



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Efecto *in vitro* e *in vivo* de los análogos alquilfosfolípidos
(APLs) en el desarrollo de nuevos compuestos contra
*Schistosoma mansoni***

Ph.D Tesis

Memoria que presenta

Edward Yepes Victoria,

para optar al grado de doctor.

Facultad de Farmacia

Departamento de Biología Animal, Parasitología,
Ecología, Edafología y Química Agrícola

2015

TESIS DOCTORAL EN FORMATO COMPENDIO DE ARTÍCULOS/PUBLICACIONES

El cuerpo principal de esta Tesis Doctoral corresponde a un compendio de tres trabajos, uno previamente publicado, otro ya aceptado para su publicación y el tercer artículo lo conforma una patente, como a continuación se describen:

Artículo 1:

***In Vitro* and *In Vivo* Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine**

Autores:

Edward Yepes^{1,2}, Rubén E. Varela-M², Julio López-Abán¹, EL Habib Dakir², Faustino Mollinedo² and Antonio Muro^{1*}.

Afiliación de los autores:

¹ Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, España.

² Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, España.

PLoS ONE 2014

9(10): e109431. Doi:10.1371/journal.pone.0109431

* *Corresponding author:* Antonio Muro Álvarez

Tel: (+34) 923294535

Fax: (+34) 923294515

E-mail: ama@usal.es

Artículo 2:

Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel

Autores:

Edward Yepes^{1,2}, Rubén E. Varela-M², Julio López-Abán¹, Jose Rojas-Caraballo¹, Antonio Muro¹ and Faustino Mollinedo^{2,3*}

Afiliación de los autores:

¹IBSAL-CIETUS (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, España.

³Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca, España.

PLoS NTDs 2015

In press. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003893

* *Corresponding author:* Faustino Mollinedo García

Tel: (+34) 923-294806

Fax: (+34) 923-294795

E-mail: fmollin@usal.es

**CARTA DE ACEPTACIÓN PARA PUBLICACIÓN
ARTÍCULO 2.**

Dear Dr. Mollinedo,

We are pleased to inform you that your manuscript, "Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel", has been editorially accepted for publication at PLOS Neglected Tropical Diseases.

Before your manuscript can be formally accepted and sent to production you will need to complete our formatting changes, which you will receive in a follow up email within one week. Please note: your manuscript will not be scheduled for publication until you have made the required changes. **IMPORTANT NOTES**

* Copyediting and Author Proofs: To ensure prompt publication, your manuscript will NOT be subject to detailed copyediting and you will NOT receive a typeset proof for review. The corresponding author will have one final opportunity to correct any errors when sent the requests mentioned above. Please review this version of your manuscript for any errors.

* If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, please inform our press team at plosntds@plos.org as soon as possible, preferably within one week.

*Now that your manuscript has been provisionally accepted, please log into EM and update your profile. Go to <http://www.editorialmanager.com/pntd>, log in, and click on the "Update My Information" link at the top of the page. Please update your user information to ensure an efficient production and billing process.

Thank you again for supporting open-access publishing; we are looking forward to publishing your work in PLOS Neglected Tropical Diseases.

Best regards,

Michael H. Hsieh Guest Editor PLOS Neglected Tropical Diseases

Paul J. Brindley Deputy Editor PLOS Neglected Tropical Diseases

Fecha:2015-06-10 00:34

Patente 3:

Uso de la edelfosina para la prevención y/o tratamiento de helmintiasis

Inventores:

Antonio Muro^{1*}, Julio López-Abán¹, **Edward Yepes**^{1,2} y Faustino Mollinedo².

Afiliación de los autores:

¹ Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, España.

² Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, España.

Patente: 2378812

19032013

ES2378812B1.

Nota. Se adicionan otros artículos realizados durante el período doctoral, como material suplementario.

Certificación:

Dr. Antonio Muro Álvarez, Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca y Dr. Faustino Mollinedo García, Investigador Principal del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca-CSIC.

Certifican:

Que el trabajo **“Efecto *in vitro* e *in vivo* de los análogos alquil-lisofosfolípidos (APLs) en el desarrollo de nuevos compuestos contra *Schistosoma mansoni*”** que presenta el Licenciado en Veterinaria D. Edward Yepes Victoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca. Por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 17 de Junio de 2015.

Fdo. Dr. Antonio Muro Álvarez Fdo. Dr. Faustino Mollinedo García

DEDICATORIA

A mi esposa, Dora Libia Salazar Ramirez, con su amor incondicional y apoyo desmesurado ha gestionado este proyecto académico, junto con mis dos hijos, Samuel y Jose Miguel que son mi vida, han forjado día a día nuestro objetivo familiar de permanecer unidos, conocer otras culturas y acompañarme en esta odisea.

A mis tres hermosas e inteligentes hermanas Jackelinne, Carmen Elisa y Jennifer, quienes me han ofrecido su aliento de confianza acompañada de sabios consejos y no por ser los últimos, son los menos importantes, todo lo contrario, a mis padres, siendo mi madre Carmen Elisa Victoria, el principal hilo de plata que vincula sus oraciones a mi fé y no podría dejar pasar este momento para hacer un pequeño homenaje póstumo, pero sentido a quien admiraré toda mi corta vida, mi padre Luis Ignacio Yepes, el hombre que ha sido mi mayor ejemplo a seguir y del cual recuerdo hoy una de sus muy repetidas frases celebres “Hay que ponerle el pecho a la brisa”, refiriéndose con ello, a superar las dificultades.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A los directores del presente trabajo doctoral, Antonio Muro Álvarez y Faustino Mollinedo García por haberme permitido trabajar en sus grupos de investigación y la confianza depositada en mi.

A mis compañeros del grupo de parasitología, Juan Dib, Ana García, Julio López, Belén Vicente, José Vicente Rojas, Ana Lucya Legarda, Juan Hernández, Carmen Vieira, Pedro Fernández por su apoyo y comprensión.

En este apartado, quiero hacer especial mención y plasmar en este papel, humilde y sentido segundo homenaje póstumo, a quien considero hubiera dejado un inmenso legado científico a la humanidad, si no hubiera sido por el tener que convivir bajo el duro tratamiento de un cáncer en los últimos cinco años, padecimiento que finalmente nos quitó la fortuna de ver el desarrollo de todo ese potencial y conocimiento que logró adquirir en su corta vida, el cual fue frustrado por tan cruel enfermedad estando en la etapa más productiva y donde empezaba a disfrutar de la experiencia adquirida centrándose en lo que más le

gustaba, camino que le hubiera llevado a una carrera brillante como científico. Quienes tuvimos la oportunidad de conocerle nos quedaremos con su increíble calidad humana, alegría, positivismo y ejemplo de vida, Luis Pérez del Villar Moro, amigo te recordaré por siempre y mis trabajos futuros llevarán algo de tí.

A Ondra Nešuta, Ahmed Elbehairy y Fariborz Shariati por enseñarme parte de su cultura, checa, egipcia e iraní con su discernimiento de tolerancia ante las diferencias, espero algún día tener la oportunidad de visitarles en sus países.

Al encontrarme trabajando en dos grupos de investigación al mismo tiempo, tuve la bonita oportunidad de vivir y adquirir conocimiento en lo que parecen dos mundos dentro de uno, la parasitología y el cáncer, es así como debo también agradecer a los compañeros del Laboratorio 6 del CIC; Janny Villa, Ximena Bonilla, Álvaro Cuesta, Mariana Sobreiro, Sara Lima, Amaya Ortega, Adolfo Sánchez, Consuelo Gajate, Alejandra Jiménez, Verónica Alonso y Rósula García.

A mis compatriotas Diego Mancipe, Carlos Rojas y mi gran amigo Oscar Julián Arboleda con quien viviré eternamente agradecido por la cantidad de favores y apoyo ofrecido en la distancia desde nuestra hermosa Colombia. Además del trio fantástico de latinoamericanas casi hermanas Triana Merced, Laura Gutiérrez y Paula Quesada, quienes hicieron más agradable mi llegada a la hermosa ciudad de Salamanca mientras que mi familia estuvo ausente, todo este grupo de compañeros y hoy amigos aportaron calor humano y familiar en las fechas más especiales y en los momentos que más lo necesité.

A mi amigo Rubén E. Varela, con quien estoy especialmente agradecido y a quien le guardo gran admiración y fraterna amistad, fue él quien realizó el vínculo para abrir la puerta de viajar y vivir en el viejo continente, además de alimentar y dar fuego a la ilusión en intentar ser parte del mundo de la investigación dentro de la solemne alma máter y partícipe de muchos cambios en la historia de la sociedad española como lo es la Universidad de Salamanca.

A María del Mar Serrano, compañera y colega veterinaria quien me brindó la oportunidad laboral en su empresa de ejercer mi profesión como veterinario a la par de continuar mis estudios y formación en investigación, con el propósito y esperanza que el final de este proyecto, sea el comienzo de uno nuevo, claro está con la experiencia de vida adquirida en el transcurso del tiempo que invertí en el proceso experimental y la redacción de las publicaciones y demás trabajos consignados en esta tesis doctoral, con todo el amor, empeño y compromiso que siempre he puesto en mis proyectos personales y académicos, con el fin último de servir al prójimo, en este caso a través de un pequeñísimo aporte en la búsqueda de compuestos para el control de algunas de las parasitosis agrupadas dentro de las diecisiete principales enfermedades, que al día de hoy han sido estigmatizadas con el nombre de “Enfermedades Olvidadas”, de las cuales logré trabajar con cuatro de los 17 agentes causales de estas enfermedades, en colaboraciones (Leishmaniosis, Fasciolosis y Strongyloidosis) o en mi proyecto de tesis, con mi fiel amado y compañero parásito llamado *Schistosoma mansoni*, quien pasó infinidad de noches, con sus fines de semanas bajo el microscopio, sin protesta alguna, a este

sencillo parásito pero en donde se esconde cantidad de conocimiento e historia evolutiva, le doy gracias.

Pido disculpas por los nombres de las personas que no mencionara en este momento, dado que fueron muchos compañeros de la Facultad de Farmacia y en el Centro de Investigación del Cáncer con los cuales compartí, y la lista sería demasiado larga, los llevaré siempre en mi corazón por haber colocado su granito de arena en escucharme en los momentos más importantes y compartir muchas horas de esfuerzo y trabajo, pero también las horas de sano esparcimiento con largas tertulias en compañía de un buen café o de unas buenas copas, comilonas, bailes y agradables rumbas que nunca han de faltar para quien se considera un orgulloso Caleño.

Por último, doy gracias a esta tesis por la posibilidad de aprender y de transformar lo que en un momento dado pude ver como algo imposible, y convertirlo en realizable, además de conocer y de vivir en España, lugar del cual solo mi memoria guardaba los recuerdos de aquellas lecturas en los libros de historia y geografía cuando estaba en el colegio, y agradezco también a la tesis por haberme permitido aplicar los modestos conocimientos adquiridos en el trascurso de estos 17 años como veterinario, profesión a la que amo y deseo seguir aportando mucho más con lo aprendido en esta gran universidad, y de aquellos pequeños momentos donde pude enseñar o compartir parte de los conocimiento y datos prácticos adquiridos durante este tiempo, con otros estudiantes de la Facultad de Farmacia, máster y doctorado de Enfermedades Tropicales, esta última corta experiencia pero enriquecedora, junto con la que tuve antes de llegar aquí, con los estudiantes de veterinaria en la que fue mi empresa, hacen que anhele

poder algún día, ojalá cercano, dedicar mayor parte de mi tiempo a la docencia; pero una vez un buen amigo me dijo que “para llegar a ser un buen profesor, nunca hay que dejar de ser un buen estudiante o procurar ser el mejor estudiante y algún día llegarás a ser un buen maestro”,
Augusto César Silva.

Gracias amigos.

*“It is the supreme art of the teacher to awaken joy
in creative expression and knowledge.”*

Albert Einstein

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\Delta\psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial.	CDC: <i>Centers of Disease Control and Prevention.</i>
ABZ: Albendazol.	$CD4^+$: <i>Cluster of cuadruple differentiation-positive.</i>
ADN: Ácido desoxirribonucleico.	CK: <i>Choline kinase.</i>
ADP: <i>Adenosine diphosphate.</i>	CMP: <i>Cytosine-5'-monophosphate.</i>
AKT: Serine/threonine kinase B.	CPT: <i>Cholinephosphotransferase.</i>
ALPs: <i>Alkyl-lysophospholipid analogs.</i>	CYTC: <i>Cytochrome C.</i>
APAF-1: <i>Apoptosis protease activating factor 1.</i>	DAG: <i>Diacylglycerol.</i>
APC: <i>Alkyl phosphocholine.</i>	DEC: <i>Dietilcarbamazina.</i>
APLs: <i>Alkylphospholipid analogs.</i>	DED: <i>Death Effector Domain.</i>
ATP: Adenosín trifosfato.	DD: <i>Death Domain.</i>
ATLs: <i>Synthetic antitumor lipids.</i>	DISC: <i>Death-Inducing Singnaling Complex.</i>
Bcl-2: <i>B-cell lymphoma/leukemia-2.</i>	EL: Éteres lipídicos.
Bax: <i>Bcl-2-associated X protein.</i>	EDLF: <i>Edelfosina.</i>
BZ: Benznidazol.	FABP: <i>Fatty Acid-Binding Protein.</i>
CARD: <i>Caspase Recruitment Domains.</i>	ERK: <i>Extracellular-Signal-Regulated Kinase.</i>
CCT: <i>CTP: phosphocholine cytidyltransferase.</i>	FasL/CD95L: <i>Fas ligand/CD95 ligand.</i>

HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*.
 INF γ : Interferón γ .
 IL-2: Interleucina-2.
 IL-4: Interleucina-4.
 IL-10: Interleucina-10.
 IL-17: Interleucina-17.
 JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*
 LAMP: *Loop-Mediated Isothermal Amplification*.
 LC: Leishmaniosis Cutánea.
 LDL: *Low Density Lipoproteins*
 LPC: *2-Lysophosphatidylcholine*.
 LV: Leishmaniosis Visceral.
 MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*.
 MOMP: *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*.
 MPT: *Mitochondrial Permeability Transition*.
 mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*.
 MBZ: Mebendazol.
 NCCD: *Nomenclature Committee on Cell Death*.
 NF: Nifurtimox.
 NTDs: *Neglected Tropical Diseases*.
 OFZ: Oxfendazol.
 OMS: Organización Mundial de la Salud.
 ONGs: Organizaciones No Gubernamentales.
 OXA: Oxamniquina.
 PA: *Phosphatidic acid*.
 PACO: Programa Africano del Control de la Oncocercosis.
 PAF: *Platelet Activating Factor*.
 PARP: *Poly ADP-ribose polymerase*.
 PC: *Phosphatidylcholine*.
 PCD: *Programmed Cell Death*
 PCO: Programa de lucha contra la oncocercosis.
 PCR: *Polymerase Chain Reaction*.
 PDK: *Piruvate Dehydrogenase Kinase*.
 PE: Fosfatidiletanolamina.
 PGE2: Prostaglandina E2.
 PI: *Phosphatidylinositol*.
 PIP₂: *Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate*.
 PIP₃: *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*.
 PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*.
 PKC,PKD: *Protein kinase C,D*.
 PLC: *Phospholipase C*.
 PLD: *Phospholipase D*.
 PS: *Phosphatidylserine*.
 PTPC: *Permeability transition pore complex*.
 PZQ: Praziquantel.
 RasGRP: *Ras Guanine-Releasing Protein*.
 RIP1: *Receptor-interacting protein kinase 1*.
 RIP3: *Receptor interacting protein kinase 3*.

ROS: *Reactive Oxygen Species*.
SAPK: *Stress-activated protein kinase*.
SM: *Sphingomyelin*.
SMS: *Sphingomyelin synthase*.
SNC: *Sistema Nervioso Central*.
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*.
STHs: *Soil-Transmitted Helminthiases*.
Th: *T helper cells*.
Th1: *T helper type 1*.
Th2: *T helper type 2*.
Th17: *T helper type 17*.
THA: *Tripanosomiasis Humana Africana*.
TGR: *Tiorredoxina Glutación Reductasa*.

TNF: *Tumor Necrosis Factor*.
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α* .
TNF-R1: *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*.
TNFSF10: *Tumor Necrosis Factor ligand Superfamily member 10*.
TRAIL: *TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand*.
TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand 1-2*.
TRAF: *TNF Receptor-Associated Factor*.
TLR2: *Toll-Like Receptor 2*.
TLR4: *Toll-Like Receptor 4*.
Treg: *Linfocito T regulador*.
UNICEF: *United Nations Children's Emergency Fund*.

Contenido

Dedicatoria	i
Agradecimientos	iii
Abreviaturas y acrónimos	ix
Índice de figuras	xvii
Índice de tablas	xix
I INTRODUCCIÓN	1
I.1 Introducción	2
I.2 Enfermedades Tropicales Olvidadas o Desatendidas	7
I.2.1 Esquistosomosis	19
I.2.1.1 Ciclo biológico de <i>S. mansoni</i>	23
I.2.1.1.1 Miracidios	23
I.2.1.1.2 Cercarias	25
I.2.1.1.3 Esquistosómulas	28
I.2.1.1.4 Vermes adultos	31
I.2.1.1.5 Huevos	32
I.2.1.2 Epidemiología	34
I.2.1.3 Respuesta inmunopatológica en la esquistosomosis	37
I.2.1.4 Manifestaciones clínicas	42
I.2.1.5 Diagnóstico	45

I.2.1.6	Tratamiento de la esquistosomosis	48
I.3	Mecanismos de muerte celular en parásitos	53
I.3.1	Muerte celular por necrosis	55
I.3.2	Muerte celular por autofagia	57
I.3.3	Muerte celular por apoptosis	58
I.4	Metabolismo de lípidos en esquistosomas	64
I.4.1	Generalidades de los lípidos	64
I.4.2	Lípidos estructurales de membrana	67
I.4.2.1	Glicerofosfolípidos	68
I.4.2.2	Esfingolípidos	74
I.4.3	Lípidos en esquistosomas	76
I.5	Los alquilfosfolípidos y su actividad antiparasitaria	88
	Bibliografía	100
II	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	143
II.1	Hipótesis	144
II.2	Objetivo general	145
II.2.1	Objetivos específicos	145
III	ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN	147
III.1	Artículo 1	149
III.2	Artículo 2	163
III.3	Patente	193
IV	CONCLUSIONES	249
IV.1	Conclusiones	251
ADENDUM		253
1	Artículo 3: Geohelmintosis	254
OTROS ARTÍCULOS		265
2	Artículo 4	267
3	Artículo 5	284

4	Artículo 6	291
ANEXO		301
5	ANEXO METODOLÓGICO	302
6	Material parasitario y animales de experimentación	304
6.1	Obtención de cercarias a partir de caracoles infectados	305
6.2	Infección del hospedador definitivo	307
6.3	Recogida de sangre periférica y suero en el animal de experimentación	309
6.4	Necropsia, recuperación de formas adultas y contaje de huevos	310
6.5	Transformación de cercarias a esquistosómulas	313
6.6	Técnicas hematológicas (Hemavet®)	315
6.7	Preparación del antígeno somático de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	317
6.8	Valoración de la respuesta inmune	319
6.8.1	Técnica inmunológica, respuesta inmune humoral	319
6.8.2	Técnica inmunológica, respuesta inmune celular: Citometría de flujo para cuantificar citocinas	321
Apéndice A.		323
Apéndice B.		325
Apéndice C.		329

Índice de figuras

I.1	Árbol filogenético de <i>Schistosoma mansoni</i>	5
I.2	Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	22
I.3	Huevo y miracidio de <i>S. mansoni</i>	23
I.4	Cercarias.	27
I.5	Representación esquemática del epitelio sincitial del tegumento e intestino de <i>Schistosoma</i>	30
I.6	Distribución geográfica de la esquistosomosis.	34
I.7	Vista esquemática de la respuesta inmune a la infección por <i>S. mansoni</i>	37
I.8	Estructura química del estereoisómero activo del praziquantel.	50
I.9	Necrosis regulada.	55
I.10	Apoptosis y autofagia.	63
I.11	Fórmula estructural del glicerol.	66
I.12	Moléculas anfipáticas.	67
I.13	Estructura general de los glicerofosfolípidos.	69
I.14	Estructura de los fosfolípidos y los sitios de acción de las fosfolipasas.	70
I.15	Estructura general de los lisolípidos.	72
I.16	Estructura química de los éteres lipídicos.	74
I.17	Estructura química general de los esfingolípidos.	75
I.18	Proteína Sm14.	82
I.19	Formula estructural de los APLs.	89

I.20	Efecto de los APLs en la inhibición de fosfolipasa D y fosfolipasa C.	93
I.21	Efecto de los APLs en los <i>lipid raft</i> de membrana.	94
I.22	Efecto de los APLs en la inhibición de PI3K y Akt.	95
1	Ciclo biológico de <i>S. mansoni</i> en el laboratorio.	304
2	Infección de caracoles.	305
3	Infección de ratones.	307
4	Obtención de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	311
5	Transformación de cercarias de <i>S. mansoni</i> a esquistosómulas.	313
6	Preparación del antígeno somático de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	317
7	Técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos frente a <i>S. mansoni</i>	319

Índice de tablas

I.1	Características morfológicas y genómicas de <i>Schistosoma</i> spp. . .	20
I.2	Esquistosomosis en zonas endémicas y quimioterapia preventiva.	51
I.3	Clasificación de los glicerofolípidos.	68
I.4	Estructuras de los esfingolípidos.	76
I.5	Resumen del efecto de los APLs en el metabolismo de los lípidos sobre algunas de sus dianas moleculares.	92
1	Tratamientos recomendados para las principales enfermedades tropicales desatendidas.	330

I

CAPÍTULO INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

The seventeen main neglected
tropical diseases and therapeutic
perspectives of alkylphospholipid
analogs

Edward Yepes,
Faustino Mollinedo
and Antonio Muro.

2015, *In prep.*

I.1. Introducción

Los parásitos son organismos eucariotas (unicelulares o pluricelulares) que viven en el interior o sobre el tejido vivo de otro organismo más organizado denominado hospedador. El término parásito proviene del nombre dado a unos sacerdotes auxiliares que “sentados al lado del alimento” -sentido etimológico- del sacrificio, participaban más tarde de la ofrenda; de aquí el uso despectivo que se le da a dicha palabra que además, tiene el término, desde su origen griego (*para*, junto a y *sitos*, trigo, comida). La generalización biológica se debe a los médicos veterinarios romanos que denominaron así a aquellos animales que vivían y se alimentaban a expensas de otros. En las primeras definiciones de los parásitos se trataba de diferenciarlos de los depredadores, insistiendo en que, aunque la asociación era para la adquisición de alimentos, se tendía a conservar la vida del hospedador y a no proporcionarle beneficio alguno, sino al contrario, efectos dañinos o acciones patógenas. Todos estos conceptos se completaron al observar la naturaleza de la asociación; el carácter fisiológico de la misma; la interdependencia bioquímica con tendencia a la estabilidad por pérdida o adquisición mutua de información genética donde los parásitos han desarrollado mecanismos que son capaces de manipular el genoma de su hospedador compatible, orquestando cambios en los nucleos de sus células que alteran la expresión génica en favor del parásito [1, 2]. Recientemente los enfoques más informativos del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) (secuencias de genes, polimorfismos de un solo nucleótido del inglés *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), y los

microsatélites) [3], se han utilizado ampliamente para inferir la influencia de la genética en los diferentes aspectos de la biología del parásito.

Por otra parte, de forma general, las acciones perjudiciales son mutuas o en ambas direcciones. La posible «bondad» de algunos parasitismos, o del parasitismo, en general, no existe. Algunos hospedadores van cambiando su metabolismo, ganando peso, o modificando su comportamiento. Por el contrario, los parásitos hallan ventajas adaptativas en conservar la expresión génica de la virulencia. Si los factores de virulencia son mantenidos por la selección natural, ocasionando una disminución del bienestar del hospedador, inevitablemente se producirá también la correspondiente selección para la resistencia del hospedador. Así, se mantiene el equilibrio inestable y dinámico de la comunidad antagónica de dos seres vivos de distinta especie en asociación definida como parasitismo [4, 5].

La gran mayoría de los parásitos pertenecen a uno de los siguientes *Phylum*: Apicomplexa, Microspora, Ciliophora, Plathelminthes, Nematoda y Arthropoda. Los **helmintos** se encuentran en dos de ellos Plathelminthes y Nematoda. Se han descrito cerca de 25.000 especies de nematodos. Muchos de ellos son parásitos de insectos, plantas o animales, pero también existen especies de vida libre como *Caenorhabditis elegans*. Sobre la base de las estimaciones mundiales, entre 75.000 y 300.000 especies de helmintos

infectan a los vertebrados terrestres y acuáticos; entre estos, 287 son conocidos en los seres humanos, el 95% de los cuales son especies zoonóticas y aproximadamente el 25% de la población mundial está infectada con estos organismos [3]. La gran mayoría de los platelmintos parásitos pertenecen a las clases, Monogenea, Digenea (gr. dis, “doble” y genos, “raza”) y Cestoda (tenias) (figura I.1), y las dos primeras clases son comúnmente denominadas “trematodos”. Todos los trematodos que residen en los seres humanos son de la clase Digenea. Tienen complejos ciclos de vida indirectos, en los que incluyen uno o varios hospedadores intermediarios (Ej. caracoles terrestres), ejemplo de estos parásitos son los esquistosoma, objeto de esta Tesis Doctoral.

ENFERMEDADES TROPICALES

OLVIDADAS O DESATENDIDAS

Entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS), buscan disminuir la brecha de lo que hoy es un mundo olvidado, donde millones de personas sin acceso a agua potable, saneamiento adecuado y suficiente comida, mueren cada día. Estas poblaciones más pobres, residentes en zonas rurales remotas, barrios suburbanos marginales o zonas de conflicto, suelen ser las más afectadas por estas enfermedades, que persisten cuando hay pobreza y se concentran de forma casi exclusiva en zonas tropicales y sub-tropicales ocupados por la mayoría de países con altos índices de pobreza y en vías de desarrollo. Estas enfermedades reciben poca atención y se ven postergadas en las prioridades de la salud pública. La inexistencia de estadísticas fiables también ha dificultado los esfuerzos por sacarlas de las sombras. En reuniones de la OMS son discutidos

ampliamente estos temas y fue durante la segunda reunión en Berlín en el año 2005, donde fue acuñado el termino “**Enfermedades Tropicales Olvidadas o Desatendidas**” más conocidas en inglés como “**Neglected Tropical Diseases**”, de la cual se deriva las siguiente abreviatura NTDs. Pero fue verdaderamente en abril de 2007, donde hubo la primera reunión con los especialistas mundiales de la NTDs, a la que asistieron más de 200 participantes de múltiples gobiernos y Organizaciones No Gubernamentales (ONGs) [6]. Aunque el concepto vino ganando fuerza desde principios de 2002, no fue hasta el año 2005 donde se publicó el primer artículo con el nombre completo de enfermedades tropicales desatendidas, realizado por Molyneux et al. en PLoS Medicine [7]. Las principales enfermedades tropicales desatendidas están agrupadas en diecisiete, cuyos agentes causales son una variedad de patógenos, como parásitos (helminchos y protozoos), bacterias y virus, que se encuentran principalmente distribuidos en la regiones tropicales y subtropicales del mundo, causando efectos negativos sobre el embarazo, retraso en el desarrollo físico e intelectual durante la infancia y reducción de la productividad de trabajo en la edad avanzada [8]. La OMS recomienda cinco estrategias de salud pública para la prevención y control de las enfermedades tropicales desatendidas: **la quimioterapia preventiva** o en sus siglas en inglés *Preventive Chemotherapy* (PC); la intensificación de la gestión de casos; el control de vectores; la provisión de agua potable, el saneamiento e higiene; y la salud pública veterinaria (es decir, la

I.2. Enfermedades Tropicales Olvidadas

aplicación de las ciencias veterinarias para asegurar la salud y el bienestar del hombre) [6].

La quimioterapia preventiva, es la principal estrategia utilizada por la OMS y se encuentra dentro de los objetivos desarrollados en esta Tesis Doctoral. Consiste en la distribución de medicamentos antihelmínticos mediante un enfoque racional optimizando el uso de los medicamentos, con la administración única, dirigidos simultáneamente al control de más de una forma de helmintosis. Los esfuerzos para hacer frente a las infecciones por helmintos de forma coordinada se remontan a la resolución 2001 de la Asamblea Mundial de la Salud WHA54.19 sobre la esquistosomosis y las helmintosis transmitidas por el suelo, o también conocidas como geohelmintosis, que establecen objetivos y metas comunes para su prevención y control [6]. Frente a estas enfermedades se requiere conocimientos específicos y profundos. A largo plazo, la OMS debe asegurar que se tomen las medidas sostenibles para prevenir estas enfermedades y promover el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico, medicamentos más seguros, asequibles y sencillos de usar [6].

En las enfermedades olvidadas causadas por virus se encuentran los virus que pertenece al género *Flavivirus* causante del dengue y el género *Lyssavirus* causante de la rabia. El primero es una infección transmitida por mosquitos hembras del género *Aedes aegypti* o en menor medida

Aedes albopictus. El virus de la rabia se transmite principalmente por la mordedura de perros infectados por el mismo virus. Fue Louis Pasteur, quien estableció que el virus se albergaba en el cerebro y en 1885 desarrolló la primera vacuna contra el virus de la rabia procedente de la médula espinal de conejos con rabia [9]. El dengue causa una enfermedad similar a la gripe, y de vez en cuando se desarrolla como una complicación potencialmente mortal llamado dengue grave (anteriormente conocida como fiebre hemorrágica del dengue), mientras que las personas infectadas con el virus rábico, una vez que se desarrollan síntomas, la enfermedad es siempre mortal en los seres humanos, a menos que puntualmente reciban profilaxis post-exposición [10]. Se estima que 2,5 mil millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir dengue, con una incidencia anual al menos de 50 millones [11,12]. Por el contrario, se ha reducido la incidencia en humanos, gracias a campañas sostenidas de vacunación canina y el uso de la profilaxis pre y posterior a la exposición [13].

Las enfermedades olvidadas causadas por bacterias son un grupo conformado por agentes causales de los cuatro serovariedades oculares de *Chlamydia trachomatis* (A, B, Ba y C) que ocasionan el tracoma [14,15], seguido por la bacteria *Mycobacterium ulcerans* que ocasiona la úlcera de Buruli [16–19], continuando con las treponematosi endémicas producida por *Treponema pertenues* [8] y por último una de las enfermedades más estigmatizadas como es la lepra cuyo agente causal es *Mycobacterium*

I.2. Enfermedades Tropicales Olvidadas

leprae [20]. En la actualidad el tratamiento de todas estas enfermedades bacterianas, consiste en la administración masiva de antibióticos (ver apéndice C). Se estima que el tracoma, puede ser erradicado en el año 2020 [15,21,22].

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica, sistémica y una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y pertenecen a las enfermedades olvidadas causadas por protozoos. Se transmite a los humanos por las heces infectadas de insectos triatomíneos “vinchucas, pitos u otras acepciones”. Se encuentra principalmente en 21 países de América Latina, estimándose que alrededor de 7-8 millones de personas en el mundo están infectados con *T. cruzi* [8]. La presencia de la enfermedad de Chagas fuera de América Latina se debe principalmente a la movilidad de la población, principalmente la migración. Aproximadamente el 60-70% de los pacientes crónicos no tienen síntomas clínicos, mientras que el 30-40% presenta alteraciones cardíacas, megasíndromes digestivos o ambos [23]. Durante mucho tiempo, el control de la transmisión de los vectores o evitar la transfusión de sangre ha tenido éxito en varios países endémicos. Sin embargo, otros mecanismos de adquirir la enfermedad como la transmisión congénita, los trasplantes o el consumo de alimentos contaminados con los insectos, puede ser los responsables de infección. Se necesitan nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ya que sólo hay dos

medicamentos registrados y disponibles hace 29 años; Benznidazol (BZ) y Nifurtimox (NF) [24], que son mal tolerados y tienen una eficacia limitada en la fase crónica de la enfermedad (ver apéndice C).

La tripanosomiasis humana africana THA, también conocida como la enfermedad del sueño, es causada por la infección con parásitos protozoos pertenecientes al género *Trypanosoma brucei*. La enfermedad se transmite por la picadura de la mosca tse-tsé (*Glossina* spp.) que la han adquirido de seres humanos o animales infectados. A través del tiempo, el parásito cruza la barrera hematoencefálica, migran hacia el sistema nervioso central y causa graves trastornos neurológicos y psiquiátricos que pueden conducir a la muerte. Las formas de presentación en los seres humanos, depende de la subespecie de tripanosoma involucrada. *Trypanosoma brucei gambiense* causa una forma crónica de THA, transcurriendo alrededor de dos años antes de la infección del Sistema Nervioso Central (SNC), mientras *Trypanosoma brucei rhodesiense* causa una enfermedad aguda y es fatal en cuestión de meses. La pentamidina se usa para tratar la primera etapa de *T. b. gambiense* y suramina se utiliza para tratar la primera fase de infección por *T. b. rhodesiense*. Melarsoprol intravenoso se utiliza en la segunda fase de ambas formas de la enfermedad. Eflornitina se utiliza en la segunda fase de *T. b. gambiense* [6, 25] (ver apéndice C). Estos fármacos son tóxicos, necesitándose medicamentos alternativos. *T. b. gambiense* es endémico en 23 países de África occidental y central

I.2. Enfermedades Tropicales Olvidadas

y provoca más del 90% [26] de los casos reportados de la enfermedad del sueño y *T. b. rhodesiense* es endémica en 13 países de África oriental y meridional, que representan el 10% restante de los casos notificados [6]. Entre 2000 y 2009, de los 36 países que figuran como endémicos, 24 recibieron apoyo de la OMS, tanto para evaluar la situación epidemiológica como para establecer actividades de control y vigilancia [27].

La leishmaniosis es otra enfermedad parasitaria causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania*, transmitiéndose por la picadura de la hembra infectada de diferentes especies de *Phlebotomus* y *Lutzomyia* [28]. Se encuentra en 88 países, 72 de los cuales son países en desarrollo [29]. Aunque la leishmaniosis se considera una enfermedad tropical, es endémica en regiones no tropicales, sobre todo en países de la cuenca mediterránea, como países del sur de Europa, Turquía e Israel. La Leishmaniosis Visceral (LV), también conocida como “kala-azar” compromete los órganos internos y es la forma más grave, 300.000 casos estimados de LV, más de 20.000 muertes al año y 310 millones de personas en riesgo de infección en los seis países que presentaron informes sobre el 90% de los casos de LV en todo el mundo. La Leishmaniosis Cutánea (LC) suele causar úlceras en la cara, los brazos y las piernas, dejando cicatrices severas y deformantes, además de la discapacidad de 1 millón de casos notificados en los últimos 5 años [30]. Atendiendo a su distribución geográfica, la leishmaniosis puede clasificarse en leishmaniosis del Viejo Mundo (que se encuentra en el sur de

Europa, Oriente Medio, Asia y África) y leishmaniosis del Nuevo Mundo, que se extiende desde el sur de los EE.UU. a través del Centro y Sur del continente Americano. Durante más de 70 años, el tratamiento de primera línea en la mayoría de los países ha sido antimonio pentavalente inyectable. Los fármacos de segunda línea, son la anfotericina B o pentamidina y otros medicamentos eficaces en la actualidad son miltefosina y paromomicina (ver también en apéndice C). La quimioterapia actualmente disponible para el tratamiento de la leishmaniosis está lejos de ser satisfactoria y muestra problemas de toxicidad, efectos secundarios adversos, altos costos y desarrollo de resistencias [28].

