murinos y humanos infectados con *L. infantum*, mostrando una mayor entrada en las células infectadas respecto a las no infectadas.

ANEXO I:

Compendio de publicaciones

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



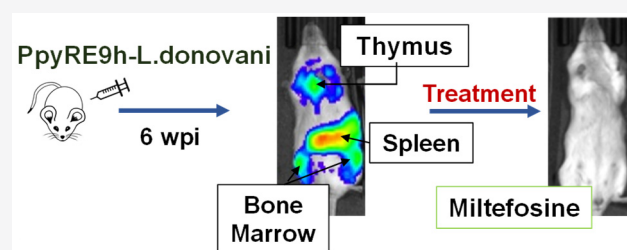
Article Recommendations



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

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

Barbara 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/acscinfecdis.1c00139>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

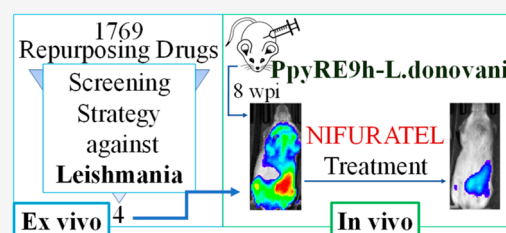
ABSTRACT: Leishmaniasis are vector-borne neglected diseases caused by single-celled parasites. The search for new antileishmanial drugs has experienced a strong boost thanks to the application of bioimaging to phenotypic screenings based on intracellular amastigotes. Mouse splenic explants infected with 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 nitrofuran, 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 intralésional 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



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

ANEXO II:

Curriculum vitae

**Bárbara Domínguez Asenjo**

Apellidos: Domínguez Asenjo
Nombre: Bárbara
ORCID: 0000-0002-3474-3422
ScopusID: 57194728636
ResearcherID: ABG-9849-2020
Nacionalidad: España
País de nacimiento: España
C. Autón./Reg. de nacimiento: Castilla y León
Ciudad de nacimiento: León
Dirección de contacto: C/ Santo Toribio de Mogrovejo
Código postal: 24006
País de contacto: España
Ciudad de contacto: León
Correo electrónico: barbarad0027@gmail.com
Teléfono móvil: 615450749

Situación profesional actual

Entidad empleadora: Universidad de León
Departamento: Facultad de Veterinaria
Categoría profesional: Contratado Predoctoral
Fecha de inicio: 20/11/2017
Modalidad de contrato: Becario/a (pre o posdoctoral, otros)

Cargos y actividades desempeñados con anterioridad

	Entidad empleadora	Categoría profesional	Fecha de inicio
1	Universidad de León	Titulado Superior Investigador	01/08/2017
2	Universidad de León	Becaria	16/03/2016

1 Entidad empleadora: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad
Categoría profesional: Titulado Superior Investigador
Fecha de inicio-fin: 01/08/2017 - 19/11/2017

2 Entidad empleadora: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad
Categoría profesional: Becaria
Fecha de inicio-fin: 16/03/2016 - 19/11/2017



Formación académica recibida

Titulación universitaria

Estudios de 1º y 2º ciclo, y antiguos ciclos (Licenciados, Diplomados, Ingenieros Superiores, Ingenieros Técnicos, Arquitectos)

- 1 Titulación universitaria:** Titulado Superior
Nombre del título: Master en Innovación en Ciencias Biomédicas y de la Salud
Entidad de titulación: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de titulación: 20/07/2016
- 2 Titulación universitaria:** Titulado Superior
Nombre del título: Graduado o Graduada en Biología
Entidad de titulación: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de titulación: 20/07/2015

Doctorados

Programa de doctorado: Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud
Entidad de titulación: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad

Actividad docente

Formación académica impartida

- 1 Nombre de la asignatura/curso:** Bioética y Legislación sanitaria
Titulación universitaria: Grado en Enfermería
Fecha de inicio: 2018 **Fecha de finalización:** 2021
Entidad de realización: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad
Facultad, instituto, centro: Facultad de Ciencias de la Salud
- 2 Nombre de la asignatura/curso:** Toxicología
Titulación universitaria: Grado en Enfermería
Fecha de inicio: 2018 **Fecha de finalización:** 2021
Entidad de realización: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad
Facultad, instituto, centro: Facultad de Ciencias de la Salud
- 3 Nombre de la asignatura/curso:** Toxicología y Veterinaria Legal
Titulación universitaria: Grado en Veterinaria
Fecha de inicio: 2017 **Fecha de finalización:** 2021
Entidad de realización: Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad



Facultad, instituto, centro: Facultad de Veterinaria

Dirección de tesis doctorales y/o proyectos fin de carrera

Título del trabajo: Empleo de miméticos de BH3 para revertir la señal antiapoptótica del parásito Leishmania en sus células hospedadoras. Use of BH3 mimetics to reverse the anti-apoptotic signals of the Leishmania parasite in its host cells.

Entidad de realización: Universidad de León

Tipo de entidad: Universidad

Alumno/a: Nerea García Fernández

Fecha de defensa: 20/07/2021

Experiencia científica y tecnológica

Actividad científica o tecnológica

Proyectos de I+D+i financiados en convocatorias competitivas de Administraciones o entidades públicas y privadas

Nombre del proyecto: Valoración de la citotoxicidad y respuesta inmune in vitro de antígenos vacunales

Entidad de realización: Universidad de León

Tipo de entidad: Universidad

Ciudad entidad realización: León, Castilla y León, España

Nombres investigadores principales (IP, Co-IP,...): Rafael Balaña Fouce; Rosa M^a Reguera Torres; M^a Yolanda Pérez Pertejo; Bárbara Domínguez Asenjo

Nº de investigadores/as: 4

Fecha de inicio-fin: 15/03/2020 - 14/08/2020

Actividades científicas y tecnológicas

Producción científica

Publicaciones, documentos científicos y técnicos

- 1 Reguera R.; Escudero-Martínez J.; Domínguez-Asenjo B.; Gutiérrez-Corbo C.; Balaña-Fouce R.. Chapter 17: DNA Topoisomerases as Promising Targets for Leishmania Chemotherapy. RSC Drug Discovery Series. 2018-January, pp. 348 - 370. 2018. ISSN 20413203

DOI: 10.1039/9781788010177-00348

Tipo de producción: Capítulo de libro

Tipo de soporte: Libro

- 2 Dominguez-Asenjo, Barbara; Gutierrez-Corbo, Camino; Perez-Pertejo, Yolanda; Iborra, Salvador; Balana-Fouce, Rafael; Reguera, Rosa M.. Bioluminescent Imaging Identifies Thymus, As Overlooked Colonized Organ, in a Chronic Model of Leishmania donovani Mouse Visceral Leishmaniasis. ACS INFECTIOUS DISEASES. 7, 2021. ISSN 2373-8227

DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00864

PMID: 33739807

Fuente de citas: WOS

Citas: 1



- 3** Dominguez-Asenjo, Barbara; Gutierrez-Corbo, Camino; Alvarez-Bardon, Maria; Perez-Pertejo, Yolanda; Balana-Fouce, Rafael; Reguera, Rosa M.. Ex Vivo Phenotypic Screening of Two Small Repurposing Drug Collections Identifies Nifuratel as a Potential New Treatment against Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. ACS INFECTIOUS DISEASES. 7, 2021. ISSN 2373-8227
DOI: 10.1021/acsinfecdis.1c00139
PMID: 34114790
- 4** Gutierrez-Corbo, Camino; Dominguez-Asenjo, Barbara; Martinez-Valladares, Maria; Perez-Pertejo, Yolanda; Garcia-Estrada, Carlos; Balana-Fouce, Rafael; Reguera, Rosa M.. Reproduction in Trypanosomatids: Past and Present. BIOLOGY-BASEL. 10, 2021.
DOI: 10.3390/biology10060471
PMID: 34071741
- 5** Franch, Oskar; Gutierrez-Corbo, Camino; Dominguez-Asenjo, Barbara; Boesen, Thomas; Jensen, Pia Bomholt; Nejsun, Lene N.; Keller, Josephine Geertsen; Nielsen, Simon Pagaard; Singh, Prakruti R.; Jha, Rajiv Kumar; Nagaraja, Valakunja; Balana-Fouce, Rafael; Ho, Yi-Ping; Reguera, Rosa Maria; Knudsen, Birgitta Ruth. DNA flowerstructure co-localizes with human pathogens in infected macrophages. NUCLEIC ACIDS RESEARCH. 48, 2020. ISSN 0305-1048
DOI: 10.1093/nar/gkaa341
PMID: 32402089
- 6** Vossen, Laura, I; Dominguez-Asenjo, Barbara; Gutierrez-Corbo, Camino; Yolanda Perez-Pertejo, M.; Balana-Fouce, Rafael; Maria Reguera, Rosa; Calderon, Marcelo. Mannose-Decorated Dendritic Polyglycerol Nanocarriers Drive Antiparasitic Drugs To Leishmania infantum-Infected Macrophages. PHARMACEUTICS. 12, 2020.
DOI: 10.3390/pharmaceutics12100915
PMID: 32987800
Fuente de citas: WOS **Citas:** 2
- 7** Reguera, Rosa M.; Alvarez-Velilla, Raquel; Dominguez-Asenjo, Barbara; Gutierrez-Corbo, Camino; Balana-Fouce, Rafael; Cushman, Mark; Perez-Pertejo, Yolanda. Antiparasitic effect of synthetic aromathecins on Leishmania infantum. BMC VETERINARY RESEARCH. 15, 2019.
DOI: 10.1186/s12917-019-2153-9
PMID: 31706354
Fuente de citas: WOS **Citas:** 2
- 8** Reguera, Rosa M.; Perez-Pertejo, Yolanda; Gutierrez-Corbo, Camino; Dominguez-Asenjo, Barbara; Ordonez, Cesar; Garcia-Estrada, Carlos; Martinez-Valladares, Maria; Balana-Fouce, Rafael. Current and promising novel drug candidates against visceral leishmaniasis. PURE AND APPLIED CHEMISTRY. 91, 2019. ISSN 0033-4545
DOI: 10.1515/pac-2018-1102
Fuente de citas: WOS **Citas:** 8
- 9** Balana-Fouce, Rafael; Perez Pertejo, M. Yolanda; Dominguez-Asenjo, Barbara; Gutierrez-Corbo, Camino; Reguera, Rosa M.. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. DRUG DISCOVERY TODAY. 24, 2019. ISSN 1359-6446
DOI: 10.1016/j.drudis.2019.03.007
PMID: 30876846
Fuente de citas: WOS **Citas:** 19



- 10** Gutierrez-Corbo, Camino; Dominguez-Asenjo, Barbara; Vossen, Laura I.; Perez-Pertejo, Yolanda; Munoz-Fenandez, Maria A.; Balana-Fouce, Rafael; Calderon, Marcelo; Reguera, Rosa M.. PEGylated Dendritic Polyglycerol Conjugate Delivers Doxorubicin to the Parasitophorous Vacuole in Leishmania infantum Infections. MACROMOLECULAR BIOSCIENCE. 17, 2017. ISSN 1616-5187
DOI: 10.1002/mabi.201700098
PMID: 28683183
Fuente de citas: WOS **Citas:** 7

Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

- 1** **Título del trabajo:** Bioluminescent model to discover drugs against chronic infections of Leishmania donovani (Póster)
Nombre del congreso: Trypanosomatid Parasites meeting VI: from the lab to the field
Ciudad de celebración: Paris, Francia
Fecha de celebración: 28/10/2019
Fecha de finalización: 29/10/2019
Entidad organizadora: Instituto Pasteur **Tipo de entidad:** Fundación
Ciudad entidad organizadora: Paris, Francia
Bárbara Domínguez Asenjo; Camino Gutiérrez Corbo; Rubén Carbajo Andrés; Yolanda Pérez Pertejo; Rafael Balaña Fouce; Rosa M^a Reguera.
- 2** **Título del trabajo:** Mannosylated Polyglycerol Nanoparticle as delivery system in macrophages infected with Leishmania infantum (Póster)
Nombre del congreso: Trypanosomatid parasites from the lab to the field VI
Ciudad de celebración: Paris, Francia
Fecha de celebración: 28/10/2019
Fecha de finalización: 29/10/2019
Entidad organizadora: Instituto Pasteur **Tipo de entidad:** Fundación
Ciudad entidad organizadora: Paris, Francia
Camino Gutiérrez Corbo; Bárbara Domínguez Asenjo; Laura Vossen; Rafael Balaña Fouce; Marcelo Calderón; M^a Angeles Muñoz Fernández; Rosa M^a Reguera.
- 3** **Título del trabajo:** Uso de la bioimagen en el reposicionamiento de fármacos para enfermedades desatendidas (Póster)
Nombre del congreso: XXIII Congreso español de Toxicología y VII Iberoamericano
Ciudad de celebración: Sevilla, Andalucía, España
Fecha de celebración: 26/06/2019
Fecha de finalización: 28/06/2019
Entidad organizadora: ASOCIACION ESPAÑOLA DE TOXICOLOGIA
Ciudad entidad organizadora: Sevilla, Andalucía, España
Bárbara Domínguez Asenjo; María Álvarez Bardón; Camino Gutiérrez Corbo; Rubén Carbajo Andrés; Rosa M^a Reguera; Rafael Balaña Fouce.
- 4** **Título del trabajo:** Plataformas fenotípicas de cribado masivo de compuestos mediante técnicas de bioimagen (Póster)
Nombre del congreso: XXII Congreso Español de Toxicología y VI Iberoamericano
Ciudad de celebración: Valencia, Comunidad Valenciana, España
Fecha de celebración: 28/06/2017
Fecha de finalización: 30/06/2017
Entidad organizadora: Asociación Española de Toxicología **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones



Ciudad entidad organizadora: Sevilla, Andalucía, España

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

5 Título del trabajo: Phosphorylation of H2A as double-strand DNA damage biomarker in *Leishmania infantum* treated with topoisomerase poisons (Póster)

Nombre del congreso: Worldleish 6th World Congress on Leishmaniasis

Ciudad de celebración: Toledo, Castilla-La Mancha, España

Fecha de celebración: 16/05/2017

Fecha de finalización: 20/05/2017

Entidad organizadora: Instituto de Salud Carlos III **Tipo de entidad:** Organismo Público de Investigación

Ciudad entidad organizadora: Madrid, Comunidad de Madrid, España

Camino Gutiérrez Corbo; Bárbara Domínguez Asenjo; Rafael Balaña Fouce; M^a Angeles Muñoz Fernández; Yolanda Pérez Pertejo; Rosa M^a Reguera.

6 Título del trabajo: Polyglycerol-doxorubicin conjugate uptake in primary spleen culture macrophages infected with *L. infantum* (Poster)

Nombre del congreso: Worldleish 6th World Congress on Leishmaniasis

Ciudad de celebración: Toledo, Castilla-La Mancha, España

Fecha de celebración: 16/05/2017

Fecha de finalización: 20/05/2017

Entidad organizadora: Instituto de Salud Carlos III **Tipo de entidad:** Organismo Público de Investigación

Ciudad entidad organizadora: Madrid, Comunidad de Madrid, España

Bárbara Domínguez Asenjo; Camino Gutiérrez Corbo; Rafael Balaña Fouce; M^a Angeles Muñoz Fernández; Marcelo Calderón; Rosa M^a Reguera.

7 Título del trabajo: Caracterización funcional del gen que codifica la S-adenosil-L-metionina sintetasa de *Penicillium chrysogenum* (Comunicación)

Nombre del congreso: Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana León 2016

Ciudad de celebración: León, Castilla y León, España

Fecha de celebración: 12/09/2016

Fecha de finalización: 14/09/2016

Entidad organizadora: FGULEM, Universidad de León **Tipo de entidad:** Universidad

Ciudad entidad organizadora: León, Castilla y León, España

Carlos García Estrada; Rebeca Domínguez Santos; Cristina Rodríguez Torres; Bárbara Domínguez Asenjo; Camino Gutiérrez Corbo; Yolanda Pérez Pertejo; Katarina Kosalková; Rafael Balaña Fouce.



Otros méritos

Acreditaciones/reconocimientos obtenidos

Descripción: Acreditación para realizar funciones A, B y C en experimentación animal con las especies: roedores, lagomorfos, rumiantes, equinos y porcinos

Entidad acreditante: Junta de Castilla y León

Tipo de entidad: Institución Pública

Ciudad entidad acreditante: Valladolid, Castilla y León, España

Fecha del reconocimiento: 10/12/2019