Las helmintosis, como teniosis y cisticercosis son enfermedades olvidadas causadas por *Taenia solium*. La teniosis es una enfermedad leve causada por la presencia de la tenia adulta en el intestino humano. La cisticercosis es una enfermedad grave que se produce cuando los seres humanos ingieren los huevos de la tenia que desarrollan como larvas (cisticerco) en sus tejidos. La liberación intermitente de huevos de tenia en las heces de los seres humanos con teniosis, contamina el medio ambiente y expone al hombre y animales como el cerdo al riesgo de contraer la infección con cisticercosis. La frecuencia de la enfermedad ha disminuido en los países desarrollados debido a estrictas normas de inspección de carne, la mejora de la higiene y mejores instalaciones sanitarias. Los cisticercos se pueden desarrollar en los músculos, la piel, los ojos y el sistema nervioso central.

I.2. Enfermedades causadas por helmintos

La neurocisticercosis, la forma más grave de la enfermedad, aparece cuando se invade el SNC con cisticercos; y es una de las principales causas de la epilepsia. La prevención de la enfermedad requiere estrictos regímenes de inspección de la carne, la educación sanitaria, la cocción completa de la carne de cerdo, de una buena higiene y adecuado saneamiento de aguas [6]. Incluye regiones endémicas de América Latina, sur y sudeste Asiático, y África subsahariana. El medicamento recomendado para el tratamiento de la teniosis/cisticercosis es el praziquantel (PZQ), pero también se puede utilizar en los medios de campañas Niclosamida y Oxfendazol (OFZ), este último se utiliza preferiblemente para en el tratamiento de los cerdos [31–35] (ver apéndice C). Además, se ha desarrollado una vacuna que puede impedir el establecimiento del parásito en cerdos [36].

La equinococosis es una enfermedad parasitaria zoonótica causada por las fases larvianas de las tenias del género *Echinococcus* que forman quistes patógenos en humanos. Las dos especies principales que infectan a los seres humanos son la equinococosis quística, causada por la infección con *Echinococcus granulosus* y la equinococosis alveolar causada por la infección con *Echinococcus multilocularis*. Casos de equinococosis poliquística se han reportado en América Central y del Sur y son causados por *Echinococcus vogeli* y *Echinococcus oligarthrus* [37]. Los seres humanos se infectan al ingerir huevos de *Echinococcus* que se desprenden con mayor frecuencia en las heces de perros y varios cánidos salvajes,

como zorros, lobos, chacales y coyotes. Hay zonas de alta endemicidad en el sur de Sudamérica, la costa mediterránea, la parte sur de la antigua Unión Soviética, el Medio Oriente, el sudoeste de Asia, el norte de África, Australia, Kenia, Nueva Zelanda y Uganda [6]. El tratamiento quimioterapéutico se basa en derivados de carbamato de benzimidazol tales como Mebendazol (MBZ) y Albendazol (ABZ). Además, se están haciendo esfuerzos para combinar PZQ con ABZ y obtener un efecto sinérgico en el tratamiento de la equinococosis quística [38,39] (ver apéndice C).

Las trematodosis transmitidas por los alimentos son infecciones que se adquieren a través del consumo de pescado, verduras y crustáceos contaminados con metacercarias, fase infectiva de los parásitos [40]. Las enfermedades de mayor importancia para la salud pública son fasciolosis (causada por *Fasciola hepatica* o *F. gigantica*), clonorquiosis (causada por *Clonorchis sinensis*), opistorquiosis (por *Opisthorchis viverrini* o *Opisthorchis felineus*) y paragonimosis originada por distintas especies de *Paragonimus*. La OMS ha estimado en más de 41 millones, el número de personas actualmente infectadas, estando en riesgo de infección 750 millones [41–43]. La fasciolosis es de distribución cosmopolita. La paragonimosis se da en África, sudeste de Asia y las Américas. Clonorquiosis se limita a Asia oriental y opistorquiosis es frecuente en el oriente y centro de Asia, además del Este de Europa. Dentro de un país, la distribución es focal, limitándose a determinadas regiones o zonas geográficas. Su restringida transmisión se debe principalmente a los

I.2. Enfermedades causadas por helmintos

patrones de comportamiento y ecológicos, como los hábitos alimentarios y la distribución de los moluscos (hospedadores intermediarios). El PZQ es el fármaco de elección para todas ellas [43], excepto para la fasciolosis que es el triclabendazol [6, 43, 44] (ver apéndice C).

Las filariosis linfáticas son enfermedades muy debilitantes, desfigurantes y estigmatizantes, causadas por la infección con una de las tres especies de filarias (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Brugia timori*), transmitidas por mosquitos. Los vermes adultos viven casi exclusivamente en el ser humano, alojados en el sistema linfático. La infección se adquiere normalmente durante la infancia, pero por lo general se manifiesta en la edad adulta con agrandamiento anormal de las extremidades y genitales. Los síntomas de la enfermedad crónica se presentan con mayor frecuencia en hombres adultos afectando principalmente su sistema linfático. Estos parásitos albergan endosimbiontes como *Wolbachia* [45]. A nivel mundial, 1.390 millones de personas necesitan quimioterapia preventiva, y en 72 países endémicos se han iniciado programas para eliminar las filariosis linfáticas [8, 46]. En 2000, la OMS estableció el programa mundial para la eliminación de la filariosis linfáticas con el objetivo de erradicar la enfermedad en el año 2020 [46].

La oncocercosis (ceguera de los ríos) es una enfermedad parasitaria de la piel y de los ojos causada por *Onchocerca volvulus*. La infección se

transmite a los humanos por la picadura de la mosca negra del género *Simulium*, que se cría en los ríos y arroyos de corriente rápida, sobre todo en los pueblos rurales situados cerca de tierras fértiles donde las personas dependen de la agricultura. Los vermes adultos producen microfilarias que migran a la piel, los ojos y otros órganos. Los síntomas incluyen prurito intenso, dermatitis, depigmentación y lesiones oculares que pueden conducir a la discapacidad visual y la ceguera permanente. La mayor parte de las personas infectadas con *O. volvulus* viven en el África subsahariana [8,47]. En 1945 Mazzotti y Hewitt descubren que la densidad de microfilarias en la piel desciende después del tratamiento con DEC y en 1981 comenzaron los ensayos clínicos sobre el uso de la ivermectina para el tratamiento de la oncocercosis. El fármaco se utiliza masivamente en el Programa de lucha Contra la Oncocercosis (PCO) y el Programa Africano del Control de la Oncocercosis (PACO) [8,47](ver en apéndice C).

Las geohelminosis o también denominadas *Soil-Transmitted Helminthiases* (STHs) son nematodosis producidas por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Strongyloides* spp. Se encuentran en el siguiente grupo a describir dentro del conjunto de las NTDs, de la cual encontraremos una amplia información al final de esta tesis, en el correspondiente **adendum**.

I.2.1 Esquistosomosis

Es una enfermedad parasitaria causada por trematodos del género *Schistosoma* y su clasificación filogenética se observa en la figura I.1. El significado de su nombre es “cuerpo con hendidura”, haciendo referencia al aspecto que presenta el macho cuyos bordes laterales se pliegan para formar una hendidura (canal ginecóforo) donde reside la hembra [48]. Los esquistosoma se diferencian de otros trematodos en que son parásitos dioicos, con dimorfismo sexual entre vermes hembras y machos. Estos parásitos necesitan dos hospedadores para su supervivencia, un caracol hospedador intermediario, donde se produce la reproducción asexual y un hospedador definitivo, donde se produce la reproducción sexual [49–52].

En el hombre es causada especialmente por las especies de *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* y *Schistosoma intercalatum* [53–55]. Los géneros principales de hospedadores intermedarios son: *Biomphalaria* para *S. mansoni*, *Bulinus* para *S. haematobium* y *S. intercalatum*, *Oncomelania* para *S. japonicum* y *Tricula* para *S. mekongi*. En la tabla I.1 se puede apreciar las diferencias entre las características morfológicas y genómicas de las tres especies más prevalentes de esquistosomas.

S. mansoni produce la infección en humanos por el contacto directo con aguas contaminadas con cercarias. Como se mencionó antes, los caracoles

Estadio	Morfología	<i>S. haematobium</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>
Macho adulto	Longitud (mm)	10	10-12	12-20
	Diámetro (μm)	1000	1000	500
	Número de testículos	4-5	7-9	6-8
	Tubérculos	Fino	Prominente	Ausente
Hembra adulta	Longitud (mm)	16-20	12-16	18-25
	Diámetro (μm)	200-300	200	400
	Ovario (posición)	Posterior	Tercio anterior	Mitad
	Útero (posición)	Dos tercios anterior	Anteromedial	Anteromedial
	Número de huevos en útero	100	5-60	5-200
Huevo maduro	Forma	Ovoide	Ovoide	Redondo
	Tamaño (μm): Longitud x diámetro	135 x 62,5	137,5 x 52,5	87,5 x 62,5
	Espina	Terminal (prominente)	Lateral (prominente)	Lateral (reducido)
	Huevos/hembra/día	20-300	100-200	3500
Cercaria	Longitud (μm)	~ 500	~ 500	~ 500
	Diámetro (μm)	30-40	30-40	30-40
Genoma de <i>Schistosoma</i> spp.				
Estimación del genoma	Tamaño (Mb)	385	363	397
	Número de cromosomas (2n)	8	8	8
	Proporción de genoma codificante (%)	4,43	4,72	4,32
	Número de genes putativos codificantes	13.073	13.184	13.469
	Contenido total de GC (%)	34,3	34,7	33,5
	Proporción de repetición (%)	47,2	45	40,1

Tabla I.1: Características morfológicas y genómicas de *Schistosoma* spp.

del género *Biomphalaria* (hospedadores intermediarios), son los encargados de contaminar las aguas con cercarias. A raíz de la penetración de cercarias a través de la piel (Figura I.2), pierden sus colas y se transforman en esquistosómulas [56]. La esquistosómula se introduce por capilares, vénulas y demás estructuras en el sistema vascular, para llegar finalmente a los pulmones, donde maduran las etapas de pre-adultos. A partir del octavo al décimo día después de la infección, las formas de vermes inmaduros o pre-adultos llegan al sistema portal, donde maduran en hembras y machos

I.2. Esquistosomosis

adultos para finalmente alojarse en las venas mesentéricas [48, 50, 57]. Ambos parásitos de *S. mansoni*, hembras y machos alcanzan la madurez sexual de forma monógama en el torrente sanguíneo, y la reproducción sexual se produce a continuación, con la oviposición de cientos de huevos por día, predominantemente en órganos como el hígado e intestino y se caracteriza por presentar una espina lateral [58–60], como se aprecia en la imagen (A) en la figura I.3. A continuación se describen con más detalles las diferentes fases o estadios de los esquistosomas, comenzando por el miracidio y terminando en el huevo, siendo este último para muchos autores el causante principal de los daños provocado por este parásito, que se manifiestan en la fase crónica de la enfermedad con la afectación de los tejidos donde se ve atrapado, e incluso siendo uno de los factores desencadenantes que conlleva al aumento de presentación de cáncer de vejiga u otros tumores en el hígado de poblaciones donde existe una alta prevalencia de infestaciones por *S. haematobium* y/o *S. mansoni* [61–65].

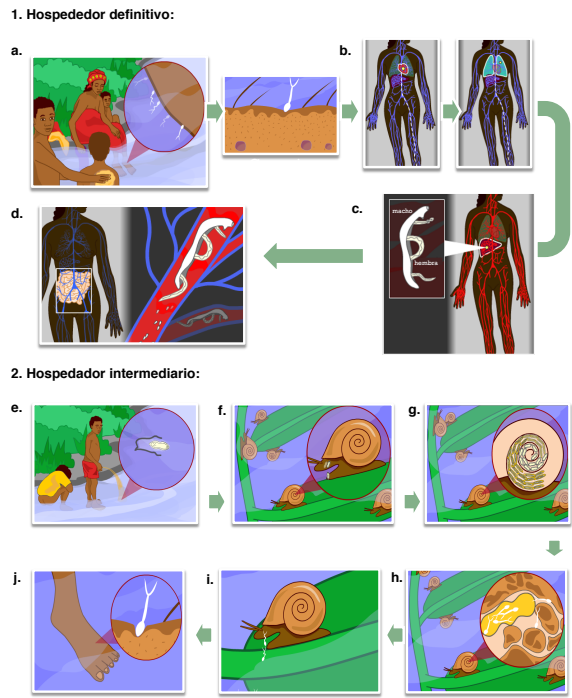


Figura I.2: Ciclo de vida de *S. mansoni*. En zonas endémicas, las **personas** «1. hospedador definitivo» que realizan sus actividades diarias (recreación o trabajo) en aguas infectadas con cercarias (forma infectante), adquieren la esquistosomosis cuando esta penetra a través de la piel (a), perdiendo su cola para luego alcanzar el sistema circulatorio y ser transportada a los pulmones del hospedador, convirtiéndose en esquistosómulas (b). Luego viajan al sistema porta hepático (c), donde comienza su proceso de maduración en adultos jóvenes, aparean, para pasar de nuevo a los vasos sanguíneos a través de varios tejidos, en el caso *S. mansoni* los vermes adultos finalizan en las venulas mesentéricas, estando en continua copula y produciendo cientos de huevos (d), que son eliminados a la luz intestinal para salir al exterior del hospedador y contaminar el ambiente o fuentes de aguas, estos huevos eclosionan (e) y emerge el miracidio (f), forma infectante del **caracol** «2. hospedador intermediario», dentro de este se convierte en esporocisto primario (g) y posteriormente en esporocisto secundario (h), el cual produce miles de cercarias que salen del caracol para contaminar las aguas (i-j).

I.2.1.1 Ciclo biológico de *S. mansoni*

En la figura I.2 se muestra una descripción del ciclo biológico de *S. mansoni*, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. A continuación se realiza un estudio más pormenorizados de las diferentes fases del ciclo.

I.2.1.1.1 Miracidios

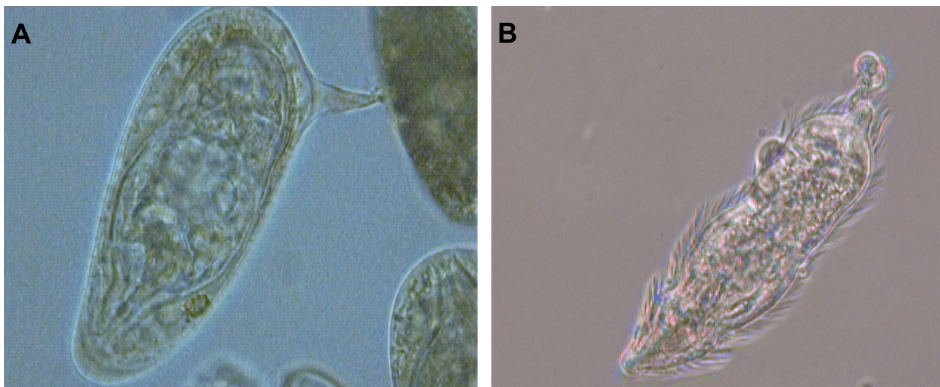


Figura I.3: En la imagen (A), se observa un miracidio dentro de un huevo maduro de *S. mansoni* a punto de eclosionar, mientras que en la imagen (B), se logra ver con claridad los múltiples cilios de un miracidio pocos minutos después de emerger del huevo; forma infectante del caracol.

Una vez que el huevo es eliminado a través de las heces o la orina al agua dulce (figura I.3, A), se presenta las rupturas de la cutícula de los huevos y emergen los miracidios multiciliados activamente móviles (figura I.3, B). La causa de la eclosión de los huevos, aun no está completamente

definida, pero se cree que pueden influir los cambios en la presión osmótica y otros factores [58,66,67]. El miracidio es una de las dos etapas de vida libre de los esquistosomas (el otro es la cercaria). Después de la eclosión de un huevo, el éxito del desarrollo del miracidio depende de encontrar un caracol hospedador adecuado antes de que sus reservas de energía (glucógeno) se agoten, que ocurre aproximadamente 12 horas después de la eclosión [56]. Gran parte de ese éxito puede ser debido a la combinación de la respuesta geotáctica y de la fototaxis positiva, además de la dispersión particular que poseen los caracoles. En el caso de *Biomphalaria* spp., estos se encuentran con frecuencia más concentrados cerca de los bordes poco profundos de las colecciones de acuáticas [68,69]. Sin embargo, hay pruebas de que existe alguna respuesta quimioatrayente de los miracidios cuando están muy cerca del caracol [68]. El miracidio sondea los tejidos blandos de los caracoles, por lo general cerca de la cabeza, pie o los tentáculos, para buscar un sitio a través del cual pueda penetrar más fácilmente. Con la ayuda de enzimas de penetración, secretadas a través de papilas apicales, se puede alcanzar la entrada completa en los tejidos blandos en cuestión de minutos [56,70]. Es durante este tiempo (~ 24 h después de la infección), cuando los miracidios están arrojando sus placas epidérmicas ciliadas (figura I.3) y al mismo tiempo están en el proceso de formación del nuevo sincitio tegumental esporocístico y poco después se detiene la migración a través del tejido [71]. Comparable a la situación en la que una cercaria necesita para transformarse en esquistosómula, el miracidio

I.2. Esquistosomosis

también debe sufrir cambios para adaptarse a las condiciones del tejido del caracol. Después de la penetración en el caracol, la transformación de miracidios de *S. mansoni* a esporocistos primarios o madre, representa un período crítico en el éxito del establecimiento de infecciones larvianas. La etapa de esporocisto primario es esencialmente una cámara de cría en forma de saco en el que numerosos esporocistos secundarios (hijos) comienzan a formarse [72]. Alrededor de dos semanas después de la penetración de los miracidios, los esporocistos secundarios escapan del esporocisto primario y migran hacia el hepatopáncreas y las gónadas del caracol. Dos semanas más son necesarias para que cada esporocisto secundario de lugar a miles de cercarias [72]. Una vez desarrolladas plenamente emergen de los esporocistos secundarios, migran hacia el extremo anterior del caracol, y salen al agua circundante desde los márgenes de los tejidos blandos, por lo general a través de la cabeza, manto del cuello y pseudobranquias (al menos para *B. glabrata*). En condiciones óptimas, un caracol infectado puede liberar cientos de miles de cercarias durante su vida útil.

I.2.1.1.2 Cercarias

La cercaria es la segunda fase de vida libre de los esquistosomas, es el estadio infectivo y activamente nadador que requiere un periodo de tiempo (24 a 48 h), para infectar un hospedador definitivo adecuado. La cercaria madura tiene dos segmentos principales, el primero (el cuerpo) es el progenitor del verme adulto, y se une a una cola bifurcada extremadamente

muscular (figura I.4). Están cubiertas por una capa rica en azúcar, llamado glucocáliz, que se sienta sobre el tegumento, una epidermis sincitial modificada que se caracteriza por un sistema de membrana trilaminado [73]. La cola sirve para propulsar el organismo a través del agua, y puede servir como punto de apoyo para ayudar al cuerpo en acceder a la piel del hospedador definitivo. La longitud de un cercaria de *S. mansoni* es de aproximadamente 500 μm (Tabla I.1), pero se contrae y se alarga continuamente. Existen diferencias morfológicas y de comportamiento entre las cercarias de las diferentes especies de esquistosomas. Por ejemplo, las cercarias de *S. mansoni* muestran un patrón de nado discontinuo, pero nunca en reposo. En contraste, cercarias de *S. japonicum* pueden nadar en la superficie y permanecer allí inactivas durante varios minutos. La cercaria de la especie más estudiada (*S. mansoni*) poseen aproximadamente 1.000 células, sensoriales, musculares, nerviosas, etc [74–76]. Muchos de los órganos que se encuentran en el gusano adulto ya están formados, en miniatura, en el cuerpo de la cercaria. La cola es muy musculosa, con un conducto excretor funcionando en toda su longitud, este conducto se bifurca en la base de la cola y desemboca en poros excretores terminales [74, 75]. Los cinco pares de glándulas acetabulares forman parte destacada de la anatomía de las cercarias [77]. Se llaman así debido a su posición en relación con el acetábulo (ventosa ventral, ver figura I.4 A), además de proporcionar las secreciones que están involucrados en la penetración de la cercaria, y se agotan poco después de la penetración. Estas estructuras no tienen

I.2. Esquistosomosis

homólogos en el verme adulto [74–77].

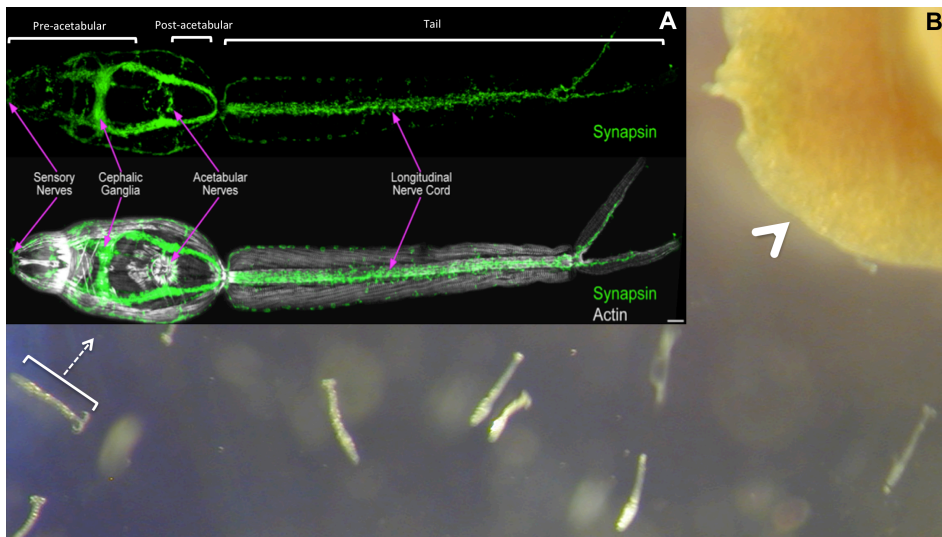


Figura I.4: Cercarias. La imagen (A), es una adaptación de Collins et al. 2011 [75], en la cual se puede observar la inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-sinapsina que marca los ganglios cefálicos y muchas estructuras neurales periféricas del cuerpo y cola de la cercaria. A continuación en la imagen (B), se observa de referencia nadando a varias cercarias, que recién han salido del caracol, tal como se verían bajo la luz de un estereoscopio. La cabeza de flecha señala el pie de un caracol de *B. glabrata*.

Después de salir del caracol (figura I.4, B), las cercarias deben encontrar un hospedador adecuado en cuestión de minutos. Los ácidos grasos tales como linoleico y aminoácidos tales como arginina en la piel son quimioatrayentes importantes para las cercarias. Cuando una cercaria entra en contacto con la superficie de la piel humana, busca un sitio de

entrada para encontrar a menudo las irregularidades de la superficie de la piel asociados con pelos, folículos pilosebáceos u otras crestas o arrugas [78]. Las gotas de la secreción de las glándulas post-acetabular sirven como anclas adhesivas para el cuerpo. La cercaria utiliza su actividad muscular para excavar en la grieta, apreciándose una serie de embestidas desde la cola y la expansión y contracción del cuerpo. Además este proceso se incrementa a través de las secreciones de las glándulas acetabulares de penetración, en el que se encuentran numerosas enzimas como serín proteasas o también denominadas elastasas cercarianas (SmCE) [79–82]. Las cercarias pierden su glucocáliz superficial después de la invasión, este consiste en una capa de hidratos de carbono complejos que protege a las cercarias contra el choque osmótico en el medio acuático antes de la entrada al hospedador definitivo [79, 83].

I.2.1.1.3 Esquistosómulas

Tras entrar en la piel del hospedador, la cercaria pierde la cola y su cuerpo tiene que adaptarse a un ambiente diferente, en el interior de un nuevo organismo. Para ello, se suceden una serie de complejos cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en esta fase larvaria [56, 84]. Uno de los cambios más importantes es pasar de una membrana externa trilaminar a la formación de una doble capa o membrana heptalaminada dentro de las 3 h de la penetración en la piel. Además pierde el glucocáliz rico en carbohidratos, y se convierte en intolerante al agua [56, 73]. Dependiendo

I.2. Esquistosomosis

de la especie de esquistosomas, la esquistosómula reside en la piel entre uno y varios días antes de entrar al lecho vascular. Un pequeño porcentaje puede entrar en los vasos linfáticos, llegando después al torrente sanguíneo a través del conducto torácico. Una vez en el torrente sanguíneo, se piensa que su migración a los capilares del pulmón es totalmente pasivo, debido principalmente al alargamiento del cuerpo y a la pérdida de espinas.

Mucho de lo que sabemos acerca de la vía de migración temprana de la esquistosómula se deriva de estudios en animales de experimentación. Los primeros estudios de recuperación del parásito dependían de la disección de tejidos, contando los vermes a diferentes tiempos después de la exposición a las cercarias. Debido a la naturaleza de este proceso, muchos organismos no podían ser aislados. No fue hasta la década de 1980, cuando se desarrollaron las técnicas de imagen cuando se aclararon algunos aspectos de esta infección [84–86]. De las cercarias que penetran en la piel, un 35% a 50% maduran a la etapa de verme adulto, aunque los porcentajes pueden variar dependiendo de la cepa de cercaria y de la edad del animal utilizado como hospedador [87, 88]. El resto probablemente nunca llega al hígado, recirculando en sangre y quedando atrapadas en otros tejidos.

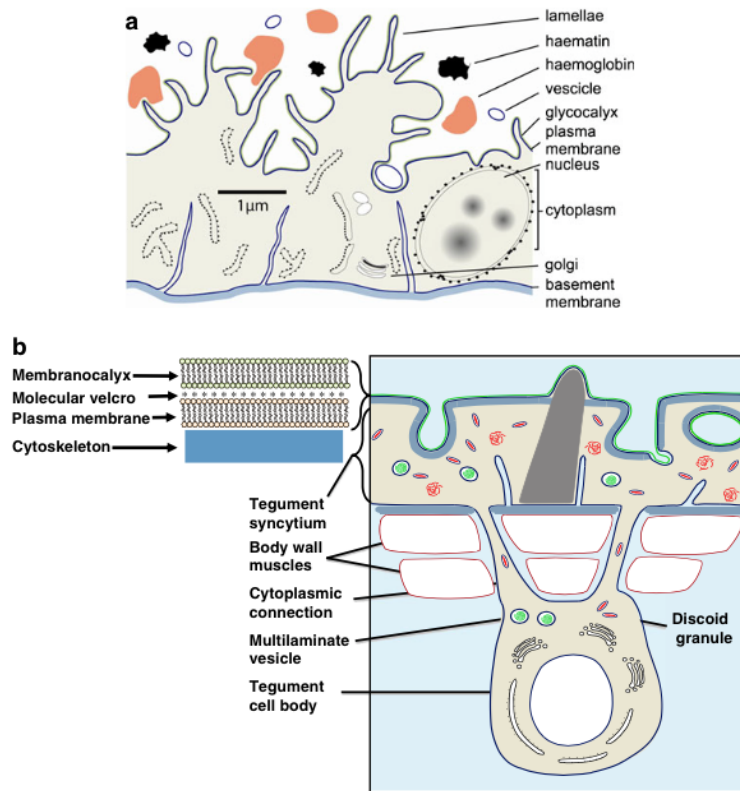


Figura I.5: Representación esquemática del epitelio sincitial del tegumento e intestino de *Schistosoma* spp. Dibujo tomado de Wilson et al. 2011 [89]. El revestimiento sincitial del intestino (a), es rico en retículo endoplásmico y aparato de Golgi, indicativo de su actividad biosintética. La superficie luminal se extiende por la presencia de una lamina fina citoplasmática a la que los eritrocitos se adhieren en su estroma. El contenido de los lisosomas se secretan en el lumen intestinal, y tiene un pH ácido, donde la hidrólisis de sangre ingerida se lleva a cabo. Actividad endocítica también se produce en la superficie luminal, potencialmente receptor-mediada. La superficie apical del tegumento (b), está delimitado por una membrana de plasma normal cubierta por una secreción laminada o también llamada membranocálix y se origina en las vesículas multilaminares producidos por los cuerpos celulares. El núcleo y los ribosomas del sincitio tegumental están en los cuerpos celulares, los cuales se localizan debajo de la capa muscular y se conectan con el sincitio citoplasmático a través de conexiones citoplasmáticas.

I.2.1.1.4 Vermes adultos

Existe una amplia información de las técnicas de obtención de vermes adultos de esquistosomas en el laboratorio [90, 91], y es el verme por excelencia más utilizado como un buen modelo en el campo de la inmunología parasitaria. El macho puede desarrollarse plenamente en la ausencia de la hembra, pero la hembra se atrofia y no alcanza la madurez sexual en ausencia del macho. En una infección bisexual, la hembra madura extendida dentro del canal llamado ginecóforo del macho, luego ambos se encuentran en una constante cópula y este emparejamiento es necesario para el desarrollo físico y reproductivo de la hembra. Se cree que los vermes se emparejan en el hígado antes de migrar a su destino final, el de las venas mesentéricas (*S. mansoni* y *S. japonicum*), o las venas del sistema urogenital (*S. haematobium*). El tamaño de los vermes adultos varía dependiendo de las especies y de la edad de los parásitos (ver tabla I.1). Los vermes machos son más cortos que las estrechas y alargadas hembras, con dos ventosas de gran tamaño, una oral y otra ventral, que permite su adherencia al epitelio del sistema vascular. Los parásitos adultos pueden vivir en los seres humanos durante varias décadas. El promedio de vida del verme adulto se encuentra alrededor de los 5 años. Sin embargo, existen estudios que demuestran que los vermes adultos viven 30 años o más, debido a la detección de huevos en individuos infectados

que no vivían en zonas endémicas de la infección [92–94].

Los esquistosomas presentan varias estructuras anatómicas. Una de las más importantes que recubre todo el parásito, se denomina tegumento (figura I.5). La integridad y la función de esta membrana es crítica para la supervivencia y proliferación de los esquistosomas. El tegumento de los vermes adultos consiste en un citoplasma sincitial cubierto por una doble bicapa lipídica y a la vez recubierta por membranocálix secretado [89, 95–97]. De hecho, la estructura de doble membrana externa (doble bicapa lipídica) es una estructura inusual propia solo de trematodos que viven dentro de los vasos sanguíneos [98]. Esta desempeña funciones vitales como la evasión del sistema inmune, la adquisición de nutrientes, la excreción de productos catabólicos, la absorción dirigida de fármacos y otros procesos fisiológicos, de los cuales hablaremos más adelante cuando describamos algunas de las funciones relacionadas con el metabolismo de los lípidos de estos parásitos [89, 96, 99–102].

I.2.1.1.5 Huevos

Las hembras de esquistosoma producen huevos continuamente, y las hembras de *S. mansoni* llegan a producir hasta 300 huevos embrionados por día. Su morfología es clave para el diagnóstico de cada especie. Los huevos de *S. mansoni* son alargados con una espina lateral prominente cerca del extremo posterior, a diferencia de los huevos de *S. japonicum* que son

I.2. Esquistosomosis

ovalados y más pequeños, con una rudimentaria (no siempre observable) espina lateral. Los huevos de *S. haematobium* son alargados y poseen una espina terminal en el extremo posterior. EL tamaño del huevo de *S. mansoni* y *S. haematobium* es aproximadamente el mismo, mientras que los de *S. japonicum* no son tan grandes (Tabla I.1). Cada huevo contiene un embrión, el miracidio, que llena casi todo su espacio interior, como se muestra en la figura I.3 A, que corresponde a un huevo de *S. mansoni*. Para que un huevo pase desde el cuerpo y llegue al agua dulce, debe tener acceso desde el sistema venoso sanguíneo hasta el lumen intestinal en el caso de *S. mansoni* y *S. japonicum*, o desde el tracto urogenital a la vejiga para *S. haematobium*. Los depósitos de huevos de los vermes hembra se ubican cerca a la pared venosa, y puesto que los huevos no son móviles, se cree que deben atravesar las paredes del tejido mediante una o varias combinaciones de mecanismos. Enzimas secretadas por el huevo, probablemente juegan un papel importante en su migración a través del tejido. Además, hay buena evidencia de que la propia respuesta inmune inflamatoria del hospedador (granulomas) sirve para acelerar la migración a lo largo de los tejidos o su expulsión al ambiente para continuar el ciclo de vida del parásito [60]. La raíz del problema es que no todos los huevos son excretados, y una gran mayoría se encuentran atrapados en varios tejidos. El evento patogénico principal de la esquistosomosis, es el resultado de la deposición de huevos en los tejidos y la respuesta del hospedador a ellos.

I.2.1.2 Epidemiología

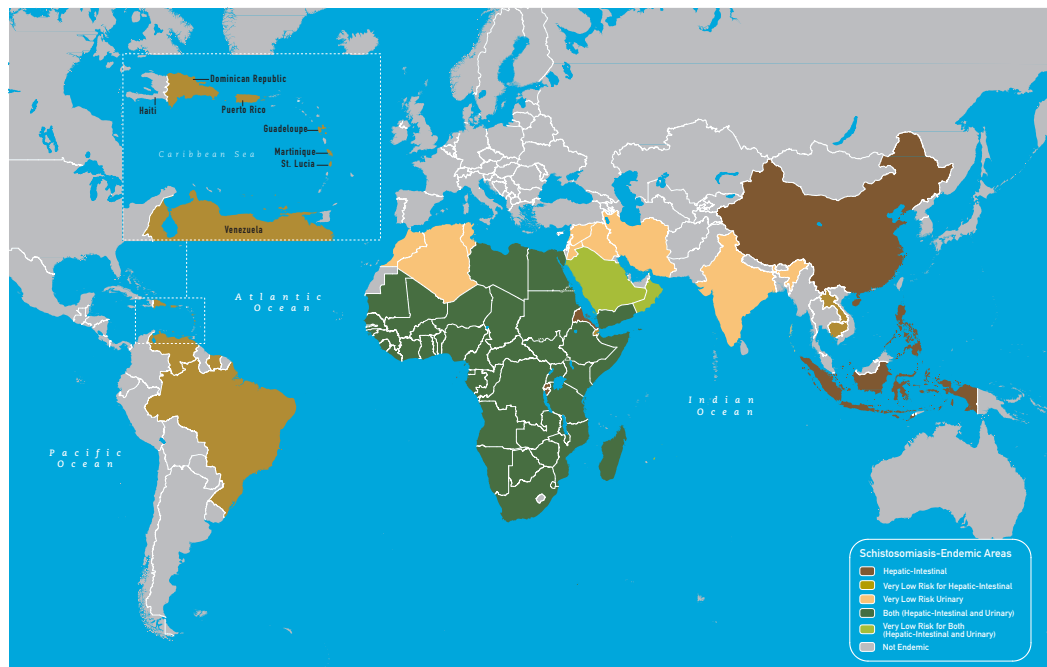


Figura I.6: Distribución geográfica de la esquistosomosis. Imagen tomada de: CDC Health Information for International Travel 2014 (Yellow Book).

La OMS estima que la esquistosomosis es endémica en 74 países (ver figura I.6) y afecta al menos 230 millones de personas en sus áreas rurales y zonas periféricas de muchas ciudades (80% en el África subsahariana). De estos, aproximadamente 120 millones tienen síntomas de la enfermedad, y unos 20 millones tienen enfermedad grave, lo que resulta en alrededor de

I.2. Esquistosomosis

280.000 muertes al año [8,54,103–107]. La mayor parte de la morbilidad de las esquistosomosis es debida a los resultados de la respuestas inmune y en el curso de la infección que conduce a la formación de granulomas y posterior fibrosis [57, 108, 109]. La distribución geográfica de las diferentes especies de esquistosomas depende del clima, la calidad del agua y otros factores ecológicos que regulan la población de caracoles, así como de los patrones de suministro de agua y saneamiento. Las cinco principales especies de *Schistosoma* poseen una distribución diferente a nivel mundial [110,111].

S. haematobium:

- ✓ Esta distribuido en toda África: Existe riesgo de infección en el sur y África subsahariana, incluyendo los grandes lagos y ríos. La transmisión también se produce en el valle del río Nilo en Egipto y la región del Magreb del norte de África.
- ✓ Se encuentra en la zonas del Oriente Medio, Corsica (Francia).

S. mansoni:

- ✓ Se distribuye ampliamente en toda África subsahariana, incluyendo los grandes lagos y ríos, la transmisión también ocurre en el valle del río Nilo en Sudán y Egipto.
- ✓ En América del Sur: entre ellos Brasil, Surinam y Venezuela.
- ✓ En las islas del Caribe de República Dominicana, Guadalupe, Martinica y Santa Lucía, en las cuales existe un riesgo bajo.

S. japonicum:

✓ Se encuentra en Indonesia, partes de China y el sudeste Asiático.

S. mekongi:

✓ Se encuentra en Camboya y Laos (delta del río Mekong).

S. intercalatum:

✓ Se encuentra en focos aislados en la parte Central y Occidental de África.

En Europa existen varios estudios de casos importados, principalmente de África. Según Grobusch et al. [112], en el año 2003, se informaron de 412 pacientes positivos a esquistosomosis, datos recopilados por *the European Network on imported Infectious Diseases Surveillance (TropNetEurop)*. Estudios realizados por Roca et al. [113], en Barcelona, indican la existencia de 200 casos acumulados en inmigrantes y 80 casos en viajeros durante 11 años. Además, en el *Institute of Tropical Medicine Antwerp (IMTA)* y *the University Hospital Antwerp (UHA)* de Bélgica, se realizó un estudio prospectivo de 4,5 años con 1.640 pacientes que presentaron episodios febriles, de los cuales 28 (1,7 %) de estos fueron diagnosticados como fiebre de Katayama [114]. Dicho estudio realizó el seguimiento a 23 pacientes que eran nativos de países europeos, con una edad media de 31 años (rango: 18-52 años). En este estudio se utilizó un protocolo de tratamiento combinado de PZQ y un corticoide.

I.2.1.3 Respuesta inmunopatológica en la esquistosomosis

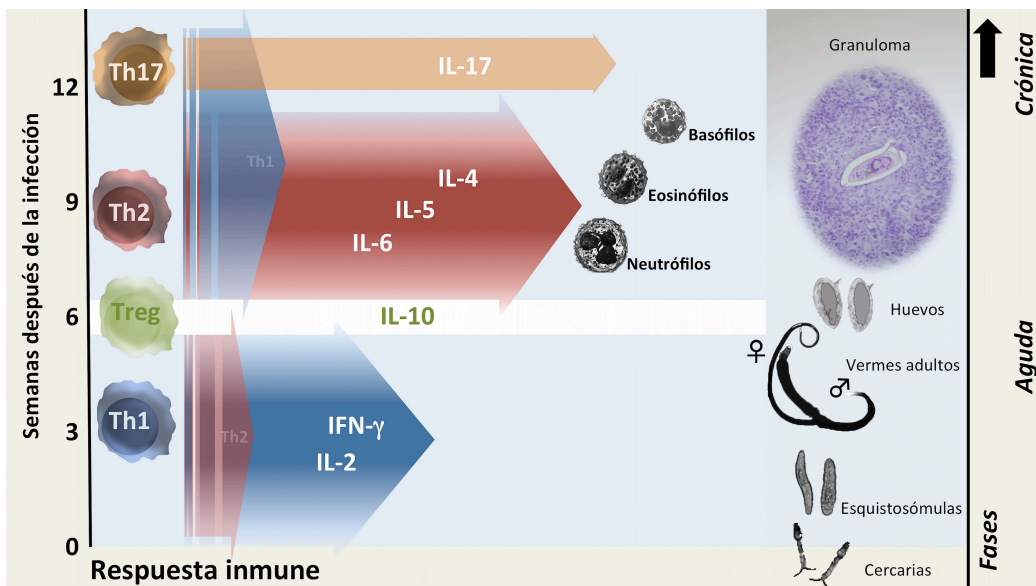


Figura I.7: Vista esquemática de la respuesta inmune a la infección por *S. mansoni*.

El sistema inmunológico de los hospedadores definitivos que adquieren la esquistosomosis se enfrentan a varias etapas del ciclo de vida del parásito como se mencionó antes: la penetración de las cercarias, la migración de las esquistosómulas, los vermes adultos y los huevos producidos por las parejas de estos últimos. Todas estas etapas expresan cientos de antígenos, muchos de los cuales son reconocidos por el sistema inmunológico del

hospedador. Algunas de estas respuestas siguen aumentando durante la infección crónica, y otras ocasionan una fuerte regulación para disminuir su expresión [57]. La mayor parte de nuestra comprensión de la respuesta inmune en humanos a los esquistosomas ha sido gracias a la disponibilidad de los modelos murinos de infección experimental en el estudio de su respuesta inmune frente a las diferentes fases del ciclo biológico del parásito (figura I.7).

La dermatitis cercariana es una respuesta de hipersensibilidad mediada por Ig E, y dirigida contra las cercarias que han logrado entrar en la piel [115]. Tras su adhesión, las cercarias de *S. mansoni* exponen ácido linoleico que induce una producción de prostaglandinas E2 (PGE2) por parte los queratinocitos de ratones y humanos, que a la vez actúa como inmunosupresores de la Interleucina-10 (IL-10) [116]. *In vivo*, las proteínas derivadas de las cercarias, interactúan con los receptores TLR2 (del inglés *Toll-Like Receptor 2*) y TLR4 (del inglés *Toll-Like Receptor 4*) ubicados en las superficies de las membrana de las células de Langerhans y queratinocitos, además de la lectina de unión a la manosa (MBL) (del inglés *mannan binding lectin*), dando lugar a la producción de óxido nítrico, citocinas inflamatorias, IL-10 y PGE2 [116, 117]. Después de la invasión de la piel del hospedador por parte de las cercarias, estas se transforman en esquistosómulas y liberan grandes cantidades de proteínas que pueden activar las células en los ganglios linfáticos, y se ha observado en ratones vacunados con cercarias irradiadas, que en respuesta a lo anterior se

presenta un aumento de $\text{INF}\gamma$ [118].

La oviposición en los tejidos es un estímulo importante para la afluencia de células del sistema inmune que conduce al desarrollo de una reacción granulomatosa. Esta reacción inmunológica protege al hospedador mediante la neutralización de antígenos de los huevos de esquistosoma. Sin embargo, provocan una reacción celular mediada por subpoblaciones linfocitarias CD4^+ , debido a la inflamación granulomatosa hepática, que es la consecuencia patológica más importante de la enfermedad [59, 60, 119]. Además, paradójicamente, el desarrollo de la inflamación granulomatosa alrededor de los huevos del parásito tiene un elemento adicional de protección que facilita la excreción de los huevos del hospedador [60, 105, 120]. Dos principales condiciones clínicas son reconocidas en individuos infectados por *S. mansoni*: la esquistosomosis aguda y la esquistosomosis crónica, de las cuales se hablara más adelante. La producción de citocinas por células mononucleares de sangre periférica después de la estimulación con antígeno inicialmente de las formas inmaduras o esquistosómulas del parásito, refleja una respuesta Th1 dominante, con la producción de Interferón- γ ($\text{INF}\gamma$) e Interleucina-2 (IL-2) [121]. Por lo tanto, durante la fase aguda de la enfermedad hay un predominio de una respuesta Th1, consecuencia de ello se detectan niveles elevados de citocinas Th1 en el plasma [120]. Luego, en la progresión natural de la enfermedad, después de que los parásitos maduran, se aparean y comienzan a producir huevos (entre la quinta a sexta semana posterior a la infección), la respuesta Th1

inicial es seguida por un desarrollo de respuesta Treg y Th2, respuestas que regulan la producción de mediadores pro-inflamatorios Th1 con el acompañamiento de la formación de granulomas [59, 122–124] (figura I.7). Las respuestas Treg y Th2 comparten algunas características, como su capacidad de sintetizar IL-10 a través del cual se suprime el desarrollo de respuestas Th1 a los antígenos del huevo de esquistosoma, y por tanto cooperan en la polarización Th2 que caracteriza la respuesta inmune en ratones infectados por esquistosomas [125]. La producción de IL-10 durante este último período parece tener un papel importante en la formación de granulomas hepáticos y en la regulación de respuestas $CD4^+$, así como en la transición del estado de enfermedad aguda a crónica [120, 126–130]. En el modelo de ratón, ambas citocinas producidas por las células Th1 y Th2 pueden orquestar el desarrollo del granuloma [60, 119, 130, 131]. Las respuestas de tipo Th2 se caracterizan típicamente por el aumento de los niveles de Interleucina-4 (IL-4) y de otras citocinas (incluyendo IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13), la activación y la expansión de las células $CD4^+$, Th2, las células plasmáticas secretoras de IgE, eosinófilos, mastocitos y basófilos [60, 132] (figura I.7). La Interleucina-17 (IL-17) es la marca de citocinas proinflamatorias de la subpoblación linfocitaria Th17 [133–135]. La respuesta Th17 juega un papel importante para el despliegue completo de la inflamación [136] y para el desarrollo de la forma grave de la esquistosomosis [137] (figura I.7). La explicación de inmunomodulación inducida en la esquistosomosis humana o murina podría conducir al desarrollo de fármacos

I.2. Esquistosomosis

o vacunas útiles en otras enfermedades granulomatosas [60, 115, 138].

Los esquistosomas han desarrollado diversos mecanismos de evasión con los que neutralizan o manipulan a los efectores inmunitarios desarrollados por el hospedador. Señalaremos los principales, y en su mayoría se encuentran asociados al tegumento [139, 140]:

- El recambio del membranocálix puede servir al parásito para deshacerse de los anticuerpos y componentes del sistema del complemento adheridos a su superficie y evitar así los efectos dañinos ocasionados por los mecanismos inmunológico [141]. Además de la síntesis o adquisición de moléculas reguladoras capaces de inactivar la convertasa de la vía interna del complemento mediante la adquisición de moléculas CD55 o también conocida como DAF (del inglés *Decay Accelerating Factor*) [141, 142].
- Los esquistosomas esta cubiertos por lípidos del hospdador (LDL), que dificultan la unión a anticuerpos, y también adquieren antígenos de histocompatibilidad de clase II , antígenos del grupos sanguíneos A, B, H o proteínas reguladoras del complemento [120, 141, 143, 144].
- Además de adquirir moléculas del hospedador, los esquistosomas son capaces de generar respuestas ineficaces para el control de la infección. Se ha comprobado que generan anticuerpos de los isotipos IgG2, IgG4 o IgGM que actúan bloqueando la citotoxicidad antiparasitaria mediada por IgE, IgG1 o IgG3 [139].

-
- Los esquistosomas también expresan en su tegumento enzimas con actividad oxido-reductasa, como la Glutación-S-transferasa, la tioredoxin peroxidasa y la superoxido dismutasa que utilizan para protegerse del estrés oxidativo desencadenado en la respuesta inmune celular [145,146].

I.2.1.4 Manifestaciones clínicas

Se puede dividir en tres fases: fase de inicio o también denominada dermatitis cercariana o prurito del bañista, fase aguda o síndrome de Katayama y esquistosomosis crónica. En la zona de la piel por donde penetran las cercarias, pueden aparecer lesiones cutáneas pruriginosas tipo macular o maculo papular. En personas que han sido previamente expuestas y por lo tanto están sensibilizadas, el prurito puede persistir por algunos días. En las zonas endémicas, esta dermatitis cercariana pueden pasar desapercibida. El síndrome en la fase aguda que comúnmente se conoce como fiebre de Katayama [147,148], dicho nombre se atribuye a la ubicación original en donde fue descrito hace más de 100 años (distrito de Katayama, Hiroshima, Japón), es una reacción de hipersensibilidad sistemática que aparece entre la segunda a la octava semana después de la exposición a las cercarias, y su migración a través del torrente sanguíneo y posterior transformación como se mencionó con anterioridad

I.2. Esquistosomosis

en esquistosómulas. Es poco frecuente en la población endémica (debido al infradiagnóstico o sensibilización intrauterina) y más común entre las personas que no han estado expuestas previamente, tales como los turistas que entran en contacto con agua infectada. Se caracteriza principalmente por fiebre, lesiones cutáneas, afectación pulmonar (tos, disnea) y eosinofilia. Los pacientes además de presentar fiebre, pueden también manifestar escalofríos, linfadenitis, dolor de cabeza, dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y hepatomegalia.

Las lesiones graves o esquistosomosis crónica, se manifiestan meses o años después de la infección, y es debido a los huevos que permanecen atrapados durante un largo período de tiempo en hígado, bazo e intestino. Aparte de las manifestaciones digestivas o urinarias, se han reportado otros lugares menos comunes, como los pulmones, los genitales o el cerebro. Estos huevos liberan enzimas proteolíticas que provocan una eosinofilia y reacciones inflamatorias granulomatosas. Esto afecta comúnmente a las personas que están continuamente expuestas a la infección en zonas endémicas. Entre los niños, la presentación clínica de la esquistosomosis crónica varía mucho, aunque los casos con un alto grado de parasitación normalmente presentaron anemia, desnutrición y retraso del crecimiento. Muchos de estos casos pediátricos son reversibles con el tratamiento adecuado. Por otra parte, se ha informado la transmisión vertical de la enfermedad en mujeres gestantes.

Patrones de transmisión en áreas altamente endémicas comúnmente

muestran que el 60-80% de los niños en edad escolar están infectados, mientras que en el 20-40% de los adultos infectados permanecerá activa [149–151]. Al ser los menores de edad los más afectados en áreas endémicas, son los que más padecen las consecuencias graves de la enfermedad como alteraciones graves hepatoesplenomegalias, e incluso en algunos países como Brasil, han desarrollado técnicas quirúrgicas para evitar la pérdida o extirpación del bazo, ya que habitualmente en pacientes con esquistosomosis crónica, se les realizaba la esplenectomía. Debido a los daños ocasionados por la hipertensión portal de la fibrosis hepática consiguiente por el efecto de miles de huevos de *S. mansoni* atrapados en este órgano [152–157].

La esquistosomosis intestinal es producida por *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi*. Las áreas en las que se encuentra con mayor frecuencia son las membranas mucosas del intestino grueso y el recto, donde se produce una inflamación granulomatosa, con pseudopólipos y microulceraciones. Las manifestaciones clínicas incluyen dolor debido a cólico abdominal, diarrea, y a veces la presencia de sangre en las heces.

La esquistosomosis urogenital es una condición que se produce exclusivamente por la especie *S. haematobium*. La hematuria es un signo inicial de la esquistosomosis urogenital. En casos avanzados, un signo frecuente es la fibrosis vesical, que a su vez puede provocar hidronefrosis. Los síntomas y signos incluyen disuria, hematuria microscópica y macroscópica, infecciones urinarias secundarias y dolor pélvico inespecífico. Aproximadamente la mitad de todos los niños infectados desarrollan

I.2. Esquistosomosis

patología del tracto urinario, incluyendo pielonefritis, hidronefrosis uretral, pseudo papilomas, síndrome nefrótico, etc. Las mujeres con esquistosomosis urogenital pueden presentar lesiones genitales, hemorragias vaginales y nódulos vulvares. Alteraciones vaginales provocadas por la infección por esquistosoma crónica pueden triplicar el riesgo de infección por VIH. Entre los hombres, puede causar trastornos de las vesículas seminales y de la próstata y la infertilidad masculina consecuente. La insuficiencia renal crónica y el carcinoma de células escamosas de la vejiga son otras posibles complicaciones a largo plazo [65,158].

I.2.1.5 Diagnóstico

La esquistosomosis se diagnostica habitualmente mediante la detección microscópica de huevos, en muestras de heces en el caso *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*, o en orina cuando se trata de *S. haematobium*. Numerosas técnicas han sido desarrolladas para detectarlos; la más utilizada es la de Kato-Katz, en la que se examina microscópicamente una muestra de 50 mg de heces, con una sensibilidad de aproximadamente 30 huevos/g de heces. Para el caso de *S. haematobium*, se requiere de técnicas de concentración (sedimentación, filtración o centrifugación) para visualizar los huevos bajo el microscopio. Se debe intentar recoger las muestras entre las 10 y 14 h, ya que aumenta la

emisión de huevos a causa del ritmo circadiano del parásito.

El diagnóstico en fase aguda de personas que viven en zonas no endémicas o de baja transmisión se basa en un cuadro clínico compatible y una buena anamnesis de individuos que han presentado un significativo contacto con agua dulce (actividades agrícolas o de recreación y deporte). Los anticuerpos y/o antígenos detectados del parásito en muestras de sangre u orina son también indicadores de infección. El método más utilizado en el diagnóstico inmunológico directo se realiza a través de la detección de dos glicoproteínas denominadas antígenos circulantes anódico (CAA) y catódico (CCA). Estas proteínas se liberan en el intestino de las formas inmaduras y vermes adultos viables, por lo tanto pueden proporcionar información sobre infecciones activas y su intensidad [159–162]. Para la detección de anticuerpos (IgG) en sangre, se han desarrollado una variedad de antígenos de esquistosomas y se suele realizar mediante ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), que puede confirmarse con inmunoblot. La serología acostumbra a dar positivo entre 4-6 semanas tras el contacto, por lo que en numerosas ocasiones su utilidad es únicamente como diagnóstico de confirmación.

Las técnicas moleculares para la detección de ADN de esquistosoma en muestras de heces, orina o sangre, aumentan la sensibilidad y especificidad, pero son costosas y todavía existen algunas limitaciones en los muestreos [163, 164]. El reciente desarrollo de técnicas de diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son bien acogidas,

pero estos ensayos todavía tiene limitaciones en lo que se refiere al tipo de muestra a analizar [57]. Los estudios más recientes están dirigidos al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas con alta sensibilidad, especificidad y de fácil uso para la identificación temprana de la infección por esquistosomas. Consisten en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas (LAMP) (del inglés *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) [165–167]. Algunas de las ventajas de la técnica de LAMP frente a PCR, es principalmente sus bajo costo y facilidad de aplicación en campo. Existe una reciente técnica diagnóstica, pero adolece de similares desventajas mencionadas para PCR. Consiste en realizar una espectrometría de masas de alta resolución utilizando un equipo de HPLC (del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*), para comparar los perfiles lipídicos de muestras de orina control de hospedadores no infectados e infectados. Son por el momento realizadas de forma experimental. [168].

I.2.1.6 Tratamiento de la esquistosomosis

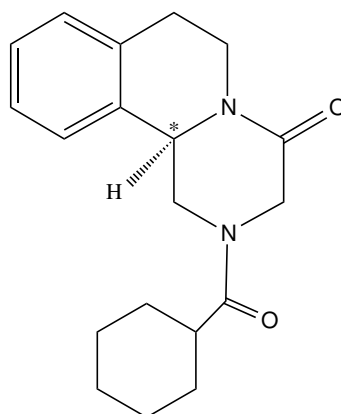
Durante la década de 1970, en los laboratorios farmacéuticos alemanes de E. Merck, Darmstadt [169] y Bayer A.G. Leverkusen [170], se sintetizaron una serie de compuestos derivados del sistema de anillos isoquinolina-pirazina (estructura del núcleo del Praziquantel, Figura I.8), moléculas con un potencial efecto sedante. Un acuerdo entre las dos empresas alemanas permitió el hallazgo *in vivo* por parte de Bayer, de la actividad antihelmíntica de estos productos químicos. Estos resultados fueron publicados en 1977 [170, 171], donde se informó de los primeros estudios realizados en voluntarios humanos en 1978 [172]. En estrecha cooperación con la OMS, se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos en zonas endémicas de *S. mansoni* [173], *S. haematobium* [174] y *S. japonicum* [175]. Todos estos ensayos, así como las cantidad de numerosos estudios posteriores, fueron extremadamente exitosos e identificaron claramente al Praziquantel (PZQ) como el fármaco de elección para el tratamiento de la esquistosomosis, además de poseer un amplio espectro de acción contra otros helmintos. El compuesto fue patentado en diciembre de 1973 en Alemania y en 1977 en los EE.UU [170].

El PZQ 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino (2,1-a)isoquinolina-4-uno (figura I.8), es un polvo de color blanco casi

I.2. Esquistosomosis

cristalino de sabor amargo. La preparación comercial del compuesto es una mezcla racémica de partes iguales de “levo ” R (-) y “dextro” S (+) isómeros. Dicho compuesto es estable bajo condiciones normales y es prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol y soluble en disolventes orgánicos como cloroformo, dimetilsulfóxido y propilenglicol. Sólo el enantiómero (-) está dotado con la actividad anti-esquistosoma, como fue demostrado experimentalmente *in vitro* e *in vivo* [176–179]. Los dos isómeros, sin embargo, tienen esencialmente la misma toxicidad [177], y de hecho Wu et al. (1991) [179], encontraron que los pacientes tratados con 20 mg/kg (-)-PZQ tenía la misma tasa de curación, pero menos efectos secundarios que los pacientes tratados con 40 mg/kg de la preparación racémica.

Formula: C₁₉H₂₄N₂O₂
Peso molecular: 312,41 g/mol



Praziquantel: (R)-2-(ciclohexanecarbonyl)-11b-methyl-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-one

Figura I.8: Estructura química del estereoisómero activo de praziquantel, el (*) indica la posición 11b, donde se encuentra el átomo de carbono asimétrico [180].

La dosis recomendada es de 40 a 60 mg/kg de peso corporal, cantidad utiliza generalmente para infecciones por *S. mansoni* y *S. haematobium*, mientras que la dosis más alta se recomienda especialmente para los esquistosomas asiáticos (*S. japonicum* y *S. mekongi*) [181]. La biodisponibilidad de PZQ aumenta con la administración concomitante de alimentos [182]. Se administra por vía oral, su absorción es rápida dado que se detectan cantidades del fármaco en sangre 15 minutos después de la dosificación [172,183]. La concentración máxima en plasma después de una dosis normal de 40 mg/kg muestra amplias variaciones interindividuales en el rango de 200-2.000 ng/mL [184]. Es metabolizado en hígado, desaparece

I.2. Esquistosomosis

rápidamente de la circulación y tiene una vida media en plasma que generalmente fluctúa entre 1 y 3 h. Se elimina fundamentalmente a través de la orina y las heces en más de un 80%, después de 24 h [185]. El mecanismo de acción aun está sin resolverse, aunque parece que aumenta la permeabilidad de la membrana creando canales neuromusculares, lo que produce hiperpolarización y parálisis muscular [186].

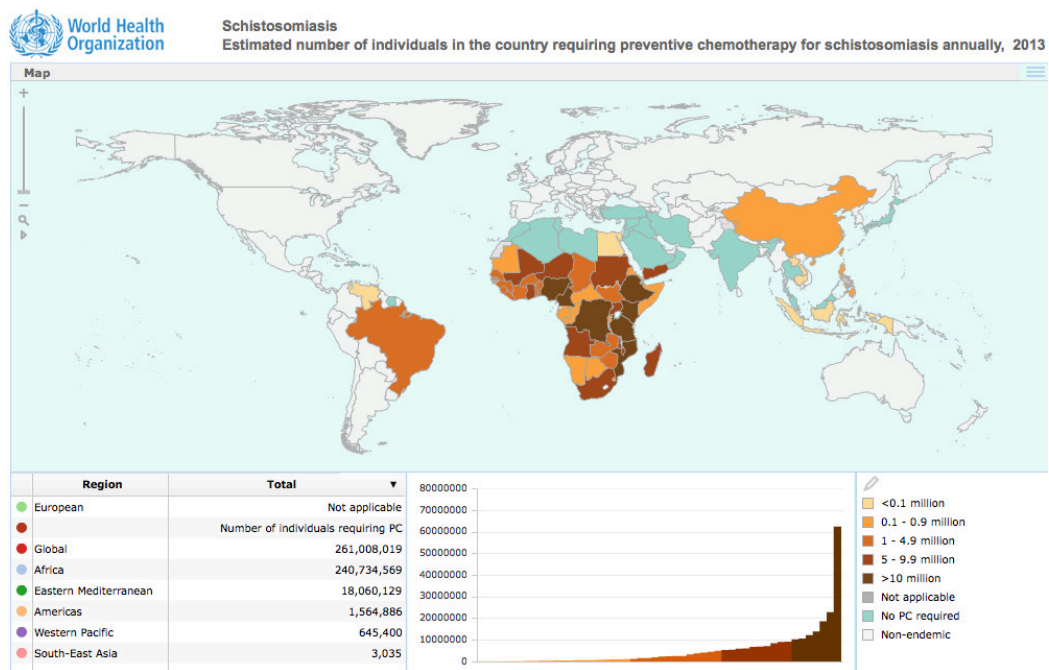


Tabla I.2: Número estimado de personas clasificadas en diferentes colores por países que requieren de una quimioterapia preventiva (PC) de forma anual, en el control de las esquistosomosis de zonas endémicas a nivel mundial. OMS, 2013.

Existen otros compuesto para el tratamiento de las esquistosomosis como la Oxamniquina (OXA) que se utilizó mucho antes de la introducción del PZQ, los derivados de la artemisinina y la mefloquina, conocidos por su actividad antimalárica. Recientemente a los oxadiazoles se les atribuye un efecto inhibidor de la actividad de la enzima tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), pudiendo ser potenciales agentes esquistosomicidas [186,187]. Por tanto, el PZQ es actualmente el único fármaco disponible y se distribuye a través de los programas de administración masiva a millones de personas cada año [188], lo que aumenta el riesgo de resistencias [186,189]. Los vermes adultos son muy sensibles a PZQ, pero desafortunadamente este fármaco tiene una menor actividad contra las etapas inmaduras como esquistosómulas. En la página web de la OMS [188], se puede consultar estimaciones de parámetros estadísticos epidemiológicos por cada país de varias enfermedades, incluida la esquistosomosis. En la tabla I.2, se muestra un mapa mundial con las zonas endémicas y no endémicas de la enfermedad. Además se observan tres tablas donde se aprecian los cálculos y las cifras estimadas para el año 2013. En la actualidad, se presenta una necesidad urgente de tratamientos alternativos para la esquistosomosis y en general se puede concluir que existen evidencias de una resistencia real contra praziquantel, pero aún no es tan dramática [106].

MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN PARÁSITOS

En los últimos años se han modificado las definiciones clásicas de la muerte celular, debido a la combinación de numerosos estudios en los cuales se han logrado rápidos avances científicos sin precedentes respecto a la aplicación de nuevos enfoques de las observaciones de los sistemas biológicos, combinando experimentos “*in vitro* e *in vivo*” con análisis computacionales “*in silico*” [190]. Esto ha sido posible gracias a la reciente secuenciación de los genomas de varias especies de animales, generando nuevos conocimientos y comprensión sobre los mecanismos de señalización de vida y muerte celular. De esta manera, la distinción clásica entre la apoptosis definida como muerte celular programada o del inglés *Programmed Cell Death* (PCD) y la necrosis, es debido a que la apoptosis es la muerte celular que transcurre por mecanismo regulados, y la necrosis es la muerte no regulada o accidental

[191]. En la actualidad estos criterios clásicos no son válidos, ya que se ha ido descubriendo moléculas implicadas en la regulación de los diferentes mecanismos de muerte celular. La diversidad en las definiciones lleva a la confusión, en particular sobre la terminología específica. Es por esto por lo que se pretenden unificar los nuevos criterios para la evaluación de los mecanismos de muerte celular, lo que conllevó a que se organizaran grupos de expertos como el Comité de Nomenclatura de la Muerte Celular o del inglés *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD), en donde se generan una serie de recomendaciones para aclarar dichas definiciones y el uso apropiado en la terminología relacionada con la muerte celular [192, 193].

I.3. Mecanismos de muerte celular en parásitos

I.3.1 Muerte celular por necrosis

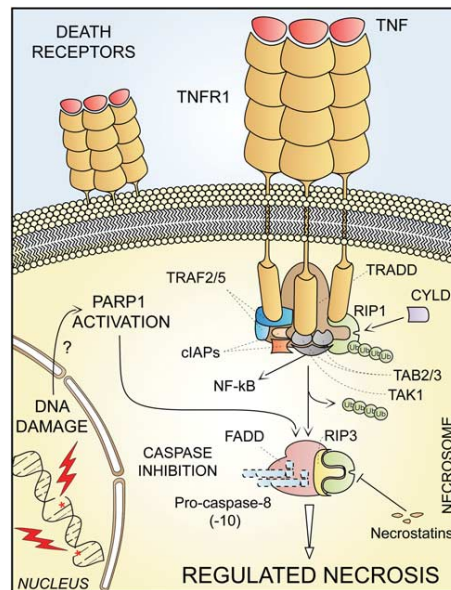


Figura I.9: Necrosis regulada. Figura tomada de Galluzzi et al. 2012 [193], donde se observa un ejemplo de muerte celular por necrosis regulada.

Durante mucho tiempo, la necrosis se ha considerado como un mecanismo de muerte celular simplemente accidental no regulado y fue definida como la ausencia de rasgos morfológicos de la apoptosis o autofagia [192]. Es una forma patológica de muerte celular que se produce tras daño celular grave y se caracteriza por un aumento rápido de volumen celular (oncosis) y su lisis, desencadenando una reacción inflamatoria.

Debido al trabajo de varios laboratorios [194,195], ahora está claro que la necrosis también puede producirse de una manera regulada, y que la muerte celular necrótica tiene un papel destacado en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Un ejemplo es la muerte celular de los condrocitos que facilita el crecimiento de los huesos [196], pero también el que se asocia a los procesos inflamatorios crónicos de la poliposis adenomatosa. Existen varios factores inductores de la **necrosis regulada**: alquilación en el ADN (figura I.9), excitotoxicidad y la unión a los receptores de muerte [193].

El término “necroptosis” se ha utilizado recientemente como un sinónimo de necrosis regulada, el cual fue introducido para referirse en forma específica en células donde se activa TNF- α (del inglés *Tumor Necrosis Factor- α*) y a continuación dicho proceso es inhibido de forma química utilizando necrostatin 1, quien a la vez actúa inhibiendo a RIP1 (del inglés, *receptor-interacting protein 1*). Sin embargo Galluzzi et al. [193], recomiendan que “necroptosis” se puede utilizar también en aquellos casos de necrosis regulada, cuando se inhibe tanto RIP1 como RIP3.

Se ha comprobado que el mecanismo que lleva a morir una célula por necrosis en mamíferos es bastante conservado biológicamente y también se presenta en parásitos. En *C. elegans*, se han realizado experimentos para hacer tal aseveración. Además se ha usado como un buen modelo no mamífero comparativo para investigar diferentes mecanismos de muerte celular [197–200].

I.3.2 Muerte celular por autofagia

Sobre la base de las características morfológicas, el termino “muerte celular autofágica” ha sido ampliamente utilizado para indicar los casos de muerte celular que se acompañan de una vacuolización citoplasmática masiva (“comerse a uno mismo”, del griego auto “actuar sobre si mismo” y phagos “comer”) y se ha clasificado como una alternativa de muerte celular programada. Este mecanismo es inducido en condiciones microambientales adversas limitantes de nutrientes y cuando se debe elimine una organela con alteraciones funcionales hace que los constituyentes celulares se reciclen proporcionando una fuente de energía alternativa durante periodos de estrés metabólico, participando en el mantenimiento de la homeostasis y viabilidad celular. Es más, la autofagia podría asumir el papel de ruta suicida cuando algún componente de la apoptosis falle. Se acepta que la autofagia previene o retarda la apoptosis mediante inducción de proteínas de tipo Bcl-2 (por sus sigla en inglés de *B-cell lymphoma 2*), figura I.10. La autofagia media la involución de estructuras atávicas en *Drosophila melanogaster*. Se caracteriza por la presencia en el citoplasma de vesículas de doble membrana que se forman inicialmente a partir de las membranas del retículo endoplásmico que rodean a una región del citoplasma, en las que se engloban los componentes celulares, llamados autofagosomas (figura I.10), cuyo contenido es degradado por enzimas lisosomales. Una vez fusionados los autofagosomas con los lisosomas se

degradan las proteínas u organelas que habían sido autofagocitadas. Es importante tener en cuenta que en este conjunto de directrices el termino “autofagia” generalmente se refiere a lo que muchos autores denominan macroautofagia. Varios métodos se pueden utilizar para determinar si la vía de la autofagia se activa por encima de los niveles basales en el contexto de la desaparición celular y existen varias revisiones sobre el tema que pueden ser utilizadas como guías para monitorear el flujo de autofagia en determinados experimentos [201]. En la mayoría de los sistemas, atribuir la muerte a la autofagia basado únicamente en criterios morfológicos es insuficiente. La muerte celular autofágica sólo se puede demostrar como la muerte que está suprimida por la inhibición de la autofagia, ya sea a través de medios genéticos o químicos. Existen varias revisiones donde se demuestra que la muerte celular por autofagia ocurre en parásitos de los Phylum *Nematoda*, *Euglenozoa* y *Platyhelminthes* (figura I.1) [202–206].

I.3.3 Muerte celular por apoptosis

El término “**apoptosis extrínseca**” se ha utilizado ampliamente para indicar los casos de muerte celular apoptótica inducidas por señales de estrés extracelulares e interacciones mediadas por receptores transmembranales. La apoptosis extrínseca puede ser iniciada por la unión de ligandos letales como los denominados *Fas Ligand/CD95 Ligand* (FasL/CD95L), o también

I.3. Mecanismos de muerte celular en parásitos

factor de necrosis tumoral alfa o TNF- α y la superfamilia TNF ligando miembro 10, del inglés *Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 10* (TNFSF10) y el mejor conocido como ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, del inglés *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL), a varios receptores de muerte como FAS/CD95, receptor 1 de TNF- α (TNF-R1) y receptor TRAIL 1-2 (por sus siglas en inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand 1-2*) (figura I.10). En el modelo de FasL/Fas, la aglutinación del Fas ligando al receptor Fas causa la aglutinación de la proteína adaptadora (FADD, *Fas-associated death domain protein*) con otra proteína, procaspasa-8. Después de esto, se forma un complejo DISC (por sus siglas en inglés, *Death-inducing signalling complex*) y como resultado la procaspasa-8 se activa (figura I.10). Una vez que la procaspasa-8 se activa, la fase de ejecución de la apoptosis se inicia. Esta fase se considera la vía final de la apoptosis. Las caspasas de ejecución activan endonucleasas citoplasmáticas que degradan proteínas nucleares y del citoesqueleto. Caspasas-3, caspasas-6 y caspasas-7 funcionan como caspasas efectoras rompiendo varios sustratos que incluyen citoqueratinas, PARP (por sus siglas en inglés, *poly ADP-ribose polymerase*), proteína alfa fodrin, proteína nuclear NuMA, etc., causando cambios morfológicos y bioquímicos en las células apoptóticas.

La definición de "**apoptosis intrínseca**" dependiente o independiente de caspasa, puede ser desencadenada o activada por una plétora de condiciones de estrés intracelulares, incluyendo daño en el ADN,

estrés oxidativo, sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, excitotoxicidad leve (relacionada con la sobreestimulación de receptores de glutamato en el sistema nervioso), acumulación de proteínas desplegadas en el retículo endoplásmico y muchos otros. Aunque las cascadas de señalización que activan la apoptosis intrínseca son altamente heterogéneas en lo que se refiere a los estímulos que la inician, todos ellos están conectados en un mecanismo de control centrado en la mitocondria (figura I.10). Con frecuencia, junto con la propagación de la cascada de señalización pro-apoptótica, los mecanismos anti-apoptóticos permiten a las células hacer frente al estrés. En este escenario, señales tanto pro como anti-apoptóticas, convergen en las membranas mitocondriales, que se permeabilizan cuando la primera señal predomina sobre la segunda. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa MOMP (por sus siglas en inglés *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) puede comenzar en la membrana mitocondrial externa debido a la actividad formadora de poros de los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, tales como Bak y Bax, o puede ser el resultado de un fenómeno llamado transición de permeabilidad mitocondrial MPT (por sus siglas en inglés *Mitochondrial Permeability Transition*) que se origina en la membrana mitocondrial interna debido a la apertura de un complejo multiproteico conocido como "el complejo del poro de transición de permeabilidad" del inglés *Permeability Transition Pore Complex* (PTPC). Al margen de los mecanismos físicos y bioquímicos precisos por el que

I.3. Mecanismos de muerte celular en parásitos

se desarrolla la MOMP, a la mayoría de las mitocondrias dentro de una única célula se mueren. Por lo tanto, los resultados de la apoptosis intrínseca provoca una catástrofe bioenergética y metabólica acoplados a múltiples mecanismos ejecutores activos. A la vista de estas observaciones, se sugiere define “la apoptosis intrínseca” como un proceso de muerte celular mediada por MOMP y por lo tanto siempre se asocia con (i) disipación generalizada e irreversible del $\Delta\psi_m$, (ii) liberación de proteínas del espacio intermembranoso mitocondrial (IMS) al citosol (y su posible relocalización a otros compartimentos subcelulares) e (iii) inhibición de la cadena respiratoria.

Algunos autores afirman que la apoptosis es un mecanismo ancestral biológicamente conservado en metazoos, porque es fácil de entender que un organismo sólo puede sobrevivir y reproducirse con normalidad, si la mayoría de sus tipos de células se integran y cooperan para mantener su cuerpo funcionando conjuntamente [206–215]. Además, se ha demostrado una estrecha relación filogenética en moléculas que regulan el proceso de muerte celular a través de apoptosis. Como ejemplo podemos citar a la familia de proteínas Bcl-2, Apaf-1 y CARD (del inglés *Caspase Recruitment Domains*) [215], las cuales tienen sus correspondientes moléculas homologas en nematodos (*C. elegans*) e insectos (*D. melanogaster*) [215].

En *C. elegans* se ha logrado comprobar que la activación de supervivencia celular a través de la familia de proteínas Bcl-2, es significativamente menos compleja, debido a que no hay ortólogos Bax/Bak y solo se ha

observado, la existencia de una sola proteína anti-apoptótica y una caspasa con su adaptador específico [216–218].

En el año 2011 fue caracterizada la familia de proteínas pertenecientes a las ya mencionadas Bcl-2, en las especies de *S. mansoni* y *S. japonicum* [219, 220]. Esto gracias al trabajo realizado por el grupo de científicos dirigido por el profesor Dougle Fairlie de la Universidad de Melbourne en Australia. Los resultados demostraron la presencia de algunas de estas proteínas anti-apoptóticas, aportando más argumentos para demostrar que el mecanismo de apoptosis se produce por la vía mitocondrial en parásitos que pertenecen al género *Schistosoma*. Además, recientemente se ha logrado completar la secuencia del genoma de tres especies de *Schistosoma* [221–223], que ayudará a la caracterización de más moléculas involucradas en PCD en este grupo de parásitos.

En este contexto, podríamos recordar que los esquistosomas se encuentran relacionados en su clasificación taxonómica, con *C. elegans* ya que ambos pertenecen al grupo bilateria (I.1), en el que se incluye el *Phylum* Mollusca, donde se ha descrito la existencia de procesos apoptóticos involucrados en la homeostasis de su sistema inmune [224], un ejemplo de este *Phylum* es el género *Biomphalaria*. Los estudios antes citados, y los recientes trabajo reportados en esquistosomas [225, 226], indican que la apoptosis se ejecuta a través de la activación de un programa molecular conservado evolutivamente en todas las células de metazoos.

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

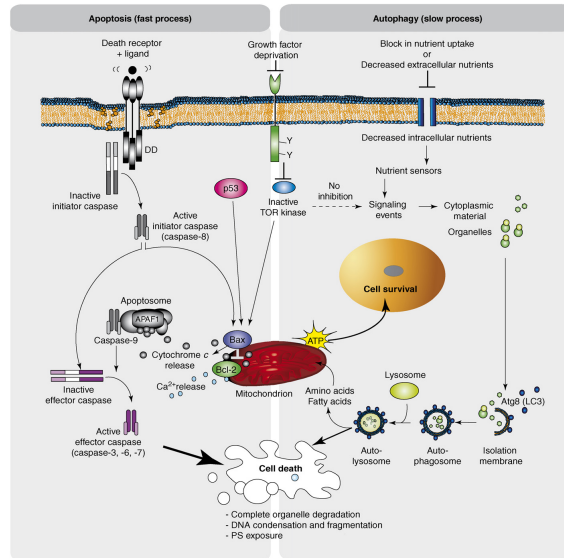


Figura I.10: Figura tomada de Bruchhaus et al. 2007 [203]. En esta figura se observa en forma esquemática de la comparación entre muerte celular por apoptosis y autofagia e ilustra el estímulo inicial extrínseco apoptótico en metazoos, donde se activan los receptores de muerte de la familia TNFR (que incluye TNF-R1, TNF-R2 y el receptor Fas) o por la vía intrínseca mitocondrial inducida por estrés, a través de la proteína p53. La activación de la vía apoptótica está estrechamente controlada en células de mamífero por un equilibrio entre los miembros apoptóticos (bax) y antiapoptóticos (BcL-2) de la familia BcL-2. Ambas vías extrínseca e intrínseca, conducen a la activación de caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9), estas caspasas iniciadoras activan posteriormente a las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7), que a su vez ejecutan la apoptosis por la fragmentación de muchos sustratos. La apoptosis inducida por la liberación de citocromo-C de la mitocondria es debido al aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. En contraste con la apoptosis, la autofagia es un proceso lento y puede durar varios días. La autofagia implica el secuestro y la digestión de los materiales y los orgánulos citoplasmáticos. La Auto-digestión limitada de material celular ayuda a las células a sobrevivir proporcionando fuentes de aminoácidos y ácidos grasos a la mitocondria para la síntesis de ATP. Sin embargo, si las condiciones no mejoran, la auto-digestión finalmente podría conllevar a la inducción de la muerte celular. Aunque el fenotipo final de células apoptóticas y autofágicas podrían guardar alguna similitud, los eventos moleculares durante los procesos difieren considerablemente.

METABOLISMO DE LÍPIDOS EN ESQUISTOSOMAS

En este apartado describiremos el metabolismo de lípidos que resulta más relevante en relación con helmintos, principalmente en lípidos complejos, también denominados lípidos estructurales o de membrana y alguna información recopilada que se tiene acerca de la especie *S. mansoni*.

I.4.1 Generalidades de los lípidos

Los lípidos constituyen un grupo de biomoléculas estructuralmente muy heterogéneo con características comunes de solubilidad. Son solubles en disolventes orgánicos poco polares (cloroformo, benceno, éter), poco o nada solubles en agua [227,228], y tradicionalmente divididos en:

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

- A . **Lípidos simples**, también denominados lípidos de reserva o almacenamiento. A dicho grupo pertenecen los ésteres de los ácidos grasos con glicerina o alcoholes grasos saturados o insaturados, son los denominados grasas, aceites y ceras. En este mismo grupo se incluyen los denominados lípidos derivados que son los resultantes de la hidrólisis de los anteriores, es decir, los ácidos grasos y los alcoholes grasos. Los glicéridos simples pueden ser: mono, di o triglicéridos. Los más frecuentes en la naturaleza son triglicéridos.
- B . **Lípidos complejos**, también denominados lípidos estructurales o de membrana. En este grupo se encuentran los fosfolípidos y los esfingolípidos. Su composición varía muy poco, siendo no obstante diferentes en las distintas especies animales e incluso en los distintos tejidos de un mismo organismo. A este grupo es al que nos referiremos fundamentalmente más adelante cuando hablemos de los lípidos del tegumento en *Schistosoma*.
- C . **Lípidos afines**, estos lípidos son estructuralmente muy diferentes de los grupos anteriores y aunque son componentes celulares relativamente minoritarios, juegan un papel muy importante, presentando actividades biológicas específicas y esenciales. Entre ellos se encuentran los esteroides, carotenoides y algunas vitaminas.

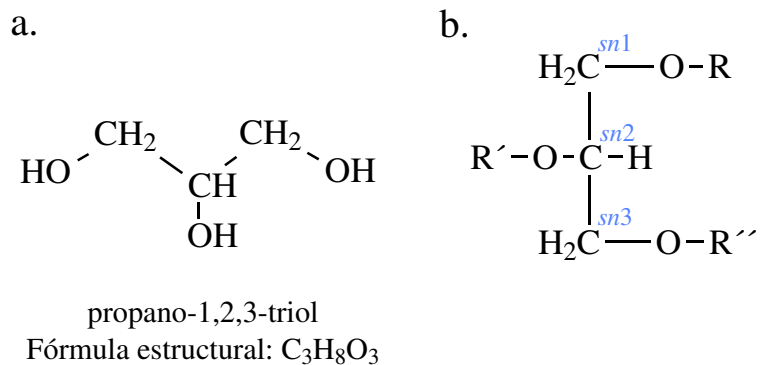


Figura I.11: Fórmula estructural del glicerol (a), y su numeración estereoespecífica (*sn1*, *sn2* y *sn3*). R, R', R'' = cadenas acílicas (b).

El glicerol (1,2,3-propanotriol) es uno de los componentes fundamentales de muchos lípidos (figura I.11 a.). Estructuralmente contiene un carbono proestereogénico unido a -H, OH y a dos grupos -CH₂OH. Cuando los dos últimos se encuentran diferentemente sustituidos, la molécula es quiral y puede existir en dos formas enantioméricas. Para designar la estereoquímica de los derivados del glicerol, los tres átomos de carbono se enumeran estereoespecíficamente (del inglés *sn*: stereospecific numbering). La molécula de glicerol se representa en la proyección de Fischer con el grupo hidroxilo secundario dirigido hacia la izquierda del carbono central (proestereogénico) y los tres átomos de carbono se designan *sn1*, *sn2* y *sn3* numerados desde arriba hacia abajo (figura I.11 b.).

I.4.2 Lípidos estructurales de membrana

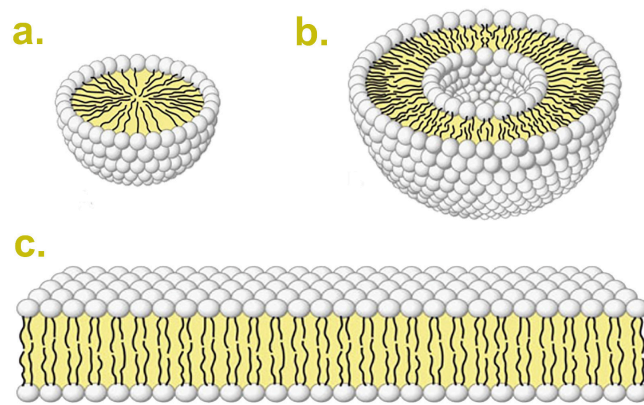


Figura I.12: Moléculas anfipáticas. Micela (a), liposoma (b) y bicapa lipídica (c).

Los lípidos muestran una amplia diversidad en su estructura y función biológica. Una de sus funciones principales es formar la bicapa lipídica de células y orgánulos. Los lípidos de la membrana son anfipáticos, la orientación de sus regiones hidrofóbicas e hidrofílicas (cabezas polares) dirige un empaquetamiento hacia la formación de bicapas membranosas. Estos compuestos forman dispersiones coloidales altamente organizadas, en agua forman: micelas, liposomas y bicapas (figura I.12 a, b y c).

En la tabla I.3, se muestran los principales lípidos que se encuentran en las membranas de varias células y orgánulos, como los grupos de fosfolípidos conformado por **glicerofosfolípidos** y **esfingolípidos**, a este pertenecen los glucolípidos o glucoesfingolípidos. Por último la membrana también esta formada por **esteroles**, principalmente del tipo **colesterol**, que están presentes en la membranas de todas las células eucariotas y en unas pocas membranas bacterianas.

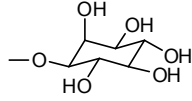
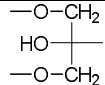
<i>Nombre X</i>	<i>X</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Glicerofosfolípido</i>
-	-OH	PA	Ácido fosfatídico
Colina	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	PC	Fosfatidilcolinas (lecitinas)
Etanolamina	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3$	PE	Fosfatidiletanolaminas (cefalinas)
Serina	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{N}^+\text{H}_3)\text{COO}^-$	PS	Fosfatidilserinas
Glicerol	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	PG	Fosfatidilglicerol
Inositol		PI	Fosfatidilinositol
		PGP	Difosfatidilglicerol (cardiolipina)

Tabla I.3: Clasificación de los glicerofosfolípidos o fosfolípidos.

I.4.2.1 Glicerofosfolípidos

Muchos lípidos derivados del ácido fosfórico que contienen glicerol son los glicerofosfolípidos llamados así para distinguirlos de los esfingolípidos

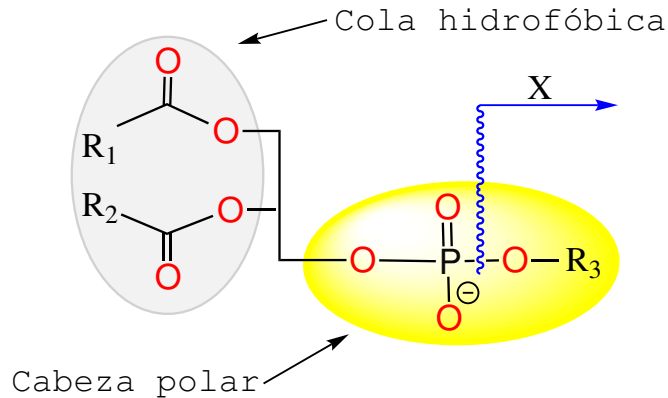


Figura I.13: Estructura general de los glicerofosfolípidos o fosfolípidos.

que también contienen dicho ácido. En muchas ocasiones a los glicerofosfolípidos se los denomina fosfolípidos. La estructura general de los glicerofosfolípidos aparece en la figura I.13 y su clasificación en la tabla I.3. En los glicerofosfolípidos las regiones hidrofóbicas están compuestas por ácidos grasos unidos al glicerol, aunque también se conocen algunos en los que aparece un grupo alquilo (casi siempre en posición *sn1*) unido al glicerol mediante un enlace éter. Los extremos polares de dichos compuestos presentan una gran diversidad estructural, en ellos se encuentran alcoholes polares y grupos fosfato. Los ácidos fosfatídicos corresponden a la forma diacilada y fosforilada del glicerol; estos compuestos se presentan en muy baja concentración en los sistemas vivos pero son importantes metabolitos intermedios en la biosíntesis de otros lípidos.

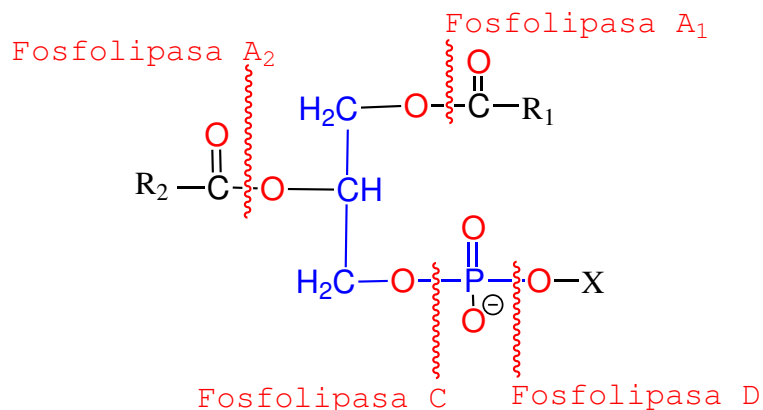


Figura I.14: Estructura de los fosfolípidos y los sitios de acción de las fosfolipasas. Los fosfolípidos consisten en una molécula de glicerol 3-fosfato (color azul) esterificado en sus posiciones *sn*1 y *sn*2 a los ácidos grasos no polares (R_1 y R_2 , respectivamente) y en su grupo fosforilo a un grupo de cabeza polar, X . Fosfolipasa A_1 y fosfolipasa A_2 hidrolizan los enlaces éster de acilo en *sn*1 y *sn*2, respectivamente. Fosfolipasa C degrada el enlace glicerofosfato mientras que la fosfolipasa D hidroliza el enlace éster entre el fosfato y el grupo variable X , eliminándolo.

Los fosfolípidos más importantes son los ácidos fosfatídicos en los que la unidad de ácido fosfórico aparece esterificada con otro compuesto hidroxilado, así surgen sus diferentes tipos. Las fosfatidilcolinas son los lípidos más abundantes en las membranas de los animales seguidas de las fosfatidiletanolaminas, que son muy abundantes en las plantas. Los fosfolípidos contienen cuatro enlaces éster que son difíciles de distinguir utilizando reactivos químicos convencionales, sin embargo utilizando fosfolipasas se pueden promover reacciones específicas en cada uno de estos enlaces. Las fosfolipasas A_1 y A_2 hidrolizan los enlaces éster en *sn*1 y

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

sn2. Las fosfolipasas C y D degradan los enlaces fosfodiéster tal como se observa en la figura I.14. Muchos fosfolípidos tienen una cadena saturada en posición *sn1* y un ácido graso insaturado en posición *sn2*.

A . Los **lisolípidos**, tienen un solo grupo acilo/alquilo en posición *sn1* y un hidroxilo libre que hace a la molécula más polar y con un cierto poder surfactante (Figura I.15).

Los ácidos lisofosfatídicos (LPA) configuran un grupo de compuestos que ha atraído mucha atención debido a la diversidad e importancia de sus propiedades biológicas [229,230]. Se diferencian entre ellos en la longitud y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada unida al glicerol vía éster, éter o vinil éter en posición *sn1* o *sn2* [231]. Los LPA presentan un papel fundamental en una gran cantidad de procesos fisiológicos: flujo del Ca^{2+} , funciones vasculares y neuronales, crecimiento, migración y muerte celular [232]. Los LPA, tienen una variada actividad intracelular, extracelular y en la membrana celular, que ejecutan a través de varias G-proteínas acopladas a receptores (GPCR) incluyendo los subtipos, bien conocidos, LPA1, LPA2 y LPA3. Recientemente se han preparado análogos de LPA fotoactivables marcados con ^{32}P para realizar estudios dirigidos con el fin de determinar el mecanismo de acción de estos compuestos en su interacción con las proteínas [233].

B . Éteres lipídicos (EL), algunos lípidos contienen grupos alquiloxi (éteres) en lugar de aciloxi (ésteres), unidos al glicerol. Estos grupos alquilo casi siempre están en posición *sn*1 y aparecen como alternativa a los triglicéridos o fosfolípidos en el aceite de pescado. Estos grupos alquilo son generalmente de dos tipos (figura I.16):

- Saturados o con una insaturación en posiciones convencionales **I**, **II** y **III**.
- Insaturados con doble enlace *trans* entre la posición *sn*1 y *sn*2, formando por tanto un vinil éter, son los denominados **plasmalógenos IV**, que presentan propiedades características y son muy abundantes entre los fosfolípidos cardíacos y especialmente en la membranas del retículo sarcoplásmico.

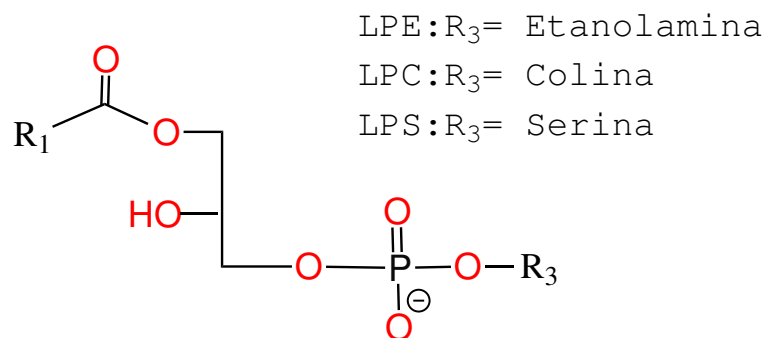


Figura I.15: Estructura general de los lisolípidos: Lisofosfatidil etanolamina (LPE), lisofosfatidil colina (LPC) y lisofosfatidil serina (LPS).

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

Un grupo especial de éteres lipídicos que contienen fosfatidilcolina presentan actividad biológica como factor de activación de plaquetas del inglés *Platelet Activating Factor* (PAF), siendo mediador de la hipersensibilidad en las reacciones inflamatorias agudas y en el shock anafiláctico. El PAF se sintetiza en respuesta a la formación de complejos antígeno-IgE en la superficie de basófilos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y monocitos. La síntesis y la liberación de PAF de las células induce la agregación plaquetaria y la secreción de serotonina por parte de las plaquetas. Estos factores activadores plaquetarios son 1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicerol-3-fosfolina, que presentan una gran similitud estructural química con la **edelfosina** (figura I.16).

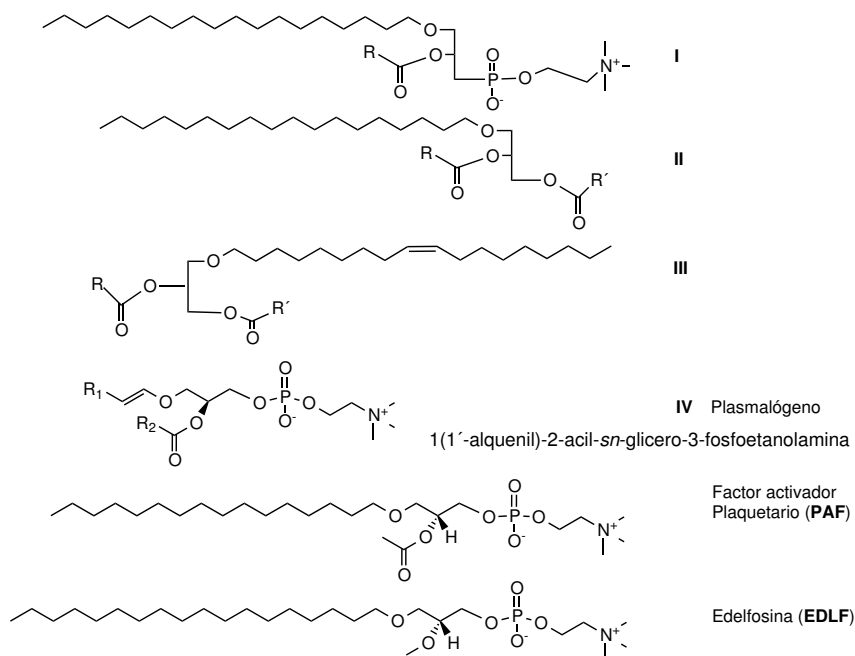


Figura I.16: Estructura química de los éteres lipídicos (EL) comparado con la edelfosina (EDLF).

I.4.2.2 Esfingolípidos

Los esfingolípidos están formados por una molécula de amino-alcohol de cadena larga, esfingosina, (figura I.17) o uno de sus derivados, una molécula de ácido graso de cadena larga acilando el grupo amino y en el grupo hidroxilo primario se forma la cabeza polar. Se sabe que los esfingolípidos actúan en diversos procesos de reconocimiento en la superficie celular.

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

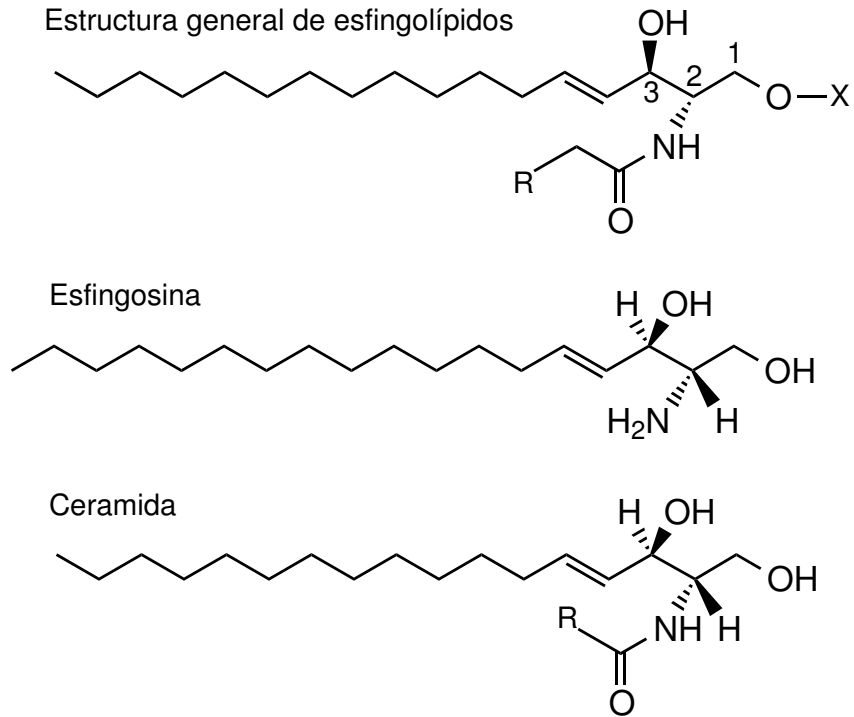
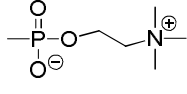
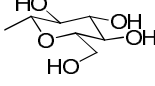
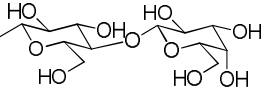
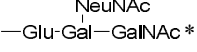
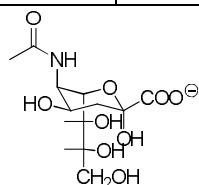


Figura I.17: Estructura química general de los esfingolípidos, acompañada de dos ejemplos como la esfingosina y la ceramida.

Las ceramidas (figura I.17), son los compuestos de referencia de este tipo de lípidos. En las ceramidas el grupo amino en *sn2* se une a un ácido graso. El hidroxilo primario de esfingosina está unido a un carbohidrato y otras veces a ácido fosfórico en enlace diéster en el grupo de la cabeza polar X. (figura I.17 y tabla I.4).

<i>Nombre X</i>	<i>X</i>	<i>Esfingolípido</i>
-	H	Ceramida
fosfocolina		Esfingomielina
Glucosa		Glucosilcerebrósido (cerebrósidos en general)
Disacárido (tri ó tetra sacárido)		Lactosilceramida (cerebrósidos en general)
Oligosacárido complejo		Gangliósido GM2



* Ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico)

Tabla I.4: Estructuras de los esfingolípidos.

I.4.3 Lípidos en esquistosomas

Los lípidos juegan un papel muy importante en la vida de los parásitos, en el caso de los esquistosomas estos los incorporan de sus hospedadores y lo utilizan para sintetizar y mantener sus complejos sistemas membranosos; a través de los ácidos grasos (AG), que pasan a formar parte de varios lípidos de los vermes tales como fofolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. El glicerol (estructura mostrada en la figura I.13) es usado como

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

columna vertebral en la síntesis de fosfolípidos y triacilglicerol [228, 234], contribuyendo a la formación de las membranas que funcionan como anclaje de lípidos a las proteínas, la maduración sexual y su ciclo de vida regulando la producción de huevos [235, 236]. Sin embargo los esquistosomas no son capaces de sintetizar “*de novo*” los lípidos y los precursores lipídicos como los ácidos grasos de cadenas largas y esteroides. Se obtienen en su dieta dentro del hospedador y se modifican para satisfacer sus necesidades metabólicas o para la biosíntesis de lípidos complejos, conformados por el grupo de fosfolípidos y esfingolípidos [102, 237]. Se piensa que una de las explicaciones por la cual falta la biosíntesis de esteroides en *S. mansoni*, se debe a la incapacidad para utilizar los productos de isoprenos por la vía de formación de mevalonato. Aunque los genes necesarios para una beta-oxidación completa están presentes, y esta vía se encuentra inactiva generalmente puede funcionar en sentido inverso para realizar la síntesis. Estos parásitos también poseen los demás genes necesarios para la mayoría de los procesos metabólicos básicos, como la glucólisis, ciclo del ácido tricarbóxico y la vía pentosa fosfato [221]. El contenido total de lípidos de vermes adultos de *S. mansoni* es un poco más de un cuarto de su peso seco. El macho ingiere sólo alrededor del 2,5% de su contenido en lípidos por día, mientras que la hembra ingiere un 50 %. Ella requiere metabolizar (o expulsar) más lípidos que el macho [238], representada en el caso de *S. mansoni* en la expulsión de aproximadamente 300 huevos/día con un gran contenido de lípidos. Las dos clases principales

de fosfolípidos que se encuentran en el tegumento de los esquistosomas son fosfatidilcolina PC (57%) y fosfatidiletanolamina PE (17%) [239], además se ha encontrado que la esquistosómula incorpora más PC que PE, pero al medir la concentración total de fosfolípidos almacenada en el parásito, la relación cambia, encontrándose que PE es el fosfolípido más abundante. Por tanto, el parásito requiere más fosfolípidos análogos de colina o bloque básico de PC, tomándolos de su hospedador para luego modificarlos o sintetizar otros ácidos grasos (AG) de acuerdo a sus requerimientos [235]. Aunque los esquistosomas no sintetizan ácidos grasos “*de novo*”, el parásito probablemente fabrica ácido 5-octadecenoico en las células bajo el tegumento [240, 241]. Esta clase de AG se encuentra ausente en la sangre del hospedador. *S. mansoni* poseen lipasas capaces de romper triglicéridos, por lo que puede prevenir altas concentraciones de AG intracelulares. Las vías responsables de la síntesis de los componentes de fosfolípidos de las membranas están bien representadas, excepto que PC debe derivarse de diacilglicerol (DAG) [242], y el parásito debe depender de su hospedador como fuente de inositol [221]. Más adelante hablaremos sobre algunos de los posibles mecanismos de acción por parte de la edelfosina, interfiriendo en el metabolismo lipídico con la afectación de la concentración de glicerofosfolípido y colesterol a nivel celular [243–246].

Los vermes adultos de *S. mansoni* muestran un intestino funcional que está implicado en la ingestión y digestión de células y macromoléculas [234]. Se ha identificado mediante el análisis proteómico del vómito de estos

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

vermes un homólogo (Smp 194840 /50) de la proteína llamada Niemann pick tipo C2 (NPC2), que desempeña una función clave en el transporte de colesterol, otros esteroides y glicolípidos. Al igual que NPC1 está codificada en el genoma de *S. mansoni* (Smp 039130), lo que indica que el mecanismo completo para la absorción de colesterol puede estar activo en el intestino de los esquistosomas [247]. La acumulación de colesterol en los tejidos a través de Niemann-Pick C (NPC) es proporcional a la endocitosis de LDL a través de la vía de clatrina en mamíferos [248].

Existe un intenso tráfico de pequeñas moléculas a través del tegumento de estos parásitos [89,95–97], que contribuye al metabolismo de los lípidos en los esquistosomas. Sin embargo, algunos autores como Skelly et al. 2014 [238], informan que a pesar de los esfuerzos en estudiar la absorción de lípidos esenciales a través del tegumento, no hay evidencia significativa, por lo que debe asumirse que el intestino es la vía dominante. La multiplicidad de las saponinas en la luz intestinal, además de la identificación de NPC, un homólogo transportador de colesterol, refuerza esta hipótesis.

Se ha observado que las LDL, están unidas al tegumento de esquistosomas de *S. mansoni*, y que esta unión le puede permitir al parásito suministrar colesterol y ácidos grasos destinados a la biogénesis de sus membranas. Además, se ha logrado comprobar en ensayos *in vitro*, que más del 75% de la superficie de los esquistosomas esta cubierta por LDL del hospedador y gracias a esta unión el parásito no es reconocido por el sistema inmune [143, 144]. Sin embargo, analizando el proteoma

del tegumento de los esquistosomas no se ha identificado un homólogo del receptor de LDL [249–252]. No obstante, en *C. elegans* se ha observado, que en los embriones de este nematodo se acumulan grandes cantidades de colesterol a través de una vía específica de endocitosis mediada por un receptor de LDL [253–255], lo que podría sugerir que la edelfosina se acumulará en el embrión en parásitos tratados con este análogo alquil-lisofosfolípido hasta llegar a un punto crítico en el que se producen alteraciones morfológicas y estructurales embrionarias que dan lugar a la detención del desarrollo y su muerte [255].

En 1991 Moser et al. [256], mencionaban la necesidad de identificar en *S. mansoni* homólogos de la familia de proteínas llamadas FABP del inglés *Fatty Acid-Binding Protein* o transportadoras de AG. Las FABPs en mamíferos fueron descubiertas durante la década de 1970 [257–259]. También se encuentran en otras especies como *D. melanogaster*, *C. elegans* y *S. mansoni*, lo que demuestra una fuerte conservación evolutiva de esta familia de proteínas [258, 260]. En los últimos años se han estudiado las funciones y mecanismos de los FABPs, sugiriendo su potencial acción en la importación, almacenamiento y exportación de los AG, así como del colesterol y fosfolípidos. Por el momento se han propuesto varias funciones como lo son:

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

- a. Transporte intracelular de cadenas largas de AG hasta sus sitios de utilización [261].
- b. Existencia de FABPs citosólicas que juegan un papel similar a la albúmina del plasma [262, 263].
- c. Selección y captación de sustratos lipofílicos [264–266].
- d. Compartimentalización de AG [267].
- e. Participación directa en el metabolismo lipídico como co-factores (estimuladores o inhibidores) o en reacciones donde los AG sean sustratos o reguladores [268].

En resumen, actúan en la modulación de las enzimas específicas de rutas metabólicas de lípidos, ya sea anabólica o catabólica, en el mantenimiento de los niveles de ácidos grasos de la membrana celular y en la regulación de la expresión de genes sensibles a los AG [257, 269].

El mecanismo por el cual *S. mansoni* incorpora los esteroides o ácidos grasos de cadenas largas es motivo de estudio. Sin embargo, gracias a los múltiples trabajos en la identificación de péptidos o proteínas con potencial protector, ha sido posible encontrar una proteína con un peso molecular de 14 kDa, localizada en el tegumento del verme denominada Sm14 [270–273]. Fue la primera proteína perteneciente a la familia de proteínas FABPs descrita en el año 1991 por Moser et al. [256],

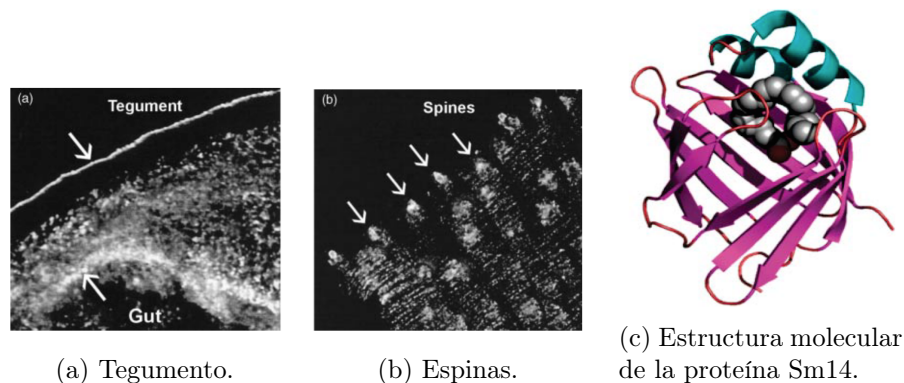


Figura I.18: Proteína Sm14. Imágenes adaptadas de Tendler et al. 2014 [273]. Inmunolocalización de la proteína Sm14 en un verme adulto de *S. mansoni*, en la imagen (a) la flecha indica la localización del anticuerpo Sm14 sobre la lamina basal del tegumento y el epitelio intestinal; mientras que en la imagen (b) se observa señalado con varias flechas, la localización específica del anticuerpo Sm14 sobre las estructuras morfológicas de las espinas del parásito. Por último en la figura (c), se muestra la representación estructural en un modelo tridimensional del complejo molecular representado por la proteína Sm14, unido al ácido araquidónico (esferas de color gris).

dentro del *Phylum* Platyhelminthes. Angelucci et al. en el 2004 [274], encontraron un aumento en la afinidad de AG por parte de Sm14 a pH bajo, sugiriendo que esta propiedad podría permitir la transferencia de AG a partir del plasma del hospedador. Un ejemplo de esto se ilustra en la imagen en 3D de la figura I.18 (c), donde se puede ver una representación del complejo de unión entre la proteína Sm14 y un AG (ácido araquidónico).

Un requisito común a todas las infecciones parasitarias crónicas consiste en que los parásitos puedan evadir los efectos de las respuestas inmunes

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

del hospedador y sobrevivir en éste durante largos períodos de tiempo. Se ha estimado que los vermes adultos de *S. mansoni* pueden permanecer y reproducirse en el ser humano durante décadas hasta un tiempo máximo de cuarenta años [89,92–94], y cada pareja de vermes adultos llega a producir unos 300 huevos por día o 3.500 en el caso de *S. japonicum* [58, 60, 94], como se había mencionado con anterioridad.

Los mecanismos que promueven su longevidad son de vital importancia [120, 139, 275–281]. Los esquistosomas poseen un tegumento con un citoplasma sincitial (figura I.5), estructura externa que recubre el cuerpo del parásito constituido por una doble membrana (doble bicapa lipídica) que sirve de interfase entre el parásito y su hospedador. Esta superficie tiene un papel importante, en la adquisición de nutrientes incluyendo carbohidratos, aminoácidos, lípidos, lipoproteínas y otros de tamaño similar, tomados del hospedador. Así como de excreción de productos catabólicos tales como el ácido láctico [56, 89, 95–97, 234, 282]. La membrana del tegumento se sustituye continuamente por vesículas multilaminares que migran a la región apical del sincitio y se fusionan con la membrana plasmática [95]. Sin embargo los vermes adultos tienen un recambio más lento, aproximadamente 5 días [283], aunque los fosfolípidos se someten a deacilación y reacilación muy rápida [284]. Los ácidos grasos requeridos para el proceso de deacilación/reacilación tienen que ser obtenidos desde el hospedador, ya que como se mencionó

anteriormente los esquistosomas son incapaces de sintetizar ácidos grasos “*de novo*”. Los ácidos grasos incorporados por el parásito pueden ser modificados por elongación de la cadena, lo que resulta en un perfil significativamente diferente a el del hospedador. En el caso del tegumento de *S. mansoni* se ha encontrado que está altamente enriquecido en 1-O-hexadecil-2- palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (GPC (O- 16: 0/16: 0)), una especie de alquiloacilo ausente en la sangre del hospedador. Esta especie de PC puede servir como precursor para la formación de factor activador de plaquetas [100], e incluso la organización lípido-proteína de la membrana de los vermes adultos es muy diferente a la de la esquistosómula [271, 284]. Algunos componentes lipídicos de esta membrana, como la lisofosfatidilcolina, también lo protege de la lisis ocasionada por leucocitos del hospedador [95].

El alto contenido en PC en el tegumento [241], hace que sea más resistente a los daños causados por especies reactivas del oxígeno secretadas por neutrófilos y macrófagos. Por lo tanto, este alto contenido de PC en el tegumento refleja otra adaptación del parásito al hábitat intravascular y a la exposición al sistema inmune del hospedador. Por consiguiente, la alteración en la señalización de la membrana celular en los esquistosomas podría ser una forma de adaptación bioquímica a respuestas inmunes del hospedador y explica la inmunidad concomitante asociada con este parásito.

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

Existen estudios donde se ha medido el consumo de lípidos en los hospedadores intermediarios, encontrándose que *B. glabrata* sometido a un contenido alto en grasas e infectados con *S. mansoni* impiden el desarrollo del parásito [275]. Por otra parte, se ha demostrado que la infección por esquistosoma se podría contrarrestar con los efectos de una dieta aterogénica modulando el metabolismo de lípidos e induciendo una reducción en la concentración de colesterol total en sangre del hospedador definitivo [285]. Popiel et al. 1986 [286], estudiaron el metabolismo de la absorción de colesterol por los vermes emparejados y no emparejados de *S. mansoni* durante el emparejamiento. Los resultados mostraron que vermes etiquetados con [³H]colesterol, perdieron hasta el 65% de su nivel de colesterol. Esto sugiere que la transferencia de colesterol normal en parejas de vermes es bidireccional y que se ve facilitada por el contacto físico entre sus membranas. El intercambio de colesterol en parejas de vermes de esquistosomas, puede ser una consecuencia del movimiento o intercambio tegumental de moléculas entre machos y hembras. En otro estudio, Silveira et al. 1986 [287], investigaron la transferencia de colesterol y sus metabolitos entre machos y hembras de vermes adultos de *S. mansoni*, encontrando que los machos adultos y las hembras de *S. mansoni* son capaces de incorporar una tasa de colesterol y convertirlo en varios metabolitos. Por otro lado, las esquistosómulas no pueden convertir el colesterol incorporado [285]. El colesterol es otro de los constituyentes principales de las membranas de eucariotas desempeñando un papel crucial

en la organización celular. A menudo se encuentra distribuido de manera no aleatoria en dominios dentro de la membrana. Observaciones recientes sugieren que el colesterol ejerce muchas de sus acciones, manteniendo un dominio de membrana, llamado "balsas lipídicas" (del inglés "*lipid raft*") [285]. Las balsas de lípidos son enriquecidos en colesterol y esfingolípidos [271], y se piensa que actúan como plataforma a través de la cual las señales de transducción son coordinadas y los patógenos infectan con facilidad al hospedador. Se ha sugerido que las bicapas se componen de dominios, que pueden ser considerados como equivalentes a las balsas de lípidos, que parecen estar universalmente presentes en las membranas [271]. Por el momento, la información que se encuentra disponible con respecto a las balsas lipídicas en *S. mansoni*, es el hallazgo de una proteína denominada Smp-044750 (marvel-containing potential *lipid raft*-associated protein [*Schistosoma mansoni*]), en estudios "*in silico*" reportados por Protasio et al. en 2012 [288]. Además recientemente se ha realizado una tesis de máster en el Reino Unido, donde la mayoría de los resultados de este estudio nos indica la presencia de balsas lipídicas en la superficie de *S. mansoni* y destaca la importancia potencial que estos dominios desempeñan en este parásito [289].

Con respecto a los plasmalógenos, es importante aclarar que son éteres lipídicos que se caracterizan por un enlace éter (1'-alquil) en la posición *sn*1 (ver figura I.16 de plasmalógeno) de los fosfolípidos y pueden compensar

I.4. Metabolismo de lípidos en esquistosoma

una parte importante del grupo de fosfolípidos totales en los sistemas de membrana. Debido a la diferente estructura molecular del enlace en la posición *sn*1, la presencia de plasmalógenos también puede alterar las propiedades físicas de las membranas y modular la actividad de proteínas asociadas [290, 291]. Brouwers J et al. [240], identificaron una especie de PC, que está altamente enriquecida en el tegumento de *S. mansoni*, y que podría servir como precursor de PAF y la composición de las especies moleculares de PE y PC en el parásito es muy distinta de la composición que se encuentra en la sangre de la que se alimentan. Esto sugiere el uso de mediadores lipídicos específicos como por ejemplo una especie de PC encontrada en el parásito con un doble enlace en la posición 5Z de la cadena AG 18:1, involucrados en procesos de interacción de señales del esquistosoma con su hospedador [100]. En resumen, el metabolismo de los lípidos de los esquistosomas adultos parece estar ajustado de forma óptima a su vida parasitaria, y como el mayor número de los lípidos que se encuentran en *S. mansoni* han sido sintetizados por su hospedador, son en su gran mayoría el resultado derivado de pequeñas adaptaciones realizadas por el mismo parásito.

LOS ALQUILFOSFOLÍPIDOS (APLs) Y SU ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

Los análogos sintéticos de la fosfatidilcolina (PC) y de la lisofosfatidilcolina, con enlaces tipo éter que fueron sintetizados como análogos de la 2-lisofosfatidilcolina (lisolecitina, figura I.19) durante la década de 1960, como consecuencia de estudios en colaboración entre varios grupos de investigación (Herbert Fisher, Otto Westphal, Hans Ulrich Weltzien y Paul Gerhard Munder en el Max-Planck-Intitut für Immunobiologie en Freiburg, Alemania), con el objetivo inicial de identificar nuevos inmunomoduladores [292]. Munder et al. observaron que modificando en la lisolecitina un enlace éster por un enlace éter en las posiciones *sn1* y *sn2* del esqueleto de glicerol (figura I.11), se evitaba la degradación de las moléculas por enzimas tipo lisofosfolipasas (figura I.14)

I.5. Los alquilfosfolípidos (APLs) y su actividad antiparasitaria

y aciltransferasas, alargando su vida media comparada con la lisolecitina natural. Además resultaron ser potentes inmunomoduladores, presentando una actividad selectiva en células cancerígenas [243, 293–295].

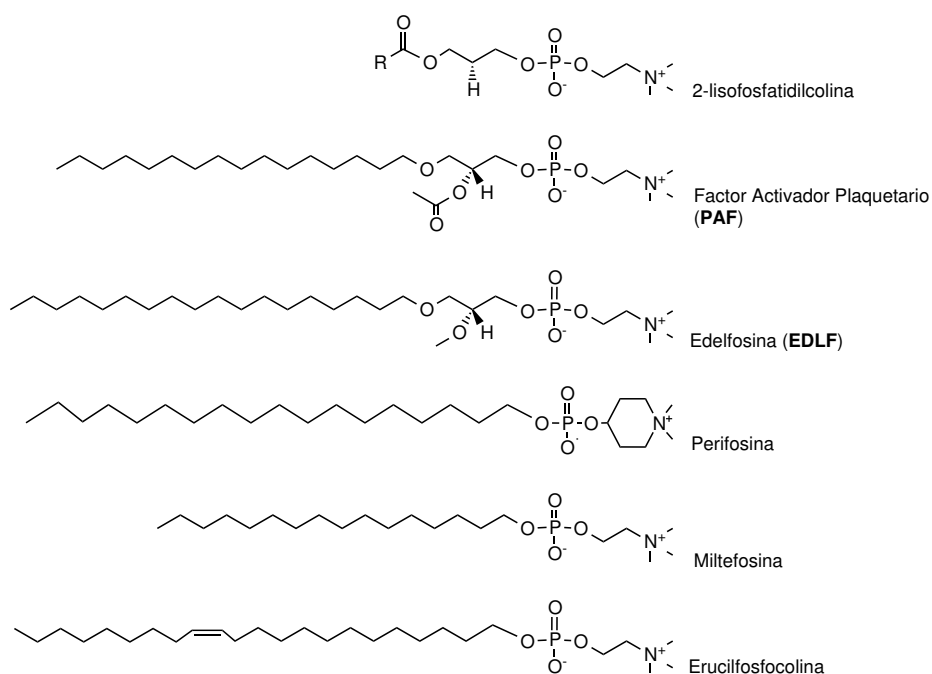


Figura I.19: Fórmula estructural química de algunos de los APLs, comparados con la estructura química general de la 2-lisofosfatidilcolina y el factor activador plaquetario (PAF).

Los lípidos antitumorales o análogos del alquil-lisofosfolípidos del inglés *Alkyl-Lysophospholipid Analogs* (ALPs), también conocidos como lípidos sintéticos antitumorales del inglés *Synthetic Antitumor Lipids* (ATLs) o

análogos alquilfosfolípidos del inglés *Alkylphospholipid Analogs* (APLs), constituyen una familia de compuestos anticancerosos que a diferencia de la mayoría de los antitumorales utilizados en clínica en la actualidad, presentan dos características interesantes: actuar sobre las membranas celulares y no tener como diana el ADN [295–297].

Los APLs pueden clasificarse en dos grandes categorías atendiendo a su estructura química:

- A. Los fosfolípidos alquiléter, conocidos como éter lípidos antitumorales o análogos de alquil-lisofosfolípidos, contienen enlaces éter en el esqueleto del glicerol, y su prototipo es la edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-rac-glicero-3-fosfocolina) (figura I.19).
- B. Las alquilfosfocolinas carecen del grupo glicerol y están constituidas por una cadena larga hidrocarbonada unida a una fosfobase. La miltefosina (hexadecilfosfocolina) es el arquetipo de estos compuestos [296–298], (I.19). Otros compuestos pertenecientes a esta familia son la perifosina y la erucilfosfocolina.

Aunque se ha considerado que los APLs y como prototipo la edelfosina actúan de forma similar, existen ciertas diferencias entre las familias de APLs. Además los mecanismos de acción no se conocen en detalle [299]. La edelfosina es un compuesto no mutagénico, ya que no tiene como diana el ADN celular e induce apoptosis de forma selectiva en células tumorales

I.5. Los alquilfosfolípidos (APLs) y su actividad antiparasitaria

[297,300,301] a través de un mecanismo de acción que implica la activación intracelular del receptor de muerte Fas/CD95 mediante su reclutamiento y concentración en los denominados “*lipids rafts*” [298, 302–304], (ver tabla I.5). La edelfosina, actuando a través de este mecanismo, parece ser particularmente eficaz frente a tumores hematológicos [304–308]. Los mecanismos de acción de los APLs conocidos hasta el momento difieren de fármacos quimioterapéuticos clásicos y abarcan varios puntos:

- a. Interferencia con el metabolismo de fosfolípidos y la homeostasis del colesterol (ver tabla I.5. Se puede observar una representación esquemática de la inhibición de PLC, PLD y CCT en la figura I.20, I.21).
- b. Inhibición de las vías de supervivencia (Akt, ERK). Se puede observar un esquema de este mecanismo en la figura I.22.
- c. La señalización pro-apoptótica inducida por el estrés en presencia de APLs, induce a la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial. Además se presenta una acción antitumoral selectiva a través de un mecanismo de acción único por la activación intracelular del receptor de muerte Fas / CD95 [297,298,308]. Esta acción se representa en la figuras I.21, donde se observa el efecto proapoptótico de la edelfosina (micelas de APLs) en los *lipid raft* de células tumorales [302].

A nivel de la proteína	APLs	Efecto	Efecto secundario	Vía de señalización
Retículo endoplásmico				
CT → Síntesis de PC ↓	Edelfosina	Inhibición	SMS ↓	Apoptosis
Intercambio de lípidos ↓	Edelfosina, miltefosina	Inhibición	ROS (mitocondria) ↑	SAPK/JNK
Membrana plasmática				
PLC → DAG (β 1)	Edelfosina	Inhibición	RasGRP, PKC, PKD ↓	MAPK/ERK ↓
PLD → PA	Edelfosina	Inhibición	PKC ζ , c-Raf, ↓ mTOR ↓	MAPK/ERK, ↓ Akt ↓
PI3K → PIP ₃	Edelfosina, miltefosina, perifosina	Inhibición	PDK, Akt ↓	Akt ↓
Intercambio de lípidos ↓	Edelfosina	Inhibición	ROS ↑ (mitocondria)	SAPK/JNK
<i>Lipid raft</i> (Fas/CD95)	Edelfosina, perifosina	Activación	Reclutamiento de Fas/CD95 y señalización molecular intracelular a través de los <i>lipid raft</i>	Apoptosis

Tabla I.5: Resumen del efecto de los APLs en el metabolismo de los lípidos sobre algunas de sus dianas moleculares localizadas en la membrana y las vías de traducción intracelular de dicha señales [302, 309].

Los datos obtenidos hasta el momento indican que la edelfosina induce la muerte de las células tumorales a través de la activación directa de la maquinaria apoptótica y de esta forma podría considerarse como un buen inductor de apoptosis en distintos sistemas biológicos. En este sentido, la edelfosina induce muerte celular también en levaduras [310–312].

I.5. Los alquifosfolípidos (APLs) y su actividad antiparasitaria

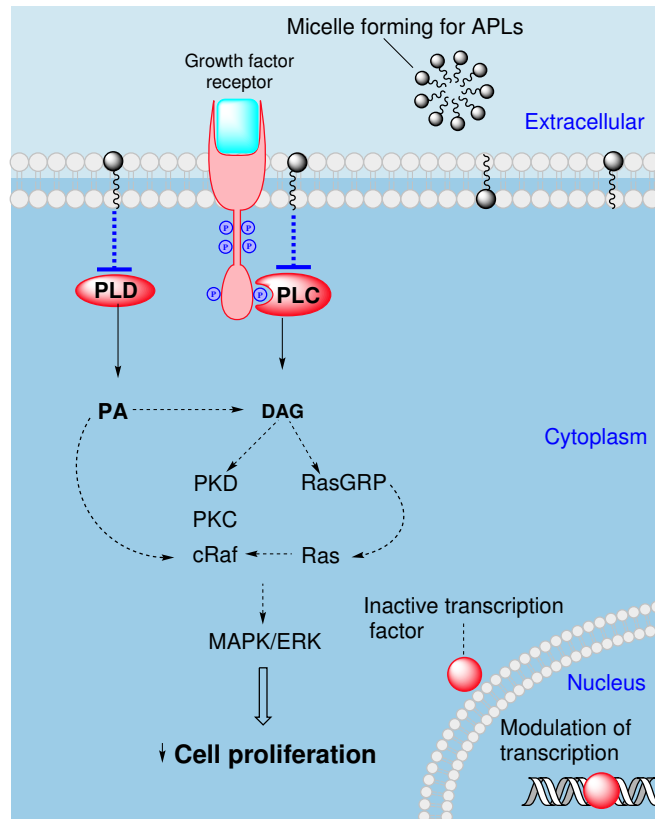


Figura I.20: Efecto de los APLs en la inhibición de PLD y PLC. Debido a su estructura química, se espera que los APLs se inserten en la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas a través de su larga cadena hidrocarbonada apolar (cola hidrofóbica). Los APLs (edelfosina) son compuestos anfifílicos tensoactivos, que contiene tanto un extremo hidrofílico y otro hidrófobo, y puede solubilizarse en agua formando micelas [302].

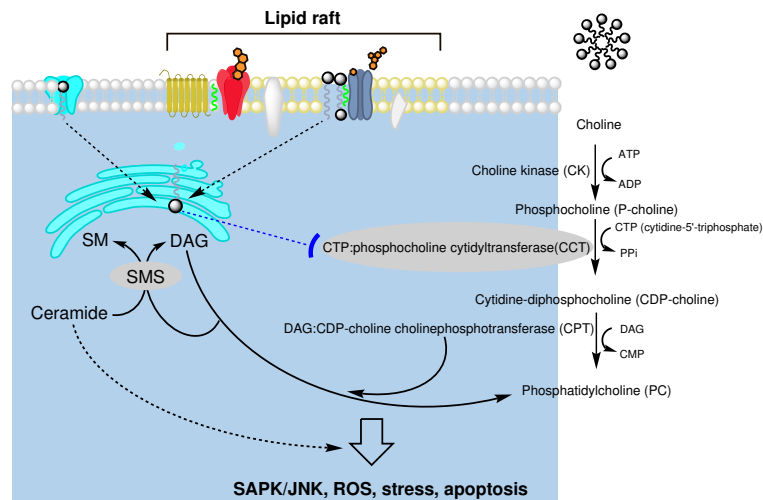


Figura I.21: Efecto de los APLs en los *lipid raft* de membrana.

Además de su actividad antitumoral, edelfosina y miltefosina tienen otras indicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la esclerosis múltiple, o actuando en diferentes tipos de infecciones antibacterianas, antifúngicas, antiviral [297, 313–316], y antiparasitarias [317–320]. Sin embargo, el tipo de muerte inducida, el mecanismo de acción en modelos *in vivo*, tanto en leishmaniosis como esquistosomosis aún permanecen sin dilucidar por completo. En cuanto al mecanismo de acción, evidencias indirectas sugieren que el metabolismo lipídico [245, 321, 322] y la mitocondria [323] pueden estar implicados probablemente en la acción antiparasitaria de la edelfosina y otros APLs, si bien el mecanismo molecular completo responsable de la

I.5. Los alquilfosfolípidos (APLs) y su actividad antiparasitaria

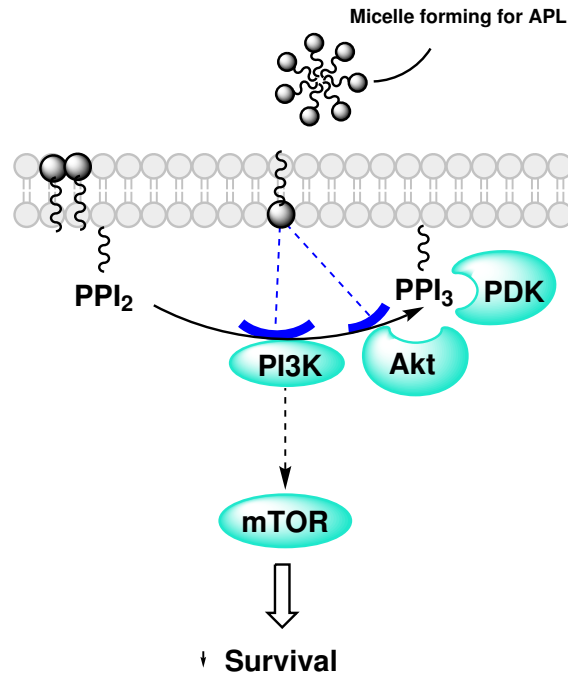


Figura I.22: Efecto de los APLs en la inhibición de PI3K y Akt.

acción antiparasitaria se desconoce por el momento.

En parásitos pertenecientes al orden Kinetoplastida (figura I.1), es donde se tiene mayor información sobre el efecto o actividad antiparasitaria de los APLs, tanto *in vitro* como *in vivo*. Investigadores liderados por Croft et al. en 1996 [324], obtuvieron resultados donde destacan el efecto de la miltefosina e ilmofosina como los compuestos que presentaron mayor actividad contra *L. donovani* y *T. cruzi*. Otros estudios también habían demostrado que la miltefosina era más activa contra *T. cruzi* que los

fármacos de elección utilizados (NF y BZ) [325–330]. En la misma década, este grupo [324], llevó a cabo los primeros estudios de la actividad de cuatro APLs (edelfosina, miltefosina, ilmofosina y SRI 62-834) contra los tripanosomas africanos, encontrando una acción moderada contra *T. brucei*. Los APLs fueron considerablemente menos activos *in vitro* contra las formas de tripomastigotes extracelulares de *T. brucei* en torrente sanguíneo y ninguno de los APLs mostraron actividad contra la infección aguda en ratones. Igualmente, Konstantinov et al. en 1997 [331], utilizando cuatro formas de tripomastigotes de las subespecies *T. brucei brucei*, *T. gambiense* y *T. rhodesiense*, además y cuatro APLs del grupo de las alquilfosfocolinas, encontraron una acción moderada contra estos tripanosomas africanos. Finalmente, Papagiannaros et al. en el 2005 [332], utilizando formulaciones liposómicas de miltefosina, encontraron que la actividad tripanocida resultó mejor *in vitro* que *in vivo* contra *T. brucei*.

En leishmaniosis es donde se tiene mayor información sobre el efecto o actividad antiparasitaria de los APLs, tanto *in vitro* como *in vivo* y dentro de los APLs es la miltefosina la que es utilizada hoy en muchas regiones como fármaco de elección contra esta enfermedad. Los estudios de la actividad anti-*Leishmania* de los APLs, comenzaron en la década de 1980, contra *L. donovani* [333, 334]. Los APL han sido eficaces contra diferentes especies de *Leishmania*, incluyendo *L. donovani*, *L. infantum* (Viejo Mundo) / chagasi (Nuevo Mundo), *L. major*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guayanensis*, *L. tropica*,

I.5. Los alquilfosfolípidos (APLs) y su actividad antiparasitaria

L. aethiopica y *L. lainsoni* [28, 319, 335–339]. Después de que Croft et al. en 1987 [334] estudiaron el efecto de miltefosina contra amastigotes de *L. donovani*, este fármaco pasó a convertirse en el APL más estudiado contra protozoo como *T. cruzi*, *T. brucei* y diferentes especies de *Leishmania*. Más tarde, después de ocho ensayos clínicos exitosos [340], la miltefosina fue registrada bajo el nombre comercial de Impavido[®] para el tratamiento de la leishmaniosis visceral humana en la India en marzo de 2002, y en Alemania en 2004 por Zentaris (Frankfurt, Alemania) [28]. A partir de este momento se convirtió en el primer tratamiento oral de la leishmaniosis visceral y es el fármaco más reciente que ha llegado al mercado para el tratamiento de esta enfermedad. En realidad, la mejor perspectiva para la miltefosina como un tratamiento efectivo para ambas leishmaniosis tanto visceral como cutánea, consiste en su asociación con otros fármacos [314, 341, 342]. Muy recientemente, edelfosina ha demostrado ser eficaz contra diferentes especies de *Leishmania*, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, presentando un mejor perfil que la miltefosina en la generación de resistencia a los medicamentos [319]. Otros autores afirman que la edelfosina es más activa que la miltefosina contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* [323]. Además, edelfosina ejerce un potente efecto anti-inflamatorio [313], y esto representa un punto muy importante, ya que varios de los datos clínicos de la leishmaniosis se deben a una respuesta inflamatoria. En la actualidad, la miltefosina es el único APL en el mercado para el tratamiento de la leishmaniosis, pero

la gran actividad anti-*Leishmania* tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* de edelfosina y perifosina, podría constituir un cambio en la terapéutica de esta enfermedad [319,343,344].

Con respecto a la actividad de los APLs en helmintos, podríamos mencionar lo siguiente: En la hidatidosis, el tratamiento quimioterapéutico se basa en carbamato y derivados del benzimidazol tales como mebendazol (MBZ) y albendazol (ABZ). Además, se están realizando esfuerzos para combinar PZQ y ABZ con el fin de obtener un efecto sinérgico con actividad antiparasitaria en el tratamiento de la hidatidosis quística [38,39]. Por el momento, sólo encontramos información de dos ensayos de APLs en esta enfermedad [345,346], sin ningún efecto significativo contra este parásito. En los últimos años se han realizado algunos estudios sobre APLs en *Schistosoma*, en particular utilizando miltefosina, y después de obtenerse su registro comercial en el año 2002 [28], Virbac (Milán, Italia) en colaboración con Zentaris (Frankfurt, Germany) desarrollaron una formulación específica para uso veterinario en Europa con el nombre comercial de Milteforan[®]. Gracias a ello, Eissa et al. [318], demostró su efecto sobre las diferentes fases de *S. mansoni*, con la administración oral de Milteforan[®] con una dosis diaria de 20 mg/kg durante cinco días, necesaria para inducir una reducción significativa de la carga de los vermes, del tamaño de los granulomas hepáticos y de la mejora en la afectación hepática. Posteriormente, el mismo grupo [347], demostró que la miltefosina tiene una actividad larvicida contra una de las fases acuáticas (miracidios) de *S. mansoni* y *S. haematobium*,

I.5. Los alquilfosfolípidos (APLs) y su actividad antiparasitaria

comprobando también la exposición del parásito a concentraciones de 25 μM de miltefosina durante 5 días con un efecto letal *in vitro* en vermes adultos de ambas especies. Además, Bertao et al. [348], informaron de la muerte de los parásitos adultos *in vitro* 3 h después de cultivar los vermes adultos con miltefosina a concentraciones de 200 μM . Por tanto, los APLs y dentro de estos la edelfosina, se destaca como una molécula prometedora en el futuro tratamiento contra algunos de los parásitos mencionados en esta memoria.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bayne CJ. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Molecular and biochemical parasitology*. 2009;165(1):8–18.
- [2] Knight M, Arican-Goktas HD, Ittiprasert W, Odoemelum EC, Miller AN, Bridger JM. Schistosomes and snails: a molecular encounter. *Frontiers in genetics*. 2014;5.
- [3] Bruschi F. *Helminth Infections and Their Impact on Global Public Health*. Springer; 2014.
- [4] Cordero M, Rojo VAF, Martinez F, Sanchez AM, Hernandez RS, Navarrete LCI, et al. *Parasitología veterinaria*. 1st ed. Madrid, McGraw-Hill Interamericana; 1999.
- [5] Botero D, Restrepo M. *Parasitosis humanas*. CIB; 2012.
- [6] WHO | First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization; 2010. WHO/HTM/NTD/2010.1. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/.
- [7] Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. “Rapid-Impact Interventions”: How a Policy of Integrated Control for Africa’s Neglected Tropical Diseases Could Benefit the Poor. *PLoS Med*. 2005;2(11):e336. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020336>.
- [8] WHO | Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization;

I.5. Bibliografía introducción

2013. WHO/HTM/NTD/2013.1. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/.
- [9] Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(1):51–61. Available from: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n1/full/nrmicro2260.html>.
- [10] Crowcroft NS, Thampi N. The prevention and management of rabies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2015;350:g7827.
- [11] Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:S7–S16. Available from: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n12_suppl/full/nrmicro2460.html.
- [12] WHO | Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization; 2009. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1. Available from: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>.
- [13] WHO | Rabies. World Health Organization; 2014. 99. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>.
- [14] Burton MJ, Mabey DCW. The Global Burden of Trachoma: A Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(10):e460. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000460>.
- [15] Zhang Y, MacArthur C, Mubila L, Baker S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BMC Medicine*. 2010;8(1):67. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/8/67/abstract>.
- [16] Demangel C, Stinear TP, Cole ST. Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of *Mycobacterium ulcerans*. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(1):50–60.

-
- [17] Johnson PDR, Stinear T, Small PLC, Pluschke G, Merritt RW, Portaels F, et al. Buruli Ulcer (*M. ulcerans* Infection): New Insights, New Hope for Disease Control. *PLoS Med.* 2005;2(4):e108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020108>.
- [18] WHO | Buruli Ulcer. World Health Organization; 2014. 199. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs199/en/>.
- [19] Barogui YT, Sopoh GE, Johnson RC, de Zeeuw J, Dossou AD, Houezo JG, et al. Contribution of the Community Health Volunteers in the Control of Buruli Ulcer in Bénin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003200>.
- [20] Weiss MG. Stigma and the Social Burden of Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2008;2(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2359851/>.
- [21] Ray KJ, Porco TC, Hong KC, Lee DC, Alemayehu W, Melese M, et al. A rationale for continuing mass antibiotic distributions for trachoma. *BMC Infectious Diseases.* 2007;7(1):91. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/91/abstract>.
- [22] Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of Neglected Tropical Diseases. *New England Journal of Medicine.* 2007 Septiembre;357(10):1018–1027. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra064142>.
- [23] Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 2014;0:0.
- [24] Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology.* 2005;21(11):508–512.

I.5. Bibliografía introducción

- [25] Malvy D, Chappuis F. Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(7):986–995. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x/abstract>.
- [26] Hotez PJ, Kamath A. Neglected Tropical Diseases in Sub-Saharan Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Disease Burden. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(8):e412. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000412>.
- [27] Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG. The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2):e1007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001007>.
- [28] Mollinedo F. 19. In: Claborn DM, editor. *Alkylphospholipids and Leishmaniasis*. Medicine, Infectious Diseases. InTech; 2014. Available from: <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/alkylphospholipids-and-leishmaniasis>.
- [29] Varela-M RE AMÁyJLPA Dib JC. 39. In: y José Luis Pérez-Arellano AMÁ, editor. *Infecciones difícilmente transmisibles I: Leishmaniosis*. Manual de enfermedades importadas. Elsevier España; 2012. p. 451–460.
- [30] WHO | Leishmaniasis; 2014. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- [31] Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillán R, Flisser A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(1):85–89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920300904516>.

-
- [32] Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Moulton LH, Verastegui M, Rodriguez S, et al. Combined Human and Porcine Mass Chemotherapy for the Control of *T. Solium*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;74(5):850–855. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/74/5/850>.
- [33] O’Neal SE, Moyano LM, Ayvar V, Rodriguez S, Gavidia C, Wilkins PP, et al. Ring-Screening to Control Endemic Transmission of *Taenia solium*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(9):e3125.
- [34] Assana E, Lightowlers MW, Zoli AP, Geerts S. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Africa: risk factors, epidemiology and prospects for control using vaccination. *Veterinary parasitology*. 2013;195(1):14–23.
- [35] Mkupasi EM, Sikasunge CS, Ngowi HA, Johansen MV. Efficacy and safety of anthelmintics tested against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(7):e2200.
- [36] Lightowlers MW. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International journal for parasitology*. 2010;40(10):1183–1192.
- [37] McManus DP, Gray DJ, Zhang W, Yang Y. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2012;344:e3866.
- [38] Kern P. Medical treatment of echinococcosis under the guidance of Good Clinical Practice (GCP/ICH). *Parasitology International*. 2006;55, Supplement:S273–S282. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576905001480>.
- [39] Hemphill A, Spicher M, Stadelmann B, Mueller J, Naguleswaran A, Gottstein B, et al. Innovative chemotherapeutical treatment options for alveolar and cystic echinococcosis. *Parasitology*. 2007;134(Pt 12):1657–1670.

I.5. Bibliografía introducción

- [40] Sithithaworn P, Yongvanit P, Tesana S, Pairojkul C. In: Murrell KD, Fried B, editors. *Liver Flukes*. Springer US; 2007. p. 3–52. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-71358-8_1.
- [41] Murrell KD, Fried B. *Food-Borne Parasitic Zoonoses - Fish and Plant-Borne Parasites*. vol. 11. Springer Science & Business Media; 2007. Available from: <http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/book/978-0-387-71357-1>.
- [42] Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(4):1311–1321. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276811/>.
- [43] Keiser J, Utzinger J. Food-Borne Trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(3):466–483. Available from: <http://cmr.asm.org/content/22/3/466>.
- [44] Toledo R, Esteban JG, Fried B. Current status of food-borne trematode infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31(8):1705–1718. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10096-011-1515-4>.
- [45] Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. Antiparasitic Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 2011;86(6):561–583. Available from: <http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025619611600554/abstract>.
- [46] Ichimori K, King JD, Engels D, Yajima A, Mikhailov A, Lammie P, et al. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: The Processes Underlying Programme Success. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;8(12):e3328. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003328>.

-
- [47] Crump A, Morel CM, Omura S. The onchocerciasis chronicle: from the beginning to the end? *Trends in Parasitology*. 2012;28(7):280–288.
- [48] Lewis F, Tucker M. In: Toledo R, Fried B, editors. *Schistosomiasis*. vol. 766. Springer New York; 2014. p. 47–75. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0915-5_3.
- [49] Secor WE. *SCHISTOSOMIASIS*. vol. 10. Secor, w. evan; colley, daniel g. ed. Secor WEC, editor. Springer; 2005.
- [50] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006;368:1106–18.
- [51] Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):383–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22632645.
- [52] Fried B, Toledo FB Rafael. Digenetic Trematodes. vol. 766. Toledo R, editor. Springer New York; 2014. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0915-5_3.
- [53] Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit Vectors*. 2011;4:131. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21736723.
- [54] WHO. Schistosomiasis; 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.
- [55] Muro A, del Villar LP. In: Liu D, editor. *Schistosoma and Schistosomiasis*. CRC Press; 2012. p. 441–454. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b12264-46>.

I.5. Bibliografía introducción

- [56] Cole G. The metabolism of schistosomes: a review. *International Journal of Biochemistry*. 1973;4(22):319–337.
- [57] Colley DG, Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):347–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142505>.
- [58] Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, de Mattos ACA, Pascarelli BM, de Manso PPA, et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Development genes and evolution*. 2009;219(5):219–234.
- [59] Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite immunology*. 2009;31(11):656–663.
- [60] Hams E, Aviello G, Fallon PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in immunology*. 2013;4.
- [61] Mostafa MH, Sheweita S, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(1):97–111.
- [62] Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contributions to Microbiology*. 2006;13(R):81.
- [63] Casella ML, Fanni VSS, Verndl DO, Basso MC, Mello LF, Glina S. Schistosomiasis mansoni of the bladder simulating bladder cancer: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42(5):581–582.
- [64] El-Tonsy MM, Hussein HM, Helal TES, Tawfik RA, Koriem KM, Hussein HM. *Schistosoma mansoni* infection: Is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? *Acta tropica*. 2013;128(3):542–547.
- [65] da Costa JMC, Vale N, Gouveia MJ, Botelho MC, Sripa B, Santos LL, et al. Schistosome and liver fluke derived catechol-estrogens and helminth associated cancers. *Frontiers in genetics*. 2014;5.

-
- [66] Toledo R, Fried B. Biomphalaria snails and larval trematodes. Springer Science & Business Media; 2010.
- [67] Jones MK, Bong SH, Green KM, Duke M, Loukas A, McManus DP. Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by high pressure freezing. PLoS neglected tropical diseases. 2008;2(11):e334.
- [68] Christensen N. A review of the influence of host-and parasite-related factors and environmental conditions on the host-finding capacity of the trematode miracidium. Acta tropica. 1980;37(4):303–318.
- [69] Eklun-Natey D, Wüest J, Swiderski Z, Striebel H, Huggel H. Comparative scanning electron microscope (SEM) study of miracidia of four human schistosome species. International journal for parasitology. 1985;15(1):33–42.
- [70] Roberts L, Janovy J. Trematoda: form, function, and classification of Digeneans. Foundations of parasitology, 6th edn McGraw-Hill Companies, Dubuque. 2000;p. 670–696.
- [71] Samuelson JC, Caulfield JP. Role of pleated septate junctions in the epithelium of miracidia of *Schistosoma mansoni* during transformation to sporocysts *in vitro*. Tissue and Cell. 1985;17(5):667–682.
- [72] Negrao-Correa D, Mattos A, Pereira C, Martins-Souza R, Coelho P. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of Biomphalaria. Journal of parasitology research. 2012;2012.
- [73] Halton DW. Microscopy and the helminth parasite. Micron. 2004;35(5):361–390.
- [74] Dorsey CH, Cousin CE, Lewis FA, Stirewalt MA. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. Micron. 2002;33(3):279–323.

I.5. Bibliografía introducción

- [75] Collins III JJ, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. PLoS neglected tropical diseases. 2011;5(3):e1009.
- [76] Pereira A, Cavalcanti N, Nascimento G, Nascimento-Silva J, Padilha R, Viegas L, et al. Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) isolated from infected mice. Parasitology research. 2013;112(3):1087–1096.
- [77] Thornhill J, Coelho P, McVeigh P, Maule A, Jurberg A, Kusel J. *Schistosoma mansoni* cercariae experience influx of macromolecules during skin penetration. Parasitology. 2009;136(11):1257–1267.
- [78] He YX, Salafsky B, Ramaswamy K. Comparison of skin invasion among three major species of Schistosoma. Trends in parasitology. 2005;21(5):201–203.
- [79] Fishelson Z, Amiri P, Friend DS, Marikovsky M, Petitt M, Newport G, et al. *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. Experimental parasitology. 1992;75(1):87–98.
- [80] Ruppel A, Chlichlia K, Bahgat M. Invasion by schistosome cercariae: neglected aspects in *Schistosoma japonicum*. Trends in parasitology. 2004;20(9):397–400.
- [81] Hansell E, Braschi S, Medzihradzky KF, Sajid M, Debnath M, Ingram J, et al. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. PLoS neglected tropical diseases. 2008;2(7):e262.
- [82] Ingram JR, Rafi SB, Eroy-Reveles AA, Ray M, Lambeth L, Hsieh I, et al. Investigation of the proteolytic functions of an expanded cercarial elastase gene family in *Schistosoma mansoni*. PLoS neglected tropical diseases. 2012;6(4):e1589.

-
- [83] McKerrow J, Salter J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. *Trends in parasitology*. 2002;18(5):193–195.
- [84] Gobert G, Chai M, McManus D. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. *Parasitology*. 2007;134(04):453–460.
- [85] Georgi JR. *Schistosoma mansoni*: quantification of skin penetration and early migration by differential external radioassay and autoradiography. *Parasitology*. 1982;84(02):263–281.
- [86] Georgi JR, Wade SE, Dean DA. *Schistosoma mansoni*: mechanism of attrition and routes of migration from lungs to hepatic portal system in the laboratory mouse. *The Journal of parasitology*. 1987;p. 706–711.
- [87] Stirewalt M, Shepperson J, Lincicome D. Comparison of penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in four strains of mice. *Parasitology*. 1965;55(02):227–235.
- [88] Anderson LA, Cheever AW. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Bulletin of the World Health Organization*. 1972;46(2):233.
- [89] Wilson RA. The cell biology of schistosomes: a window on the evolution of the early metazoa. *Protoplasma*. 2012;249(3):503–518.
- [90] Mann VH, Morales ME, Rinaldi G, Brindley PJ. Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2010;137(03):451–462.
- [91] Tucker MS, Karunaratne LB, Lewis FA, Freitas TC, Liang Ys. In: *Schistosomiasis*. John Wiley & Sons, Inc.; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im1901s103>.
- [92] Chabasse D, Bertrand G, Leroux J, Gauthey N, Hocquet P. [Developmental bilharziasis caused by *Schistosoma mansoni* discovered 37 years after infestation]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1984;78(5):643–647.

I.5. Bibliografía introducción

- [93] Warren KS, Mahmoud A, Cummings P, Murphy DJ, Houser HB. Schistosomiasis mansoni in Yemeni in California: duration of infection, presence of disease, therapeutic management. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1974;23(5):902–909.
- [94] Jenkins S, Hewitson J, Jenkins G, Mountford A. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. *Parasite immunology*. 2005;27(10-11):385–393.
- [95] Marr J, Nilsen TW, Komuniecki RW. *Molecular medical parasitology*. Academic Press; 2002.
- [96] Jones MK, Gobert GN, Zhang L, Sunderland P, McManus DP. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host–parasite interactions. *Bioessays*. 2004;26(7):752–765.
- [97] Skelly PJ. The surface of schistosomes within the vertebrate host. In: *Schistosomiasis*. Springer; 2005. p. 81–100.
- [98] McLaren DJ, Hockley DJ. Blood flukes have a double outer membrane. 1977;.
- [99] Ruppel A, McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: surface membrane stability *in vitro* and *in vivo*. *Experimental parasitology*. 1986;62(2):223–236.
- [100] Van Hellemond JJ, Retra K, Brouwers JF, van Balkom BW, Yazdanbakhsh M, Shoemaker CB, et al. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International journal for parasitology*. 2006;36(6):691–699.
- [101] Faghiri Z, Skelly PJ. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *The FASEB Journal*. 2009;23(8):2780–2789.

-
- [102] Pereira AS, Padilha RJR, Lima-Filho JL, Chaves ME. Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research*. 2011;109(5):1395–1402.
- [103] King CH. Health metrics for helminthic infections. *Advances in parasitology*. 2010;73:51–69.
- [104] Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuem Tchuenté LA, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*. 2013;128(2):423–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22580511.
- [105] Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med*. 2002;346:1212–20.
- [106] Rokni MB. In: Rokni MB, editor. *Schistosomiasis*. InTech; 2012. p. 310. Available from: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/control-of-schistosomiasis>.
- [107] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014;383(9936):2253–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24698483.
- [108] Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2009;31(4):163–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19292768.
- [109] Wilson S, Vennervald BJ, Dunne DW. Chronic hepatosplenomegaly in African school children: a common but neglected morbidity associated with schistosomiasis and malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(8):e1149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912707>.

I.5. Bibliografía introducción

- [110] Luis Pérez del Villar Moro JLP AyAMÁ Virginia Velasco Trirado. 42. In: y José Luis Pérez-Arellano AMÁ, editor. Infecciones difícilmente transmisibles IV: Esquistosomosis. Manual de enfermedades importadas. Elsevier España; 2012. p. 483–491.
- [111] Center for Disease Control and Prevention. Parasites: Schistosomiasis; 2015 [cited Epidemiology & Risk Factors]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/epi.html>.
- [112] Grobusch M, Mühlberger N, Jelinek T, Bisoffi Z, Corachan M, Harms G, et al. Imported schistosomiasis in Europe: sentinel surveillance data from TropNetEurop. *Journal of travel medicine*. 2003;10(3):164–167.
- [113] Roca C, Balanzo X, Gascón J, Fernández-Roure J, Vinuesa T, Valls M, et al. Comparative, clinico-epidemiologic study of *Schistosoma mansoni* infections in travellers and immigrants in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;21(3):219–223.
- [114] Bottieau E, Clerinx J, De Vega MR, Van den Enden E, Colebunders R, Van Esbroeck M, et al. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *Journal of Infection*. 2006;52(5):339–345.
- [115] Burke M, Jones M, Gobert G, Li Y, Ellis M, McManus D. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology*. 2009;31(4):163–176.
- [116] Ramaswamy K, Kumar P, He YX. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Immunology*. 2000;165(8):4567–4574.

-
- [117] Pivarsci A, Kemeny L, Dobozy A. Innate immune functions of the keratinocytes. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2004;51(3):303–310.
- [118] Harrop R, Jennings N, Mountford A, Coulson P, Wilson R. Characterization, cloning and immunogenicity of antigens released by transforming cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2000;121(04):385–394.
- [119] Allam G. Vasoactive intestinal peptide inhibits liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni and modulates IL-10, IL-12 and TNF- α production. *Immunobiology*. 2007;212(8):603–612.
- [120] Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(7):499–511.
- [121] Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta tropica*. 2008;108(2):109–117.
- [122] Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Populatio. *The Journal of Immunology*. 2006;176(10):5839–5847.
- [123] Layland LE, Mages J, Loddenkemper C, Hoerauf A, Wagner H, Lang R, et al. Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. *The journal of immunology*. 2010;184(2):713–724.
- [124] Anthony BJ, Ramm GA, McManus DP. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends in parasitology*. 2012;28(12):572–579.

I.5. Bibliografía introducción

- [125] McKee AS, Pearce EJ. CD25+ CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *The Journal of Immunology*. 2004;173(2):1224–1231.
- [126] Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kühn R, et al. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *The Journal of Immunology*. 1998;160(9):4473–4480.
- [127] Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases*. 1999;179(6):1502–1514.
- [128] Schramm G, Haas H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes and Infection*. 2010;12(12):881–888.
- [129] Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. 2000;164(12):6406–6416.
- [130] Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *European journal of immunology*. 2003;33(4):880–888.
- [131] Abath FG, Morais CN, Montenegro CEL, Wynn TA, Montenegro SM. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in parasitology*. 2006;22(2):85–91.
- [132] Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(12):975–987.

-
- [133] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(3):1910–1914.
- [134] Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *The Journal of Immunology*. 2000;165(11):6107–6115.
- [135] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1849–1861.
- [136] Díaz A, Allen JE. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *European journal of immunology*. 2007;37(12):3319–3326.
- [137] Rutitzky LI, Stadecker MJ. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *European journal of immunology*. 2011;41(9):2677–2687.
- [138] Ross AG, Sleigh AC, Li Y, Davis GM, Williams GM, Jiang Z, et al. Schistosomiasis in the People’s Republic of China: prospects and challenges for the 21st century. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(2):270–295.
- [139] Pérez-Arellano J, Epinoza E, Sánchez M, Muro A. Evasion mechanisms of parasites. *Res Rev Parasitol*. 2001;61:4–16.
- [140] Han ZG, Brindley PJ, Wang SY, Chen Z. Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2009;10:211–240.
- [141] Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Developmental & Comparative Immunology*. 2009;33(1):5–13.

I.5. Bibliografía introducción

- [142] Loukas A, Jones MK, King LT, Brindley PJ, McManus DP. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infection and immunity*. 2001;69(6):3646–3651.
- [143] Bennett M, Caulfield J. Specific binding of human low-density lipoprotein to the surface of schistosome of *Schistosoma mansoni* and ingestion by the parasite. *The American journal of pathology*. 1991;138(5):1173.
- [144] Chiang CP, Caulfield JP. The binding of human low-density lipoproteins to the surface of schistosome of *Schistosoma mansoni* is inhibited by polyanions and reduces the binding of anti-schistosomal antibodies. *The American journal of pathology*. 1989;134(5):1007.
- [145] Huang HH, Rigouin C, Williams DL. The redox biology of schistosome parasites and applications for drug development. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(24):3595.
- [146] De Paula RG, de Magalhães Ornelas AM, Morais ER, de Castro Borges W, Natale M, Magalhães LG, et al. Biochemical characterization and role of the proteasome in the oxidative stress response of adult *Schistosoma mansoni* worms. *Parasitology research*. 2014;113(8):2887–2897.
- [147] Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(3):218–224.
- [148] Othman A, El Ridi R. Schistosomiasis. In: Bruschi F, editor. *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Springer Vienna; 2014. p. 49–92. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1782-8_3.
- [149] Dalton PR, Pole D. Water-contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. *Bulletin of the World Health Organization*. 1978;56(3):417.

-
- [150] Verani JR, Abudho B, Montgomery SP, Mwinzi PN, Shane HL, Butler SE, et al. Schistosomiasis among young children in Usoma, Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(5):787–791.
- [151] Linsuke S, Nundu S, Mupoyi S, Mukele R, Mukunda F, Kabongo MM, et al. High Prevalence of *Schistosoma mansoni* in Six Health Areas of Kasansa Health Zone, Democratic Republic of the Congo: Short Report. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(12):e3387.
- [152] Brandt CT, Oliveira BS, Nogueira JdBm, Neves JR, Lopes TL. Hepatosplenic schistosomiasis in children: morphologic and functional evaluation after splenectomy and autologous splenic implantation. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 1998;25(6):399–402.
- [153] Ferraz A, Bacelar T, Silveira M, Coelho A, Câmara NR, de Araújo JJ, et al. Surgical treatment of schistosomal portal hypertension. *International surgery*. 2000;86(1):1–8.
- [154] Justo CRE, Brandt CT, Lucena MT, Jales M. Effect of splenectomy and ligation of the left gastric vein on portal hypertensive colopathy in carriers of surgical hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20(1):9–14.
- [155] Maia MD, Lopes EP, Ferraz ÁAB, Barros FM, Domingues ALC, Ferraz EM. Evaluation of splenomegaly in the hepatosplenic form of mansonic schistosomiasis. *Acta tropica*. 2007;101(3):183–186.
- [156] Wilson S, Vennervald BJ, Dunne DW. Chronic hepatosplenomegaly in African school children: a common but neglected morbidity associated with schistosomiasis and malaria. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(8):e1149.
- [157] Brandt CT, Brandão S, Domingues A, Gondra L, Viana R. Splenosis after splenectomy and spleen tissue autoimplantation: Late

I.5. Bibliografía introducción

- followup study. Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons. 2012;17(3):104.
- [158] Mitreva M. The genome of a blood fluke associated with human cancer. Nature genetics. 2012;44(2):116–118.
- [159] Corstjens PL, Nyakundi RK, de Dood CJ, Kariuki TM, Ochola EA, Karanja DM, et al. Improved sensitivity of the urine CAA lateral-flow assay for diagnosing active Schistosoma infections by using larger sample volumes. Parasites & vectors. 2015;8(1):1–9.
- [160] Van Dam G, Bogitsh B, Van Zeyl R, Rotmans J, Deelder AM. Schistosoma mansoni: *in vitro* and *in vivo* excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. The Journal of parasitology. 1996;p. 557–564.
- [161] Standley C, Lwambo N, Lange C, Kariuki H, Adriko M, Stothard J. Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. Parasit Vectors. 2010;3(7):293.
- [162] Tchuenté LT, Fouodo C, Ngassam RK, Sumo L, Noumedem C, Kenfack CM, et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of Schistosoma mansoni infection in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(7):1758.
- [163] Ibrionke O, Koukounari A, Asaolu S, Moustaki I, Shiff C. Validation of a new test for Schistosoma haematobium based on detection of Dra1 DNA fragments in urine: evaluation through latent class analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(1):e1464–e1464.
- [164] Wichmann D, Poppert S, Von Thien H, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, et al. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. BMC infectious diseases. 2013;13(1):55.

-
- [165] Xu J, Rong R, Zhang H, Shi C, Zhu X, Xia C. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *International journal for parasitology*. 2010;40(3):327–331.
- [166] Wang C, Chen L, Yin X, Hua W, Hou M, Ji M, et al. Application of DNA-based diagnostics in detection of schistosomal DNA in early infection and after drug treatment. *Parasit Vectors*. 2011;4:164.
- [167] Fernández-Soto P, Arahuetes JG, Hernández AS, Abán JL, Santiago BV, Muro A. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. 2014;.
- [168] Ferreira MS, de Oliveira DN, de Oliveira RN, Allegretti SM, Catharino RR. Screening the life cycle of *Schistosoma mansoni* using high-resolution mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2014;845:62–69.
- [169] Seubert J, Pohlke R, Loebich F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. *Experientia*. 1977;33(8):1036–1037.
- [170] Reich MR, Govindaraj R, Dumbaugh K, Yang Bm, Brinkmann A, El-Saharty S. International strategies for tropical disease treatments. 1998; Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jwhozip48e/6.html>.
- [171] Gönnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1977;52(2):129–150.
- [172] Leopold G, Ungethüm W, Groll E, Diekmann H, Nowak H, Wegner D. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. *European journal of clinical pharmacology*. 1978;14(4):281–291.

I.5. Bibliografía introducción

- [173] Katz N, Rocha R, Chaves A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. Bulletin of the World Health Organization. 1979;57(5):781.
- [174] Davis A, Biles J, Ulrich AM. Initial experiences with praziquantel in the treatment of human infections due to *Schistosoma haematobium*. Bulletin of the World Health Organization. 1979;57(5):773.
- [175] Ishizaki T, Kamo E, Boehme K. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. Bulletin of the World Health Organization. 1979;57(5):787.
- [176] Andrews P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. Pharmacology & therapeutics. 1985;29(1):129–156.
- [177] Liu Y, Qian M, Wang X, Jia J, Wang Q, Jiang Y, et al. Comparative efficacy of praziquantel and its optic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. Chinese medical journal. 1986;99(12):935.
- [178] Shu-Hua X, Catto BA. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. The Journal of infectious diseases. 1989;p. 589–592.
- [179] Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN, Yang QJ, et al. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1991;45(3):345–349.
- [180] Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. Current opinion in infectious diseases. 2008;21(6):659–667.
- [181] Committee WE, et al. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. World Health Organization technical report series. 2002;912:i.

-
- [182] Castro N, Medina R, Sotelo J, Jung H. Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(10):2903–2904.
- [183] Valencia C, Catto B, Webster Jr L, Barcelon E, Ofendo-Reyes R. Concentration time course of praziquantel in Filipinos with mild *Schistosoma japonicum* infection. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1994;25(2):409–414.
- [184] Mandour MEM, El Turabi H, Homeida MM, el Sadig T, Ali HM, Bennett JL, et al. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;84(3):389–393.
- [185] Steiner K, Garbe A, Diekmann H, Nowak H. The fate of praziquantel in the organism I. Pharmacokinetics in animals. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1976;1(2):85–95.
- [186] Cioli D, Pica-Mattoccia L, Basso A, Guidi A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and biochemical parasitology*. 2014;195(1):23–29.
- [187] Loukas A, Bethony JM. New drugs for an ancient parasite. *Nature medicine*. 2008;14(4):365–367.
- [188] WHO | Schistosomiasis. Estimated number of individuals in the country requiring preventive chemotherapy for schistosomiasis annually; 2013. Available from: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html. 03151.
- [189] Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuente LAT, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta tropica*. 2013;128(2):423–440.
- [190] Lavrik IN, Eils R, Fricker N, Pforr C, Krammer PH. Understanding apoptosis by systems biology approaches. *Mol Biosyst*. 2009;5(10):1105–1111.

I.5. Bibliografía introducción

- [191] Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(5):378–390.
- [192] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(1):3–11.
- [193] Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012;19(1):107–120.
- [194] Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009;325(5938):332–336.
- [195] Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008;135(7):1311–1323.
- [196] Roach H, Clarke N. Physiological cell death of chondrocytes *in vivo* is not confined to apoptosis NEW OBSERVATIONS ON THE MAMMALIAN GROWTH PLATE. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 2000;82(4):601–613.
- [197] Xu K, Tavernarakis N, Driscoll M. Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *Neuron*. 2001;31(6):957–971.
- [198] Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(1):37–43.
- [199] McCall K. Genetic control of necrosis—another type of programmed cell death. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(6):882–888.

-
- [200] Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):135–147.
- [201] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012;8(4):445–544.
- [202] Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular microbiology*. 2006;61(3):655–674.
- [203] Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *TRENDS in Parasitology*. 2007;23(8):376–383.
- [204] Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(1):58–66.
- [205] Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(1):21–30.
- [206] González-Estévez C, Saló E. Autophagy and apoptosis in planarians. *Apoptosis*. 2010;15(3):279–292.
- [207] Müller WE. The origin of metazoan complexity: Porifera as integrated animals. *Integrative and Comparative Biology*. 2003;43(1):3–10.
- [208] Rodrigues JCF, Seabra SH, de Souza W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. 2006;23(1):87–98.

I.5. Bibliografía introducción

- [209] Moquin D, Chan FKM. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(8):434–441.
- [210] Lasi M, Pauly B, Schmidt N, Cikala M, Stiening B, Käsbauer T, et al. The molecular cell death machinery in the simple cnidarian Hydra includes an expanded caspase family and pro-and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Cell research*. 2010;20(7):812–825.
- [211] Bender CE, Fitzgerald P, Tait SW, Llambi F, McStay GP, Tupper DO, et al. Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(13):4904–4909.
- [212] Mohapatra AD, Kumar S, Satapathy AK, Ravindran B. Caspase dependent programmed cell death in developing embryos: a potential target for therapeutic intervention against pathogenic nematodes. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(9):e1306.
- [213] Reece SE, Pollitt LC, Colegrave N, Gardner A. The meaning of death: evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS pathogens*. 2011;7(12):e1002320.
- [214] Peng Z, Xue B, Kurgan L, Uversky V. Resilience of death: intrinsic disorder in proteins involved in the programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2013;20(9):1257–1267.
- [215] Zmasek CM, Godzik A. Evolution of the animal apoptosis network. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(3):a008649.
- [216] Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*. 1994;76(4):665–676.
- [217] Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research*. 1999;59(7 Supplement):1701s–1706s.

-
- [218] YuAN J, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental biology*. 1990;138(1):33–41.
- [219] Lee EF, Clarke OB, Evangelista M, Feng Z, Speed TP, Tchoubrieva EB, et al. Discovery and molecular characterization of a Bcl-2-regulated cell death pathway in schistosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(17):6999–7003.
- [220] Lee EF, Young ND, Lim NT, Gasser RB, Fairlie WD. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. *Trends in parasitology*. 2014;30(2):75–84.
- [221] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 2009;460(7253):352–358.
- [222] Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nature genetics*. 2012;44(2):221–225.
- [223] Zhou Y, Zheng H, Chen Y, Zhang L, Wang K, Guo J, et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature*. 2009;460(7253):345–351.
- [224] Lacoste A, Cueff A, Poulet SA. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate β -adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *Journal of cell science*. 2002;115(4):761–768.
- [225] Galanti SE, Huang SCC, Pearce EJ. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1509.
- [226] Luo R, Zhou C, Shi Y, Zhao J, Cheng G. Molecular characterization of a cytokine-induced apoptosis inhibitor from *Schistosoma japonicum*. *Parasitology research*. 2012;111(6):2317–2324.

I.5. Bibliografía introducción

- [227] Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN, et al. Lipid biochemistry. Springer; 2002.
- [228] Vance JE, Vance DE. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Elsevier; 2008.
- [229] Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(8):582–591.
- [230] Tigyi G, Parrill AL. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in lipid research*. 2003;42(6):498–526.
- [231] Bittman R. The 2003 ASBMB-Avanti Award in Lipids Address: applications of novel synthetic lipids to biological problems. *Chemistry and physics of lipids*. 2004;129(2):111–131.
- [232] Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry*. 2004;73(1):321–354.
- [233] Li Z, Baker DL, Tigyi G, Bittman R. Synthesis of photoactivatable analogues of lysophosphatidic acid and covalent labeling of plasma proteins. *The Journal of organic chemistry*. 2006;71(2):629–635.
- [234] Dalton JP, Skelly P, Halton DW. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Canadian Journal of Zoology*. 2004;82(2):211–232.
- [235] Furlong ST, Caulfield J. Head group precursors modify phospholipid synthesis in *Schistosoma mansoni*. *Journal of lipid research*. 1991;32(4):703–712.
- [236] Rabia I, El-Ahwany E, El-Komy W, Nagy F. Immunomodulation of Hepatic Morbidity in Murine Schistosomiasis mansoni Using Fatty Acid Binding Protein. *Journal of American Science*. 2010;6(7).

-
- [237] Meyer F, Meyer H, Bueding E. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1970;210(2):257–266.
- [238] Skelly PJ, Da'dara AA, Li XH, Castro-Borges W, Wilson RA. Schistosome Feeding and Regurgitation. *PLoS pathogens*. 2014;10(8):e1004246.
- [239] THOMPSON DP, GEARY TG. 12 The Structure and Function of Helminth Surfaces. *Biochemistry and Molecular biology of Parasites*. 1995;p. 203.
- [240] Brouwers JF, Van Hellemond JJ, van Golde LM, Tielens AG. Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1998;96(1):49–58.
- [241] Brouwers J, Versluis C, GOLDE L, TIELENS A. 5-Octadecenoic acid: evidence for a novel type of fatty acid modification in schistosomes. *Biochem J*. 1998;334:315–319.
- [242] de Kroon AI. Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007;1771(3):343–352.
- [243] Modolell M, Andreesen R, Pahlke W, Brugger U, Munder PG. Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyl-lysophospholipids. *Cancer research*. 1979;39(11):4681–4686.
- [244] Vogler W, Whigham E, Bennett W, Olson A. Effect of alkyl-lysophospholipids on phosphatidylcholine biosynthesis in leukemic cell lines. *Experimental hematology*. 1985;13(7):629–633.
- [245] Hąc-Wydro K, Dynarowicz-Łątka P, Wydro P, Bąk K. Edelfosine disturbs the sphingomyelin–cholesterol model membrane system in a

I.5. Bibliografía introducción

- cholesterol-dependent way—The Langmuir monolayer study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;88(2):635–640.
- [246] Czynz O, Bitew T, Cuesta-Marbán A, McMaster CR, Mollinedo F, Zarembeg V. Alteration of plasma membrane organization by an anticancer lysophosphatidylcholine analogue induces intracellular acidification and internalization of plasma membrane transporters in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(12):8419–8432.
- [247] Hall SL, Braschi S, Truscott M, Mathieson W, Cesari IM, Wilson RA. Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. *Molecular and biochemical parasitology*. 2011;179(1):18–29.
- [248] Garver WS, Krishnan K, Gallagos JR, Michikawa M, Francis GA, Heidenreich RA. Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae. *Journal of lipid research*. 2002;43(4):579–589.
- [249] Tempone AJ, Bianconi ML, Rumjanek FD. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997;177(1-2):139–144.
- [250] Braschi S, Borges WC, Wilson RA. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101:205–212.
- [251] Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*. 2006;6(5):1471–1482.
- [252] Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006;5(2):347–356.

-
- [253] Matyash V, Geier C, Henske A, Mukherjee S, Hirsh D, Thiele C, et al. Distribution and Transport of Cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(6):1725–1736.
- [254] Grant B, Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(12):4311–4326.
- [255] Sánchez-Blanco A, Rodríguez-Matellán AG, Reis-Sobreiro M, Sáenz-Narciso B, Cabello J, Mohler WA, et al. *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell Cycle*. 2014;13(21):3375–3389.
- [256] Moser D, Tendler M, Griffiths G, Klinkert MQ. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8447–8454.
- [257] Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000;1486(1):28–44.
- [258] Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(6):489–503.
- [259] Gajda AM, Storch J. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2014;.
- [260] Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2006;142(3):262–274.
- [261] Waggoner DW, Manning JA, Bass NM, Bernlohr DA. In situ binding of fatty acids to the liver fatty acid binding protein: analysis

I.5. Bibliografía introducción

- using 3-[125 I] iodo-4-azido-N-hexadecylsalicylamide. Biochemical and biophysical research communications. 1991;180(1):407–415.
- [262] Waggoner D, Bernlohr D. In situ labeling of the adipocyte lipid binding protein with 3-[125I] iodo-4-azido-N-hexadecylsalicylamide. Evidence for a role of fatty acid binding proteins in lipid uptake. Journal of Biological Chemistry. 1990;265(20):11417–11420.
- [263] Glatz J, Vork M, Cistola D, Van der Vusse G. Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. 1993;48(1):33–41.
- [264] Abumrad NA, Forest CC, Regen DM, Sanders S. Increase in membrane uptake of long-chain fatty acids early during preadipocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991;88(14):6008–6012.
- [265] Kiens B, Kristiansen S, Jensen P, Richter EA, Turcotte LP. Membrane associated fatty acid binding protein (FABP_{pm}) in human skeletal muscle is increased by endurance training. Biochemical and biophysical research communications. 1997;231(2):463–465.
- [266] Turcotte LP, Srivastava AK, Chiasson JL. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP_{PM}) in red skeletal muscle. Molecular and cellular biochemistry. 1997;166(1-2):153–158.
- [267] Newberry EP, Davidson NO. Liver fatty acid binding protein (L-FABP) as a target for the prevention of high fat diet induced obesity and hepatic steatosis. Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents). 2009;9(1):30–37.
- [268] LaLonde JM, Levenson MA, Roe JJ, Bernlohr DA, Banaszak LJ. Adipocyte lipid-binding protein complexed with arachidonic acid.

Titration calorimetry and X-ray crystallographic studies. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(41):25339–25347.

- [269] Storch J, McDermott L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *Journal of lipid research*. 2009;50(Supplement):S126–S131.
- [270] Hillyer G. Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of helminthology*. 2005;79(03):241–247.
- [271] Kusel J, Al-Adhami B, Doenhoff M. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanisms of adaptation. *Parasitology*. 2007;134(11):1477–1526.
- [272] Tendler M, Simpson AJ. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta tropica*. 2008;108(2):263–266.
- [273] Tendler M, Ramos CRR, Simpson AJ. Sm14 *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein: Molecular Basis for an Antihelminth Vaccine. *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*. 2012;p. 435–449.
- [274] Angelucci F, Johnson KA, Baiocco P, Miele AE, Brunori M, Valle C, et al. *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein: specificity and functional control as revealed by crystallographic structure. *Biochemistry*. 2004;43(41):13000–13011.
- [275] El-Ansary A. Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2003;136(2):227–243.
- [276] Okazaki T, Honjo T. The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology*. 2006;27(4):195–201.
- [277] Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(6):375–388.

I.5. Bibliografía introducción

- [278] Wilson M. 16. In: Lamb T, editor. Trematoda: Schistosomes. John Wiley & Sons, Ltd; 2012. p. 287–305.
- [279] Xu X, Sun J, Zhang J, Wellems D, Qing X, McCutchan T, et al. Having a pair: the key to immune evasion for the diploid pathogen *Schistosoma japonicum*. Scientific reports. 2012;2.
- [280] Freitas TC, Jung E, Pearce EJ. A bone morphogenetic protein homologue in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*. International journal for parasitology. 2009;39(3):281–287.
- [281] LoVerde PT, Andrade LF, Oliveira G. Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. Current opinion in microbiology. 2009;12(4):422–428.
- [282] Brindley PJ. The molecular biology of schistosomes. TRENDS in Parasitology. 2005;21(11):533–536.
- [283] Saunders N, Wilson RA, Coulson PS. The outer bilayer of the adult schistosome tegument surface has a low turnover rate *in vitro* and *in vivo*. Molecular and biochemical parasitology. 1987;25(2):123–131.
- [284] Brouwers JF, Smeenk IM, van Golde LM, Tielens AG. The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. Molecular and biochemical parasitology. 1997;88(1):175–185.
- [285] Bansal D, Bhatti HS, Sehgal R. Role of cholesterol in parasitic infections. Lipids Health Dis. 2005;4(10):1–7.
- [286] Popiel I, Basch PF. *Schistosoma mansoni*: cholesterol uptake by paired and unpaired worms. Experimental parasitology. 1986;61(3):343–347.
- [287] Silveira AMS, de Lima Friche AA, Rumjanek FD. Transfer of [14 C] cholesterol and its metabolites between adult male and female worms of *Schistosoma mansoni*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 1986;85(4):851–857.

-
- [288] Protasio AV, Tsai IJ, Babbage A, Nichol S, Hunt M, Aslett MA, et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(1):e1455.
- [289] Elbeyioglu F. Lipid rafts and cell signalling in *Schistosoma mansoni*. Kingston University; 2014.
- [290] Lohner K. Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chemistry and physics of lipids*. 1996;81(2):167–184.
- [291] Smith A, Stubbs C. Modulation of membrane protein function by bilayer lipids. In: *Lipid metabolism in the normoxic and ischaemic heart*. Springer; 1987. p. 93–97.
- [292] Eibl H, Arnold D, Weltzien H, Westphal O. [On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs]. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1966;709:226–230.
- [293] Andreesen R, Modolell M, Weltzien HU, Eibl H, Common HH, Löhr GW, et al. Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids. *Cancer research*. 1978;38(11 Part 1):3894–3899.
- [294] Berdel W, Bausert W, Fink U, Rastetter J, Munder P. Anti-tumor action of alkyl-lysophospholipids (Review). *Anticancer research*. 1980;1(6):345–352.
- [295] Munder P, Westphal O. Antitumoral and Other Biomedical Activities of Synthetic Ether Lysophospholipids (Part 2 of 2). 1990;.
- [296] Mollinedo F, Gajate C, Martín-Santamaría S, Gago F. ET-18-OCH₃ (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Current medicinal chemistry*. 2004;11(24):3163–3184.

I.5. Bibliografía introducción

- [297] Mollinedo F. Antitumour ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic indications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2007;17(4):385–405.
- [298] Gajate C, Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Current drug metabolism*. 2002;3(5):491–525.
- [299] Mollinedo F. Editorial (Thematic Issue: Antitumor Alkylphospholipid Analogs: A Promising and Growing Family of Synthetic Cell Membrane-Targeting Molecules for Cancer Treatment). *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2014;14(4):495–498.
- [300] Boggs KP, Rock CO, Jackowski S. Lysophosphatidylcholine attenuates the cytotoxic effects of the antineoplastic phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(19):11612–11618.
- [301] Mollinedo F, Fernández-Luna JL, Gajate C, Martín-Martín B, Benito A, Martínez-Dalmau R, et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer research*. 1997;57(7):1320–1328.
- [302] Gajate C, Mollinedo F. Lipid rafts, endoplasmic reticulum and mitochondria in the antitumor action of the alkylphospholipid analog edelfosine. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2014;14(4):509–527.
- [303] Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of

Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood*. 2001;98(13):3860–3863.

- [304] Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood*. 2007;109(2):711–719.
- [305] Nieto-Miguel T, Gajate C, Mollinedo F. Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(21):14833–14840.
- [306] Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, de Mendoza AEH, Villa-Pulgarin JA, de Frias M, et al. *In vitro* and *in vivo* selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(7):2046–2054.
- [307] Mollinedo F, De la Iglesia-Vicente J, Gajate C, de Mendoza AEH, Villa-Pulgarin J, Campanero MA, et al. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 2010;29(26):3748–3757.
- [308] van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013;1831(3):663–674.
- [309] van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(21):2061–2074.
- [310] Hanson PK, Malone L, Birchmore JL, Nichols JW. Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36041–36050.

I.5. Bibliografía introducción

- [311] Zarembeg V, Gajate C, Cacharro LM, Mollinedo F, McMaster CR. Cytotoxicity of an anti-cancer lysophospholipid through selective modification of lipid raft composition. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(45):38047–38058.
- [312] Cuesta-Marbán Á, Botet J, Czyz O, Cacharro LM, Gajate C, Hornillos V, et al. Drug uptake, lipid rafts, and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(12):8405–8418.
- [313] Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Jañez E, Justies N, Collía F, et al. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009;329(2):439–449.
- [314] Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(11):2576–2597.
- [315] de Almeida Pachioni J, Magalhães JG, Lima EJC, de Moura Bueno L, Barbosa JF, de Sá MM, et al. Alkylphospholipids—A Promising Class of Chemotherapeutic Agents with a Broad Pharmacological Spectrum. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2013;16(5):742–759.
- [316] Abramowski P, Steinbach K, Zander AR, Martin R. Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2014;274(1):111–124.
- [317] Croft SL, Seifert K, Duchêne M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003;126(2):165–172.

-
- [318] Eissa MM, El-Azzouni MZ, Amer EI, Baddour NM. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. *International journal for parasitology*. 2011;41(2):235–242.
- [319] Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, Muñoz DL, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1612.
- [320] Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Dakir EH, Mollinedo F, Muro A. *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine. *PloS one*. 2014;9(10):e109431.
- [321] Marco C, Ríos-Marco P, M Jiménez-López J, L Segovia J, P Carrasco M. Antitumoral Alkylphospholipids Alter Cell Lipid Metabolism. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2014;14(4):545–558.
- [322] Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000;111(1):1–14.
- [323] Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;54(4):704–710.
- [324] Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996;38(6):1041–1047.
- [325] Santa-Rita RM, Santos Barbosa H, Meirelles MdNSL, de Castro SL. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*.

I.5. Bibliografía introducción

- 2000;75(2):219–228. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X00000528>.
- [326] Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, Castro SLd. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(5):780–784. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/55/5/780>.
- [327] Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;47(5):537–546.
- [328] Saraiva VB, Gibaldi D, Previato JO, Mendonça-Previato L, Bozza MT, Freire-de Lima CG, et al. Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) against Drug-Resistant Strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(11):3472–3477. Available from: <http://aac.asm.org/content/46/11/3472>.
- [329] de Castro SL, Santa-Rita RM, Urbina JA, Croft SL. Antiprotozoal lysophospholipid analogues: a comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumor cells. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2004;4(2):141–151.
- [330] Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*. 2009;29(3):448–455.

-
- [331] Konstantinov SM, Kaminsky R, Brun R, Berger MR, Zillmann U. Efficacy of anticancer alkylphosphocholines in *Trypanosoma brucei* subspecies. *Acta Tropica*. 1997;64(3-4):145–154.
- [332] Papagiannaros A, Bories C, Demetzos C, Loiseau PM. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2005;59(10):545–550. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332205001915>.
- [333] Achterberg V, Gercken G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1987;23(2):117–122. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685187901460>.
- [334] Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*. 1987;36(16):2633–2636. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295287905430>.
- [335] Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012;31(2):109–118.
- [336] Azzouz S, Maache M, Garcia RG, Osuna A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2005;96(1):60–65.
- [337] Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*. 2002;81(2):151–157. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X01001978>.

I.5. Bibliografía introducción

- [338] Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero JE. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of Leishmania species. *Parasitology research*. 2007;100(5):1155–1157.
- [339] Cabrera-Serra MG, Valladares B, Piñero JE. *In vivo* activity of perifosine against Leishmania amazonensis. *Acta tropica*. 2008;108(1):20–25.
- [340] Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*. 2002;347(22):1739–1746.
- [341] Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2011;377(9764):477–486. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673610620508>.
- [342] van Griensven J, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *The Lancet*. 11;377(9764):443–444. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673610622374>.
- [343] Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero JE. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of Leishmania species. *Parasitology Research*. 2007;100(5):1155–1157. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-006-0408-4>.
- [344] Cabrera-Serra MG, Valladares B, Piñero JE. *In vivo* activity of perifosine against Leishmania amazonensis. *Acta Tropica*. 2008;108(1):20–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002222>.

-
- [345] Gelmedin VM. Targeting flatworm signaling cascades for the development of novel anthelmintic drugs. 2008;.
- [346] Reuter S, Manfras B, Merkle M, Härter G, Kern P. *In vitro* activities of itraconazole, methiazole, and nitazoxanide versus *Echinococcus multilocularis* larvae. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(9):2966–2970.
- [347] Eissa MM, El Bardicy S, Tadros M. Bioactivity of miltefosine against aquatic stages of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and their snail hosts, supported by scanning electron microscopy. Parasites & vectors. 2011;73:4–11.
- [348] Bertão HG, da Silva RAR, Padilha RJR, de Azevedo Albuquerque MCP, Rádis-Baptista G. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. Parasitology research. 2012;110(6):2465–2473.

II

CAPÍTULO HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El fármaco de elección para tratar la esquistosomosis es el praziquantel, aunque su falta de eficacia contra formas juveniles y la generación de resistencias sobre todo tras los tratamientos masivos que se realizan en áreas edémicas, nos sugiere, disponer de otros fármacos activos contra esta enfermedad. Los análogos Alquilfosfolípidos (APLs) son compuestos con acción antitumoral que han mostrado eficacia contra parasitosis, principalmente leishmaniosis y tripanosomosis. Por tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que estos fármacos podrían constituir una nueva alternativa en la terapia de la esquistosomosis.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto *in vitro* e *in vivo* de los alquilfosfolípidos utilizando un modelo experimental de esquistosomosis murina.

II.2.1 Objetivos específicos

1. Obtener cultivos de esquistosómulas y vermes adultos de *S. mansoni* para realizar ensayos farmacológicos.
2. Comprobar dos parámetros de muerte de esquistosómulas y vermes adultos frente a edelfosina, miltefosina, perifosina y erucilfosfocolina.
3. Realizar comparación de la muerte *in vitro* de esquistosómulas y adultos de *S. mansoni* a diferentes concentraciones de cuatro análogos alquilfosfolípidos.
4. Estudiar la actividad antiparasitaria en ratones CD1, tratados con edelfosina durante todo el proceso de infección con *S. mansoni*, y el posible uso como profiláctico.

-
5. Identificar la respuesta inmunológica en ratones CD1, tratados con edelfosina, praziquantel y su combinación.
 6. Identificar la presentación o ausencia de apoptosis como posible causa de muerte de los parásitos en respuesta al tratamiento *in vitro* a la edelfosina.

A continuación de este capítulo, se dará comienzo al capítulo denominado artículos, el cual está contenido la mayoría de los materiales y métodos, resultados y demás presentado en forma de publicaciones aceptadas como producto final del proyecto de investigación realizado durante el trabajo doctoral de esta tesis.

III

CAPÍTULO

ARTÍCULOS DE
INVESTIGACIÓN

III.1 ARTÍCULO 1

In Vitro and In Vivo
Anti-Schistosomal Activity of
the Alkylphospholipid Analog
Edelfosine

Edward Yepes,
Rubén E. Varela-M,
Julio López-Abán,
EL Habib Dakir,
Faustino Mollinedo, Antonio Muro.

PLoS ONE 2014

9(10): e109431.

Doi:10.1371/journal.pone.0109431



In Vitro and In Vivo Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine

Edward Yepes^{1,2}, Rubén E. Varela-M², Julio López-Abán¹, E L Habib Dakir², Faustino Mollinedo², Antonio Muro^{1*}

1 IBSAL-CIETUS (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

Abstract

Background: Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. Five species of *Schistosoma* are known to infect humans, out of which *S. haematobium* is the most prevalent, causing the chronic parasitic disease schistosomiasis that still represents a major problem of public health in many regions of the world and especially in tropical areas, leading to serious manifestations and mortality in developing countries. Since the 1970s, praziquantel (PZQ) is the drug of choice for the treatment of schistosomiasis, but concerns about relying on a single drug to treat millions of people, and the potential appearance of drug resistance, make identification of alternative schistosomiasis chemotherapies a high priority. Alkylphospholipid analogs (APLs), together with their prototypic molecule edelfosine (EDLF), are a family of synthetic antineoplastic compounds that show additional pharmacological actions, including antiparasitic activities against several protozoan parasites.

Methodology/Principal Findings: We found APLs ranked edelfosine > perifosine > erucylphosphocholine > miltefosine for their *in vitro* schistosomicidal activity against adult *S. mansoni* worms. Edelfosine accumulated mainly in the worm tegument, and led to tegumental alterations, membrane permeabilization, motility impairment, blockade of male-female pairing as well as induction of apoptosis-like processes in cells in the close vicinity to the tegument. Edelfosine oral treatment also showed *in vivo* schistosomicidal activity and decreased significantly the egg burden in the liver, a key event in schistosomiasis.

Conclusions/Significance: Our data show that edelfosine is the most potent APL in killing *S. mansoni* adult worms *in vitro*. Edelfosine schistosomicidal activity seems to depend on its action on the tegumental structure, leading to tegumental damage, membrane permeabilization and apoptosis-like cell death. Oral administration of edelfosine diminished worm and egg burdens in *S. mansoni*-infected CD1 mice. Here we report that edelfosine showed promising antischistosomal properties *in vitro* and *in vivo*.

Citation: Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Dakir ELH, Mollinedo F, et al. (2014) *In Vitro* and *In Vivo* Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine. PLoS ONE 9(10): e109431. doi:10.1371/journal.pone.0109431

Editor: Henk D. F. H. Schallig, Royal Tropical Institute, Netherlands

Received: May 20, 2014; **Accepted:** September 1, 2014; **Published:** October 10, 2014

Copyright: © 2014 Yepes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-30518, and RD12/0036/0065 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union), European Community's Seventh Framework Programme FP7-2007-2013 (grant HEALTH-F2-2011-256986, PANACREAS), Junta de Castilla y León (CSI052A11-2and SA342U13), Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (RFEF-SEMTSI 2013) and the Universidad de Salamanca (USAL17008). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: ama@usales

Introduction

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, being a major problem of public health. The genus *Schistosoma* contains 21 species, which are classified into four groups according to the geographic distribution, morphology of the parasite's eggs, and the intermediate host. Five major schistosome species are able to infect humans: *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, and *S. mekongi*, although human infections by *S. malayensis*, *S. matthei*, and *S. guineensis* have also been described. Schistosomiasis is acquired by contact

with freshwater contaminated with cercariae larvae, which actively penetrate mammal skin and transform into the schistosomula phase, migrating toward the lungs and then re-entering the venous circulation [1]. Both male and female schistosome parasites achieve sexual maturity in the bloodstream, then sexual reproduction occurs with the deposition of hundreds to thousands of eggs per day. Deposition of *Schistosoma* eggs in the tissues is a stimulus to the influx of immune cells that leads to the development of a granulomatous reaction. This immunological reaction protects the host by neutralizing the schistosome egg antigens and destroying eggs. However, the granulomas are the

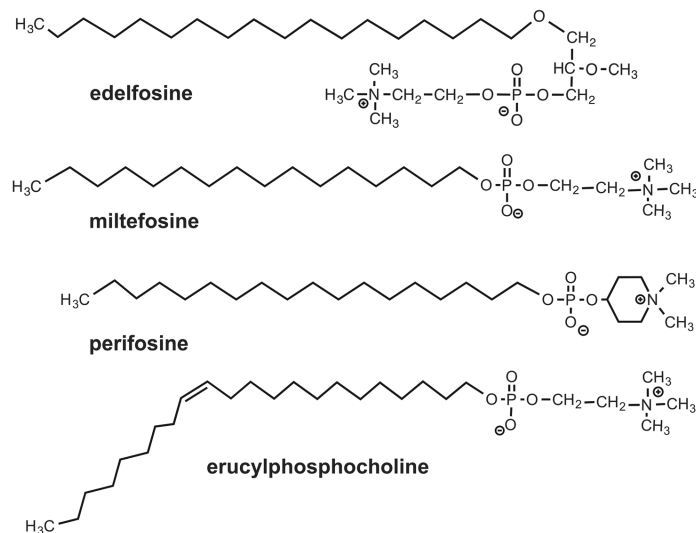


Figure 1. Chemical structures of edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine.
doi:10.1371/journal.pone.0109431.g001

most important pathogenic event in schistosomiasis since the deposition of collagen and the development of fibrosis cause the fibro-obstructive disease. Nevertheless, paradoxically, the development of granulomatous inflammation around parasite eggs has an essential host-protective and facilitates the successful excretion of the eggs from the host [2–4]. The World Health Organization (WHO) announced in October 2001 that schistosomiasis epidemiology should be recalculated. It is estimated more than 700 million people in 78 countries endemic for schistosomiasis are at risk of this disease. Furthermore, 240 million people are infected (80% in sub-Saharan Africa), 120 million have symptoms, and 20 million have severe disease, which results in approximately 280,000 deaths annually [2,5,6]. An additional report even increases the estimate of infected people to 391–597 million [7]. Some authors report the significant impact of the morbidity caused by schistosomiasis, as reflected in the loss of 1.53 million disability-adjusted life years [1]. The disease is among the Neglected Tropical Diseases catalogued by the Global Plan to combat Neglected Tropical Diseases 2008–2015, and is considered to be the second most socioeconomically devastating parasitic disease by the WHO, immediately after malaria [8].

Praziquantel is the main drug for the treatment of schistosomiasis, since oxamniquine and metrifonate are not currently available [9,10]. However, praziquantel does not prevent reinfection and its administration requires taking into consideration the stage of the disease. Praziquantel is highly efficient against adult worms, being less effective against juvenile parasites (7–35 days) [11]. In the chronic phase, the dose of praziquantel depends on the species involved [2,12]. The fact that schistosomiasis treatment is limited to one single pharmaceutical presents the risk associated with the appearance of resistances. The WHO has recognized the necessity of identifying new compounds as alternatives to praziquantel. In the last decade, only derivatives of artemisinin have appeared as a complement to the therapy against schisto-

somiasis. The use of these derivatives in combination with praziquantel can be a good strategy of control, since the artemisinin derivatives are effective against the juvenile phases of the parasite [9]. In addition, the activity of the artemisinin derivatives as antiparasitic chemotherapy has been demonstrated in numerous clinical trials [13–15]. However, the use of these antimalarial drugs in the treatment and/or control of schistosomiasis might lead to the appearance of malaria resistance to these compounds. Several experts are warning about the putative emergence of resistance to praziquantel, due to its massive use in schistosomiasis control campaigns, and the existence of drug resistant parasites in laboratory isolates [16]. This makes it necessary to find new molecules or therapeutic targets for schistosomiasis control.

Alkylphospholipid analogs (APLs) are a class of structurally related synthetic lipid compounds, including edelfosine, miltefosine, perifosine, and erucylphosphocholine (Figure 1), that act on cell membranes rather than on DNA [17–19]. Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine), considered as the prototype APL molecule, is a promising antitumor ether phospholipid drug [20–22], which acts by activating apoptosis through its interaction with cell membranes [19,23–25]. In addition to its antitumor activity, edelfosine has been shown to exert *in vitro* and *in vivo* antiparasitic activity against different species of *Leishmania* parasites [26]. Miltefosine has also been shown to exert activity against leishmaniasis and schistosomiasis [27,28]. Both *Leishmania* and *Schistosoma* parasites share geographic areas in tropical and subtropical countries [29,30]. Here we have investigated the putative anti-schistosomal properties of edelfosine, as compared to other APLs, by *in vitro* and *in vivo* approaches, using an experimental mouse model of *S. mansoni* infection.

Materials and Methods

Ethics statement

Animal procedures in this study complied with the Spanish (Ley 32/2007, Ley 6/2013 and Real Decreto 53/2013) and the European Union (European Directive 2010/63/EU) regulations on animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals, and were conducted at the accredited Animal Experimentation Facility of the University of Salamanca (Register number: PAE/SA/001). Procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Salamanca (protocol approval number 48531). The animals' health status was monitored throughout the experiments by a health surveillance program according to Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) guidelines.

Drugs

Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocoline) was obtained from R. Berchtold (Biochemisches Labor, Bern, Switzerland). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) was from Calbiochem (Cambridge, MA). Perifosine (octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidinio-4-yl)-phosphate) and erucylphosphocholine ((13Z)-docos-13-en-1-yl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate) were from Zentaris (Frankfurt, Germany). Stock sterile solutions of the distinct APLs (2 mM) were prepared in RPMI-1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, as previously described [20]. Praziquantel (PZQ) was obtained as Biltricid tablets (Bayer Vital, Leverkusen, Germany) and was dispersed in water with 2–2.5% Cremophor A6 oil-in-water emulsifier (Sigma, MO).

Parasite maintenance, recovery and culture

Cercariae of *Schistosoma mansoni* (LE strain) were maintained routinely in *Biomphalaria glabrata* snails and female CD1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) at University of Salamanca. Mice were maintained in polycarbonate and wire standard cages for 10 mice with food and water *ad libitum* in an environment under an alternating 12/12-h light-dark cycle at 20°C. Six-week-old females weighing 23–26 g were percutaneously infected with 150 *S. mansoni* cercariae per animal after being restrained with a mixture of ketamine 50 mg/kg of body weight, diazepam 5 mg/kg and atropine 1 mg/kg injected intraperitoneally. After 7–8 weeks, mice were killed with a lethal dose of 60 mg/kg of pentobarbital plus heparin (2 IU/mL) and then perfused aseptically with PBS and heparin (500 IU/L) to obtain couples, males and females from the portal and mesenteric veins [31,32]. The worms were washed in RPMI-1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), kept at pH 7.5 with 20 mM HEPES and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, as previously described [31]. All mice were monitored daily by the staff from Animal Experimentation facility and after day 42 post-infection by a member of the research group qualified in animal welfare. Animals presenting any deterioration of the health status were killed with a lethal dose of pentobarbital 60 mg/kg.

In vitro antischistosomal activity

Adult worms washed in RPMI-1640 were collected, counted, and transferred to RPMI-1640 medium (supplemented with 20 mM HEPES, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine). The worms were rinsed twice with this

medium and distributed one pair of adult worms per well in 24-well culture plates. FBS was added to a final concentration of 10%, and the cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 2 h of culture to allow for adaptation, APLs were added to a final concentration of 1 to 80 µM (from a stock solution of 2 mM in RPMI-1640). The effects of APLs on *S. mansoni* adult worms were monitored every 24 h during 168 h for control groups and APL treatments. A number of parameters were evaluated to assess worm general condition, including: motility, alterations in the tegument, mortality rate, and changes in pairing [33]. The worms were considered dead when no movement was detected for at least 2 min of examination [34]. Additional criteria for viability were the MTT assay (see below), as well as pairing, egg production, and video-imaging to record morphological alterations and dead worms [35]. Worms were observed under a Nikon eclipse Ti inverted research microscope (Nikon Instruments, Amstelveen, The Netherlands). Video recordings were taken using a ProgRes C3 camera and a ProgRes MAC CapturePro software version 2.7 (JENOPTIK Optical Systems, Jena, Germany). As controls, pairs of *S. mansoni* adult worms were incubated in the presence RPMI-1640 (negative control) or were killed by heating at 56°C or treatment with 10 µM PZQ (positive control). All experiments were carried in quadruplicate.

Assay for parasite viability

A three-step colorimetric quantitative assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was used to assess parasite viability [36]. The MTT assay is based on the uptake of the tetrazolium salt by viable/living cells followed by its reduction in the mitochondria to purple formazan, the colored product. The amount of formazan produced is proportional to the number of living cells, giving a measure of viability. In this study, worms were distributed (one pair of adult worms per well) in 96-well culture plates, containing 100 µL of phosphate buffered saline (PBS) with 0.5 mg MTT/mL for 30 min at 37°C. The solution was carefully removed and replaced with 200 µL dimethylsulfoxide (DMSO). Worms incubated in drug-free RPMI-1640 medium (negative control group) were allowed to stand in DMSO at room temperature for 1 h, and absorbance was read at 550 nm using an ELISA reader (Anthos 2010; Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Heat-killed worms at 56°C and worms treated with 10 µM PZQ were used as positive control groups. APLs were added to a final concentration of 1 to 80 µM (from a stock solution of 2 mM in RPMI-1640) for up to 168 h incubation.

We studied the incorporation of propidium iodide (PI) in adult worms to assess the differential membrane permeability to this dye. The effect of edelfosine (1–80 µM) was analyzed following incubation for 24 h. After washing the parasites, PI was simultaneously added to each well of the microtiter plate to obtain a final concentration of 2.0 mg/mL in 96-well microtiter plates. Fluorescently labeled parasites were subsequently detected using a BioTek Synergy 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT) fluorescent plate reader containing appropriate filters (485/20 nm excitation, 645/20 nm emission). All experiments were carried in quadruplicate.

Distribution of fluorescent edelfosine analog in *S. mansoni*

Four couples of adult worms were transferred and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 20 mM HEPES, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin. Each well of a 24-well culture plate containing 2 mL of RPMI-1640 culture medium and two parasitic couples was incubated for 1 h with 10 µM of the

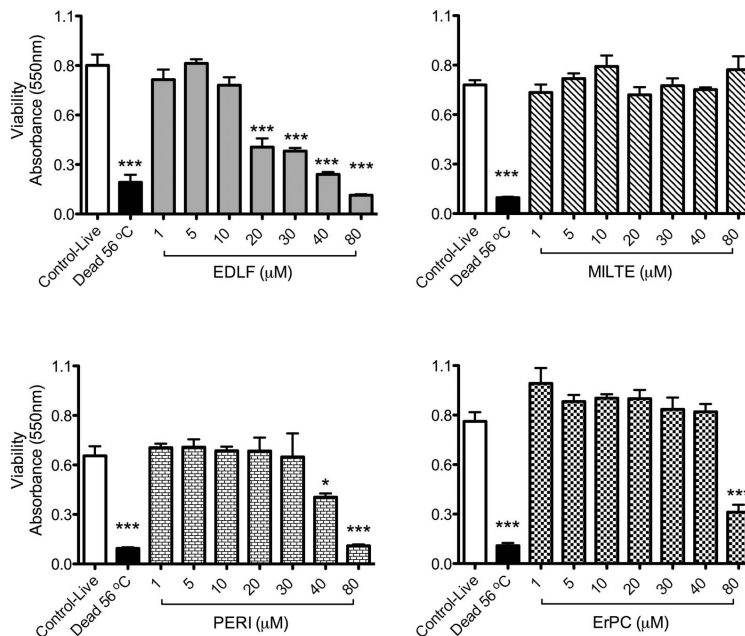


Figure 2. In vitro effects of APLs on the viability of *S. mansoni* adult worms measured by MTT assay. Couples of adult worms were treated with edelfosine (EDLF), miltefosine (MILTE), perifosine (PERI) or erucylphosphocholine (ErPC) at the indicated concentrations for 168 h. Data are means \pm SEM of three separate experiments. Asterisks represent statistical significance with respect to control-live group. (*) P < 0.05; (***) P < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0109431.g002

fluorescent edelfosine 1-*O*-[11'-(6"-ethyl-1",3",5",7"-tetramethyl-4", 4"-difluoro-4"-bora-3a",4a"-diaz-a-s-indacen-2"-yl)undecyl]-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine [37,38]. In addition, two parasitic couples were incubated in RPMI-1640 only (control of autofluorescence). Parasites were analyzed with a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). All experiments were performed in quadruplicate.

Assessment of apoptosis by TUNEL Assay

The DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI) was used to detect apoptosis. Parasite sections (4 μm) were deparaffinized in xylene, and rehydrated in graded ethanol and distilled water. After being rinsed three times with PBS, the slides were permeabilized with proteinase K (20 μg/mL) in proteinase K buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA) for 15 min at room temperature. The slides were incubated with equilibrium buffer [200 mM potassium cacodylate, 25 mM Tris-HCl, pH 6.6, 0.2 mM dithiothreitol (DTT), 0.25 mg/mL bovine serum albumin, 2.5 mM cobalt chloride] at room temperature for 30 min, followed by assessment of cell apoptosis with a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling kit according to the manufacturer's instructions, and using fluorescence microscopy (Carl Zeiss). In histological sections, the apoptotic index, defined as the percentage of apoptotic cells, was used as a quantitative measure of apoptosis. The apoptotic index was determined as follows: (number of TUNEL-positive cells/total number of cells) \times 100.

Histopathological analysis

Parasites were fixed in 4% buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin. The tissue sections of schistosomes (4 μm) were deparaffinized and hydrated in graded ethanol and PBS, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histopathological evaluation was done under microscope analysis. The slides were viewed using an Olympus BX51 microscope coupled with Olympus DP Controller software to capture images [39,40].

In vivo study of antischistosomal activity

Six-week-old female CD1 mice (Charles River), weighing 23–26 g, were kept in the Animal Experimentation Facility. Mice were randomly allocated into three experimental groups and all were chemically restrained and percutaneously exposed to 150 *S. mansoni* cercariae per animal [32]. Group 1 received the vehicle solution (water) via oral administration from day 42 to day 52 post-infection (p.i.) (n = 7); group 2 were orally treated with 500 mg/kg/day of PZQ on days 47 and 48 p.i. (n = 7); and group 3 were orally treated with 45 mg/kg/day of edelfosine from day 42 and 52 p.i. (n = 7). Mice were euthanized at week 9 p.i. with a lethal dose of pentobarbital (60 mg/kg), and then perfused to recover adult worms from portal and mesenteric veins [31,32]. The number of parasite eggs per gram (epg) in liver was counted after digestion with 25 mL 5% KOH (16 h at 37°C with gentle shaking) [41].

Table 1. *In vitro* effects of APLs on 56-day-old *S. mansoni* worms upon 168 h of culture.

Samples	Number of worms	Number of separated worms	Number of dead worm	Motor activity reduction			Number of worms with regumental alterations		
				Slight	Significant	Partial	Extensive	Partial	Extensive
Control-Live ^a	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Dead 56 ^c ^b	8	-	8	-	8	4	4	4	4
PZO ^c	8	-	8	-	8	-	-	-	8
Edelfosine									
1 μ M	8	-	-	2	-	4	-	-	-
5 μ M	8	6	-	2	6	4	4	4	4
10 μ M	8	8	4	4	4	2	6	6	6
20 μ M	8	8	8	-	8	-	8	8	8
30 μ M	8	8	8	-	8	-	8	8	8
40 μ M	8	8	8	-	8	-	8	8	8
80 μ M	8	8	8	-	8	-	8	8	8
Miltefosine									
1 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
5 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
10 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
20 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
30 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
40 μ M	8	-	-	4	-	-	-	-	-
80 μ M	8	4	-	6	-	-	4	4	4
Perfosine									
1 μ M	8	2	-	-	-	-	-	-	-
5 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
10 μ M	8	2	-	4	-	6	-	-	-
20 μ M	8	8	2	6	2	6	2	2	2
30 μ M	8	8	2	-	8	2	8	8	8
40 μ M	8	8	6	2	6	-	8	8	8
80 μ M	8	8	8	-	8	-	8	8	8
Erucylphosphocholine									
1 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
5 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-
10 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 1. Cont.

Samples	Number of worms	Number of separated worms	Number of dead worm	Motor activity reduction		Number of worms with tegumental alterations		
				Slight	Significant	Partial	Extensive	
20 μ M	8	-	-	-	-	-	-	-
30 μ M	8	4	-	-	-	-	-	-
40 μ M	8	8	-	2	6	2	2	2
80 μ M	8	8	8	-	8	-	-	8

^aRPMI 1640.

^bControl – positive.

^cTested at concentration of 10 μ M.

doi:10.1371/journal.pone.0109431.t001

Statistical analysis

Results were analyzed in GraphPad Prism Version 5 (Graphpad Software Inc.) and are expressed as mean \pm SEM. Test for normality was performed by Kolmogorov-Smirnov, and then one-way ANOVA analysis of variance, followed by Dunnett's or Kruskal Wallis comparison test, were performed to determine any statistical differences between treated groups and untreated controls. The data were considered significant if *P*-value was < 0.05.

Results

In vitro schistosomicidal activity of APLs

First we analyzed the schistosomicidal activity of the four most clinically relevant APLs, namely edelfosine, perifosine, miltefosine and erucylphosphocholine, used at the range of 1–80 μ M, against adult worms. By testing parasite viability using the MTT assay after 168 h incubation, we found that edelfosine was the most active APL in killing *S. mansoni* adult worms, being effective at 20 μ M, whereas miltefosine was inactive even at the highest concentration used (80 μ M) (Figure 2). Perifosine decreased parasite viability at 40 μ M and erucylphosphocholine at 80 μ M (Figure 2). The differential schistosomicidal activity of the above APLs was further supported by the microscopic observation of *S. mansoni* adult worms incubated as above with the four APLs at a concentration range of 1–80 μ M to examine separation of coupled pairs, mortality, decrease in motor activity, and tegumental alterations as shown in Table 1 and Tables S1–S3. Again, edelfosine was the most potent APL in promoting parasite death (50% at 10 μ M and 100% at 20 μ M) in *S. mansoni* adult forms after 168 h treatment (Table 1). Incubations with 1 and 5 μ M edelfosine resulted in effects on motor activity and tegumental alterations (Table 1), indicating that *S. mansoni* adult forms were very sensitive to edelfosine treatment. Perifosine also showed significant schistosomicidal activity, but higher drug concentrations were required to achieve similar effects to those exerted by edelfosine (Table 1; Tables S1–S3). In contrast, erucylphosphocholine (erucyl-PC) and miltefosine required very high doses of > 40 μ M to elicit some effects on the parasites (Table 1). On the basis of these morphological observations, erucylphosphocholine was only able to kill parasites at 80 μ M, whereas miltefosine was unable to promote parasite death even at that concentration (Table 1), thus further supporting the above MTT data.

Dose- and time-dependent effects of edelfosine on *S. mansoni* adult worms

Because edelfosine was the most potent APL against *S. mansoni* adults, we further analyzed the effects of this drug on these worms. A time-course analysis of the effect of different concentrations of edelfosine showed that this drug could kill *S. mansoni* adult worms when incubated at 20 μ M for 72 h (Figure 3) and at 30 μ M for 48 h incubation (Figure 3). This is of interest as this concentration range was similar to that found as steady-state concentration of edelfosine in plasma (10–20 μ M) in animal model *in vivo* assays [21,22,42]. The induction of structural damage and death in *S. mansoni* adult parasites by edelfosine was further supported by time-lapse videomicroscopy (Video S1), showing an increased intestinal lumen and oral as well as ventral sucker paralysis. In addition, membrane permeabilization was detected by incorporation of propidium iodide (PI) into dead parasites (Figure 4A). Parasite motility was also observed and measured under an inverted light microscope, as lack of motility represents the death of the parasite. We found that low concentrations of edelfosine (5–10 μ M) were enough to promote structural changes in the

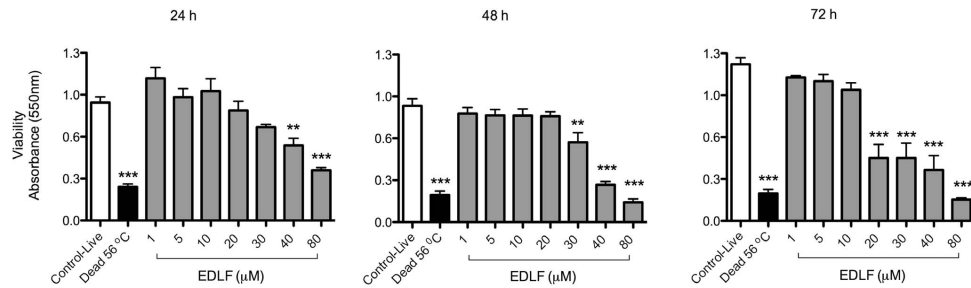


Figure 3. *In vitro* effects of edelfosine (EDLF) on the viability of *S. mansoni* adult worms measured by MTT assay. Couples of adult worms were treated with EDLF at the indicated concentrations for 24 h, 48 h and 74 h. Data are means \pm SEM of three separate experiments. Asterisks represent statistical significance with respect to control-live group. (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0109431.g003

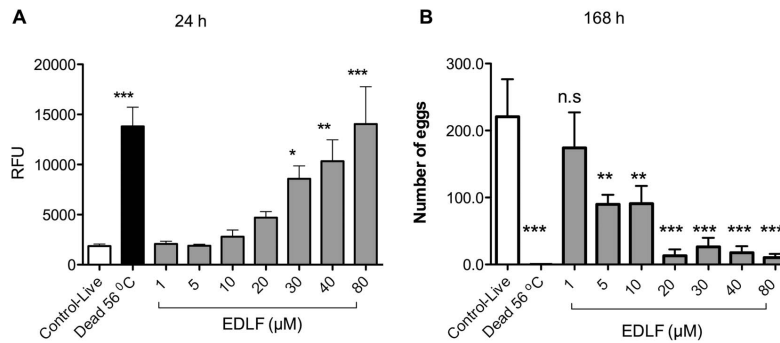


Figure 4. *In vitro* effects of edelfosine (EDLF) on the viability of *S. mansoni* adult worms measured by propidium iodide (PI) permeabilization and *in vitro* effects of edelfosine on egg production. Couples of adult worms were treated with EDLF at the indicated concentrations for 24 h (A) or 168 h (B), and then analyzed for membrane permeabilization using PI staining (A) and for the number of laid eggs, monitored using an inverted microscope (B). RFU, relative fluorescence units. Data are means \pm SEM of three separate experiments. Asterisks represent statistical significance with respect to control-live group. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0109431.g004

parasite, both in motor activity reduction and in the tegument, as well as to split the pairs of coupled adult worms into individual female and male worms (Table 1 and Video S1), the latter being more affected than the former following incubation with 10 μ M edelfosine.

Effect of edelfosine on the egg production of *S. mansoni* adult worms

Schistosome eggs are considered a major cause of liver injury and illness. About half of the laid eggs lodge in the liver sinusoids, where they are trapped acting as granulomatogenic triggers, granuloma formation being strictly dependent on viable mature eggs [43]. In order to evaluate the action of edelfosine on egg production by adult worms of *S. mansoni*, edelfosine was incubated at different concentrations for 168 h. As shown in Fig. 4B, edelfosine (5–80 μ M) treatment showed a significant decrease in the number of eggs after 168 h of incubation. The effect of edelfosine on the separation of the coupled adult worms could be related to this decrease on egg production.

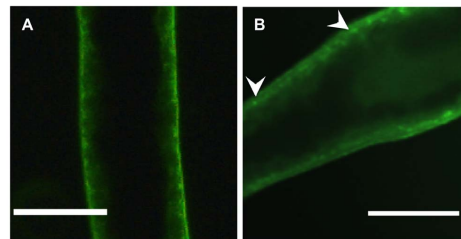


Figure 5. Distribution of the fluorescent edelfosine analog in *S. mansoni* adult female worms. A) Control of autofluorescence in a female cultured in RPMI-1640 only. B) Female incubated with the fluorescent edelfosine analog. Arrows show a slightly increased staining at the tegument. Scale bar, 0.2 mm. doi:10.1371/journal.pone.0109431.g005

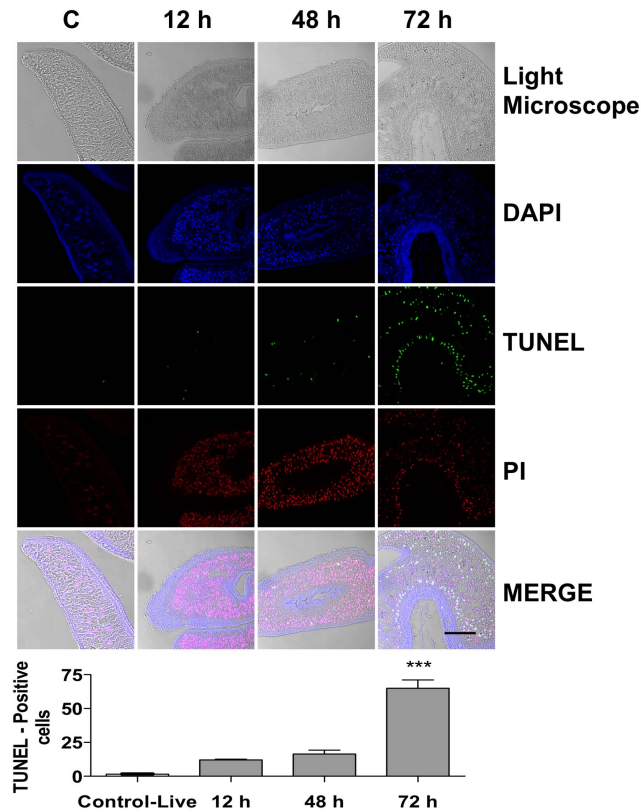


Figure 6. Edelfosine-induced apoptosis-like death as assessed by TUNEL assay. Adult worms were untreated (Control) or treated with 20 μ M edelfosine (EDLF) for 12 h, 48 h and 72 h. Worms were analyzed by fluorescence microscopy for propidium iodide (PI) staining and TUNEL assay, as well as for DAPI staining (nuclei) and light microscopy morphology. Merging of PI and TUNEL panels (Merge) shows the apoptotic nuclei in yellow. Data shown are representative of four independent experiments. Histograms indicate the percentage of TUNEL-positive cells, as an estimate of cells undergoing apoptosis. For each experiment, at least 100 cells were analyzed. Data are means \pm SEM of three separate experiments. Asterisks represent statistical significance with respect to control-live group. (***) $P < 0.001$. Scale bar, 100 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0109431.g006

Distribution of fluorescent edelfosine analog in pairs of adult *S. mansoni* worms

The major interface and physical barrier between the schistosome and its external environment is through the tegument, consisting of a syncytium enclosed by a double outer tegumental membrane made up of two apposed lipid bilayers, which coats the worm and is a prime site of intimate host-parasite interaction. It performs vital functions and is of crucial importance for modulation of the host response and parasite survival [28]. By using the fluorescent edelfosine analog 1-*O*-[11'-(6"-ethyl-1",3",5",7"-tetramethyl-4"-di-fluoro-4"-bora-3a",4a"-diaz-a-s-indacen-2"-yl)undecyl]-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine, which has been previously used as a reliable analog of edelfosine to analyze its subcellular localization in single cells [37,38], we found that adult *S. mansoni* worms took up the fluorescent analog, showing a rather diffuse staining in the whole worm, although it appeared to be most

concentrated at the tegument (Figure 5). Thus, these data indicate that edelfosine is incorporated at the adult worm with a major tegumental location.

Edelfosine induces apoptosis-like death in *S. mansoni* adult worms and changes at the tegument

Induction of apoptotic cell death is one of the main mechanisms by which edelfosine exerts its antitumor action [20,24,25]. On these grounds, we analyzed whether edelfosine could promote apoptosis in *S. mansoni* adult worms, by using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) technique for detecting DNA damage. Labeling of the 3'-OH ends of DNA, generated by DNA fragmentation, through incorporation of fluorescein-12-dUTP allowed visualization of apoptotic cells as green fluorescent cells. Worms were permeabilized and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and

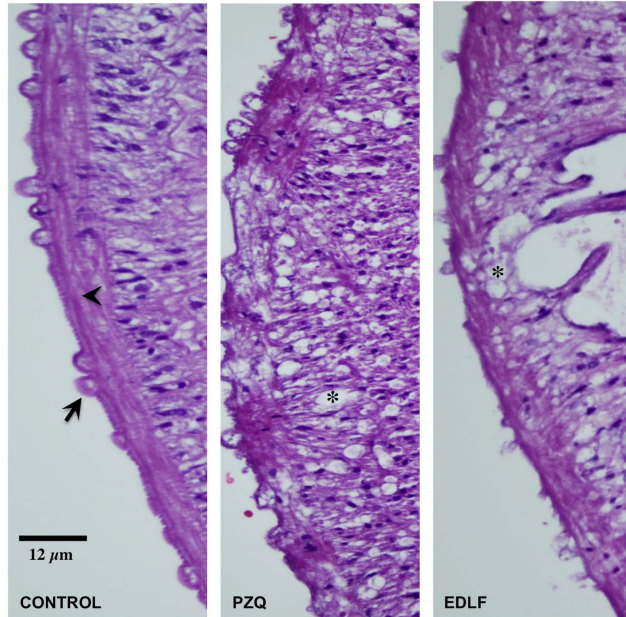


Figure 7. Morphological changes in *S. mansoni* adult worms following praziquantel or edelfosine treatments. H&E stained sections of freshly recovered male parasites that were untreated (Control) or treated with 10 μ M praziquantel (PZQ) or 20 μ M edelfosine (EDLF) for 2 days. Tubercle collapse (arrow), damages of the tegument surface, vacuolization of the subtegumental cells (asterisk) and destruction of muscle layers (arrowhead) were observed after treatment with PZQ or EDLF.
doi:10.1371/journal.pone.0109431.g007

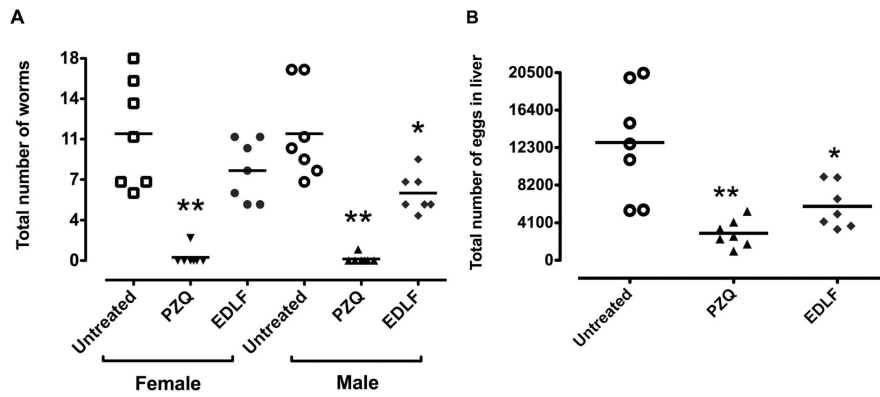


Figure 8. Effect on adult worm and egg burdens after treatment of *S. mansoni*-infected mice with praziquantel (PZQ) or edelfosine (EDLF). (A) male and female worm burdens. (B) egg burden in liver. Infected mice were treated with 500 mg/kg (x2) PZQ or 45 mg/kg (x10) EDLF. Each point represents data from an individual mouse. Horizontal bars indicate average values. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$.
doi:10.1371/journal.pone.0109431.g008

propidium iodide (PI) to visualize all nuclei from both non-apoptotic and apoptotic cells in blue and red, while TUNEL-positive cells were stained yellow in the row of the merged images and non apoptotic cells as pink fluorescent cells. We found a potent apoptosis-like response in edelfosine-treated *S. mansoni* adult worms, this apoptotic-like response being particularly abundant in cells close to the tegument (Figure 6). This edelfosine-induced apoptosis-like response increased with the incubation time (Figure 6). In addition, edelfosine treatment led to severe lesions of the tegument and subtegument tissues in both male and female worms, such as: *i*) tubercle collapse; *ii*) exfoliation and erosion of the tegument surface together with exposure and vacuolization of the subtegumental cells in the perinuclear cytoplasm of syncytium and epithelium; *iii*) extensive destruction of muscle layers (Figure 7 and Video S1).

In vivo* schistosomicidal activity of edelfosine in mice infected by *S. mansoni

Daily oral administration of 15 or 30 mg/kg edelfosine was well tolerated by CD1 mice, 45 mg/kg being the maximum tolerated dose, following toxicity analyses, where animals were monitored for body weight loss or any appreciable side effect, including changes in strength and general condition. We found that oral treatment of mice infected with *S. mansoni* led to a reduction in the male (46.84 %) and female (29.1 %) worm burdens (Figure 8A), the decrease in male worm burden being statistically significant. PZQ treatment led to a practically complete depletion of adult worms (Figure 8A), so praziquantel treatment was more potent than that of edelfosine. Interestingly, edelfosine treatment dramatically decreased the total number of eggs recovered in livers (54.2% reduction), this inhibition in egg production being statistically significant as was the corresponding reduction (77%) exerted by praziquantel (Figure 8B).

Discussion

Our results show the first evidence for the *in vitro* and *in vivo* schistosomicidal activity of the ether phospholipid edelfosine. This ether lipid is considered as the prototype of APLs, a family of compounds that act as promising drugs for diverse biomedical applications, including the treatment of parasitic diseases [19,44]. Two previous reports have shown *in vivo* [28] and *in vitro* [43] schistosomicidal activity of the APL miltefosine. However, here we found that edelfosine showed a more potent schistosomicidal activity, and APLs ranked edelfosine > perifosine > erucylphosphocholine > miltefosine for their *in vitro* activity against *S. mansoni* adult worms. Edelfosine shows also *in vivo* schistosomicidal activity, and although its activity is not as potent as that of praziquantel, the current drug of choice for schistosomiasis treatment, our data indicate that oral treatment with edelfosine decreases significantly the egg burden in liver, a key event in schistosomiasis. Our present data suggest that edelfosine is incorporated mainly in the worm tegument, promoting tegumental alterations, membrane permeabilization, motility impairment, blockade of male-female pairing and additional structural changes, which eventually lead to parasite death. In addition, we showed the induction of apoptosis-like cell death in cells apposed to the tegument, as visualized by TUNEL assays.

The integrity and function of the surface tegumental membrane are critical to the survival and proliferation of *Schistosoma*. The tegument, a syncytium covered by two lipid bilayers that is a unique structure to all trematodes [46–49]. In fact the two lipid bilayer structure pertains only to trematodes that live within blood vessels [50], plays vital roles like evasion of the immune system,

acquisition of nutrients, excretion of catabolic products, targeted drug absorption and other physiological processes [47,49,51–54]. Most of the drugs active against schistosomiasis damage the worm tegument, including praziquantel [55], oxamniquine [56], artemether [57], mefloquine [34,58], atorvastatin alone or in combination with medroxyprogesterone acetate [59], and thioxo-imidazole compounds [60]. Scanning electron microscopy studies have recently shown that miltefosine induces severe tegumental damage in adult schistosomes [28,45,61]. In this regard, our present data on the tegumental damage elicited by edelfosine agree with those previously reported with miltefosine [28,45], thus suggesting that APLs could be promising drugs for schistosomiasis. Furthermore, miltefosine has been reported to have *in vitro* ovicidal, larvicidal as well as lethal activity on adult worms of *S. mansoni* and *S. haematobium*, and displays molluscicidal activity on their snail hosts [61]. Miltefosine is approved for use in humans against leishmaniasis [27,62], and pharmacokinetic as well as different studies on animal models have shown the relative lack of significant toxicity of edelfosine when used at pharmacologically relevant doses [21,22,38,42,63]. On these grounds, APLs might be promising and rather safe drugs for the treatment of schistosomiasis.

Since the 1970s the treatment of schistosomiasis has relied on a single drug, praziquantel, [8,64,65], that is considered as the gold standard and the drug of choice, having been successfully used over the past 35 years to control schistosomiasis in many countries. This exclusive dependency on praziquantel is alarming, raising concerns about the reliance on a single drug to treat over 200 million people that might lead to the potential appearance of massive resistance to the drug [10,11,16,65–68]. As a result, identification of alternative schistosomiasis chemotherapies is a high priority issue.

The results shown here indicate that edelfosine significantly decreases egg burden *in vitro* and *in vivo*. This effect could be due, at least in part, to the separation of male and female schistosomes parasites induced by edelfosine, since female schistosomes produce eggs only when they are in intimate association with a male [69]. Edelfosine kills mainly adult male worms through an apoptosis-like cell death mechanism. In this regard, it is worth mentioning that edelfosine is a proapoptotic agent in cancer cells [20,24,25], and it seems to promote an apoptosis-like process in *Leishmania* parasites [26]. The likely involvement of different mechanisms of action for the schistosomicidal activities of praziquantel and edelfosine might suggest that the combination of these two drugs could promote a synergistic action and/or minimize the possibility of drug resistance, as has been proposed for the combined use of praziquantel and artemisinin derivatives or mefloquine [70,71]. Taking together the results herein reported as well as our previous studies showing the leishmanicidal activity of edelfosine, it might be envisaged that this drug could be of special interest in the treatment of patients that are co-infected with both *Leishmania* and *Schistosoma* parasites [29,30,72–74].

The studies reported here provide for the first time compelling evidence for schistosomicidal activity of edelfosine, which, together with the low toxicity profile and the anti-inflammatory activity shown by this APL [21,22,38,63], warrant further studies for the putative use of edelfosine as a possible treatment against schistosomiasis.

Supporting Information

Table S1 *In vitro* effects of edelfosine and perifosine on 56-day-old *S. mansoni* worms upon 24 h of culture. (XLSX)

Table S2 *In vitro* effects of edelfosine and perifosine on 56-day-old *S. mansoni* worms upon 48 h of culture. (XLSX)

Table S3 *In vitro* effects of edelfosine and perifosine on 56-day-old *S. mansoni* worms upon 72 h of culture. (XLSX)

Video S1 *In vitro* effects following edelfosine treatment on *S. mansoni* adult worms. Untreated control group (Live) shows no alteration in morphology and was able to produce eggs. Dead worms following heating at 56°C or treatment with 10 µM praziquantel (PZQ) (positive controls) showed no motility and became nontranslucent. Worms treated with the indicated concentrations of edelfosine (EDLF) for 48 h, 72 h and 168 h showed toxic actions when used \geq 10 µM. In the video one arrow shows severely dilated gut of a female worm and two arrows show

extensive damage on the tegument of a male worm following treatment with 30 µM of EDLF for 48 h. After the 4:30 min, another arrow shows extensive peeling in the tegument of a female worm treated with 10 µM EDLF for 168 h. (MOV)

Acknowledgments

We thank Belén Vicente for excellent technical assistance and Dr. Felipe Castro for reviewing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AM EY REV FM. Performed the experiments: EY REV JL-A EHD. Analyzed the data: EY REV FM JL-A AM. Contributed reagents/materials/analysis tools: FM JL-A AM. Wrote the paper: EY FM AM. Animal welfare: EY JL-A.

References

- Muro A, Pérez del Villar L (2012) Schistosoma and Schistosomiasis. In: Liu D, editor. Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens: CRC Press. pp.441–454.
- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, et al. (2002) Schistosomiasis. N Engl J Med 346: 1212–1220.
- Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol 2: 499–511.
- Hans E, Aviello G, Fallon PG (2013) The schistosoma granuloma: friend or foe? Front Immunol 4: 89.
- WHO: Schistosomiasis. Available: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Accessed 24 April, 2014.
- WHO: Schistosomiasis, Fact sheet N° 115, Update February 2014. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Accessed 24 April, 2014.
- King CH (2010) Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. Acta Trop 113: 95–104.
- Rokni MB (2012) Schistosomiasis. In: Rokni MB, editor. Schistosomiasis: Int'ech. pp.310.
- Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH (2003) Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. Trends Parasitol 19: 509–515.
- Doenhoff MJ, Gioli D, Utzinger J (2008) Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. Curr Opin Infect Dis 21: 659–667.
- Pica-Mattoccia L, Cioli D (2012) Praziquantel: Too Good to be Replaced? Parasite Helminths: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. C.R. . Caffrey, ed. pp.309–321.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006) Human schistosomiasis. Lancet 368: 1106–1118.
- Perez del Villar L, Burguillos FJ, Lopez-Alban J, Muro A (2012) Systematic review and meta-analysis of artemisinin based therapies for the treatment and prevention of schistosomiasis. PLoS One 7: e45867.
- Danso-Appiah A, Olliaro PL, Donegan S, Sinclair D, Utzinger J (2013) Drugs for treating Schistosoma mansoni infection. Cochrane Database Syst Rev 2: CD000528.
- Liu R, Dong HF, Guo Y, Zhao QP, Jiang MS (2011) Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. Parasit Vectors 4: 201.
- Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, et al. (2009) Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of Schistosoma mansoni. PLoS Negl Trop Dis 3: e304.
- Danker K, Reuter W, Semini G (2010) Glycosylated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane. Br J Pharmacol 160: 36–47.
- van Blitterswijk WJ, Verheij M (2013) Anticancer mechanisms and clinical application of allylphospholipids. Biochim Biophys Acta 1831: 663–674.
- Gajate C, Mollinedo F (2002) Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. Curr Drug Metab 3: 491–525.
- Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martín-Marin B, Benito A, et al. (1997) Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X_L. Cancer Res 57: 1320–1328.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, et al. (2010) *In vitro* and *In vivo* selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. Clin Cancer Res 16: 2046–2054.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, et al. (2010) Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. Oncogene 29: 3748–3757.
- Gajate C, Mollinedo F (2001) The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. Blood 98: 3860–3863.
- Gajate C, Mollinedo F (2007) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signalling molecules into lipid rafts. Blood 109: 711–719.
- Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Gejjo E, et al. (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. J Exp Med 200: 353–365.
- Varela MR, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, et al. (2012) *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites. PLoS Negl Trop Dis 6: e1612.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M (2006) Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 100 Suppl 1: S26–33.
- Eissa MM, El-Azoumi MZ, Amer EI, Baddour NM (2011) Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. Int J Parasitol 41: 235–242.
- Cota GF, Gomes LI, Pinto BF, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, et al. (2012) Dyarrheal Syndrome in a Patient Co-Infected with Leishmania infantum and Schistosoma mansoni. Case Rep Med 2012: 240512.
- Abruzzi A, Fried B (2011) Coinfection of Schistosoma (Trematoda) with bacteria, protozoa and helminths. Adv Parasitol 77: 1–85.
- Lewis F (2001) Schistosomiasis. Curr Protoc Immunol Chapter 19: Unit 19 11.
- Mann VH, Morales ME, Rinaldi G, Brindley PJ (2010) Culture for genetic manipulation of developmental stages of Schistosoma mansoni. Parasitology 137: 451–462.
- Xiao SH, Keiser J, Chollet J, Utzinger J, Dong Y, et al. (2007) *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. Antimicrob Agents Chemother 51: 1440–1445.
- Manneck T, Haggemuller Y, Keiser J (2010) Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of Schistosoma mansoni. Parasitology 137: 85–98.
- Peak E, Hoffmann KF (2011) Cross-disciplinary approaches for measuring parasitic helminth viability and phenotype. An Acad Bras Cienc 83: 649–662.
- Nare B, Smith JM, Prichard RK (1991) Differential effects of olipraz and its oxy-analogue on the viability of Schistosoma mansoni and the activity of glutathione S-transferase. Biochem Pharmacol 42: 1287–1292.
- Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, et al. (2011) Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. Cell Death Dis 2: e158.
- Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir el H, Fonteriz RI, Alvarez J, et al. (2012) Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. Oncogene 31: 2627–2639.
- Galanti SE, Huang SC, Pearce EJ (2012) Cell death and reproductive regression in female Schistosoma mansoni. PLoS Negl Trop Dis 6: e1509.
- Zhang CW, Xiao SH, Utzinger J, Chollet J, Keiser J, et al. (2009) Histopathological changes in adult Schistosoma japonicum harbored in mice treated with a single dose of mefloquine. Parasitol Res 104: 1407–1416.
- Cheever AW (1970) Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. Bull World Health Organ 43: 601–603.
- Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F, et al. (2009) Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. Clin Cancer Res 15: 858–864.
- Jurberg AD, Goncalves T, Costa TA, de Mattos AC, Pascarelli BM, et al. (2009) The embryonic development of Schistosoma mansoni eggs: proposal for a new staging system. Dev Genes Evol 219: 219–234.

44. Mollinedo F (2007) Antitumour ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic indications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 17: 385–405.
45. Bertao HG, da Silva RA, Padilha RJ, de Azevedo Albuquerque MC, Radis-Baptista G (2012) Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res* 110: 2465–2473.
46. Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki R (2003) *Molecular medical parasitology*. Amsterdam; Boston: Academic Press. xii, 488 p.
47. Jones MK, Gobert GN, Zhang L, Sunderland P, McManus DP (2004) The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Bioessays* 26: 752–765.
48. Skelly PJ (2005) The surface of schistosomes within the vertebrate host. In: Secor WE, Colley, Daniel G., editor. *Schistosomiasis*. pp.82–100.
49. Wilson RA (2012) The cell biology of schistosomes: a window on the evolution of the early metazoa. *Protoplasma* 249: 503–518.
50. McLaren DJ, Hockley DJ (1977) Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* 269: 147–149.
51. Ruppel A, McLaren DJ (1986) *Schistosoma mansoni*: surface membrane stability *in vitro* and *in vivo*. *Exp Parasitol* 62: 223–236.
52. Van Hellemond JJ, Retra K, Brouwers JF, van Balkom BW, Yazdanbakhsh M, et al. (2006) Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *Int J Parasitol* 36: 691–699.
53. Faghri Z, Skelly PJ (2009) The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J* 23: 2780–2789.
54. Pereira AS, Padilha RJ, Lima-Filho JL, Chaves ME (2011) Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 109: 1395–1402.
55. Shaw MK, Erasmus DA (1983) *Schistosoma mansoni*: dose-related tegumental surface changes after *in vivo* treatment with praziquantel. *Z Parasitenkd* 69: 643–653.
56. Fallon PG, Fookes RE, Wharton GA (1996) Temporal differences in praziquantel- and oxamniquine-induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications for drug-antibody synergy. *Parasitology* 112 (Pt 1): 47–58.
57. Xiao S, Binggui S, Chollet J, Tanner M (2000) Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. *Acta Trop* 75: 341–348.
58. Xiao SH, Xue J, Shen B (2010) Transmission electron microscopic observation on ultrastructural alterations in *Schistosoma japonicum* caused by mefloquine. *Parasitol Res* 106: 1179–1187.
59. Soliman MF, Ibrahim MM (2005) Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Trop* 93: 1–9.
60. Neves JK, de Lima Mdo C, Pereira VR, de Melo CM, Peixoto CA, et al. (2011) Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: an ultrastructural and cytotoxicity study. *Exp Parasitol* 128: 82–90.
61. Eissa MM, El Bardicy S, Tadros M (2011) Bioactivity of miltefosine against aquatic stages of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and their snail hosts, supported by scanning electron microscopy. *Parasit Vectors* 4: 73.
62. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67: 2576–2597.
63. Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Janez E, Justies N, et al. (2009) Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 439–449.
64. Gonnert R, Andrews P (1977) Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd* 52: 129–150.
65. Cioli D, Pica-Mattoccia L (2003) Praziquantel. *Parasitol Res* 90 Supp 1: S3–9.
66. King CH, Muchiri EM, Ouma JH (2000) Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerg Infect Dis* 6: 585–594.
67. Fenwick A, Webster JP (2006) Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis* 19: 577–582.
68. Norton AJ, Gower CM, Lamberton PH, Webster BL, Lwambo NJ, et al. (2010) Genetic consequences of mass human chemotherapy for *Schistosoma mansoni*: population structure pre- and post-praziquantel treatment in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 83: 951–957.
69. Kunz W (2001) Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol* 17: 227–231.
70. Utzinger J, Chollet J, You J, Mei J, Tanner M, et al. (2001) Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. *Acta Trop* 80: 9–18.
71. Keiser J, Manneck T, Vargas M (2011) Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 66: 1791–1797.
72. O'Neal SE, Guimaraes LH, Machado PR, Alcantara L, Morgan DJ, et al. (2007) Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 142–148.
73. Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, et al. (2006) The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol* 169: 943–953.
74. La Flamme AC, Scott P, Pearce EJ (2002) Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol* 24: 339–345.

III.2 ARTÍCULO 2

**Inhibition of Granulomatous
Inflammation and Prophylactic
Treatment of Schistosomiasis
with a Combination of
Edelfosine and Praziquantel**

Edward Yepes,
Rubén E. Varela-M,
Julio López-Abán,
Jose Rojas-Caraballo,
Antonio Muro
and
Faustino Mollinedo .

PLoS NTDs 2015 In press.

Doi: 10.1371/journal.pntd.0003893

Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel

Edward Yepes^{1, 2}, Rubén E. Varela-M², Julio López-Abán¹, Jose Rojas-Caraballo¹, Antonio Muro¹, Faustino Mollinedo^{2,3*}

1 IBSAL–CIETUS (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca–Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

2 Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

3 Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

* fmollin@usal.es

Abstract

Background: Schistosomiasis is the third most devastating tropical disease worldwide caused by blood flukes of the genus *Schistosoma*. This parasitic disease is due to immunologic reactions to *Schistosoma* eggs trapped in tissues. Egg-released antigens stimulate tissue-destructive inflammatory and granulomatous reactions, involving different immune cell populations, including T cells and granulocytes. Granulomas lead to collagen fibers deposition and fibrosis, resulting in organ damage. Praziquantel (PZQ) is the drug of choice for treating all species of schistosomes. However, PZQ kills only adult *Schistosoma* worms, but not immature stages. The inability of PZQ to abort early infection or prevent re-infection and the lack of prophylactic effect prompt the need for novel drugs and strategies for the prevention of schistosomiasis.

Methodology/Principal Findings: Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we have found that the alkylphospholipid analog edelfosine kills schistosomula, and displays anti-inflammatory activity. The combined treatment of PZQ and edelfosine during a few days before and after cercariae infection in a schistosomiasis mouse model, simulating a prophylactic treatment, led to seven major effects: a) killing of *Schistosoma* parasites at early and late development stages; b) reduction of hepatomegaly; c) granuloma size reduction; d) down-regulation of Th1, Th2 and Th17 responses at late post-infection times, thus inhibiting granuloma formation; e) upregulation of IL-10 at early post-infection times, thus potentiating anti-inflammatory actions; f)

down-regulation of IL-10 at late post-infection times, thus favoring resistance to re-infection; g) reduction in the number of blood granulocytes in late post-infection times as compared to infected untreated animals.

Conclusions/Significance: Taken together, these data suggest that the combined treatment of PZQ and edelfosine promotes a high decrease in granuloma formation as well as in the cellular immune response that underlies granuloma development, with changes in the cytokine patterns, and may provide a promising and effective strategy for a prophylactic treatment of schistosomiasis.

Author Summary

Schistosomiasis is one of the most devastating tropical diseases worldwide caused by blood flukes of the genus *Schistosoma*. Schistosomiasis results from immune-mediated granulomatous responses against *Schistosoma* eggs trapped in tissues, causing serious local and systemic pathological effects because of granuloma formation and fibrosis. Treatment and control of schistosomiasis relies almost entirely on the single drug praziquantel (PZQ). This drug kills adult *Schistosoma* worms, but has poor activity against immature worms, thus leading to low cure rates in schistosomiasis-endemic areas that could reflect infections through PZQ-refractory juvenile worms due to high rates of transmission. At present there is a lack of an efficient prophylactic treatment for schistosomiasis that could be critical for highly endemic areas as well as for travelers to these regions. Here, we have found that a prophylactic combination treatment of PZQ with the ether lipid edelfosine, which is able to kill schistosomula, promotes a significant decrease in granuloma development and in the inflammatory response underlying granuloma formation, thus leading to a promising prophylactic treatment of schistosomiasis. In addition, a high decrease in IL-10 and IL-17 levels following the combined prophylactic treatment of PZQ and edelfosine might potentiate inhibition of granuloma formation and resistance to *S. mansoni* re-infection.

Introduction

Schistosomiasis is caused by blood flukes (trematodes) belonging to the genus *Schistosoma*. *Schistosoma* spp. parasites need two hosts for their survival, namely an intermediate snail host, where asexual reproduction takes place and a definitive mammalian host, where the sexual reproduction occurs [1, 2]. Schistosomiasis is the most important water-borne disease, being the main human helminth infection in terms of global mortality and the third most devastating tropical disease in the world, following malaria and intestinal helminthiasis, and causing both significant morbidity and mortality on several continents [3-7]. The bulk of morbidity due to schistosomiasis results from cellular immune responses and the generation of cytokine patterns, elicited during the different stages of the parasite's life cycle in the course of infection, that eventually lead to chronic immune response-based inflammation against

Schistosoma eggs lodged in tissues, and subsequent granuloma formation and fibrosis [8, 9]. Symptoms and signs of the disease depend on the number and location of eggs trapped in the tissues, leading first to a reversible inflammatory reaction and then to the pathology associated with collagen deposition and fibrosis, resulting in organ damage [9, 10]. Most human schistosomiasis is caused by *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, and *S. japonicum* [6, 11–13]. The World Health Organization (WHO) estimates that schistosomiasis is endemic in 74 developing countries, infecting at least 230 million people in rural and peri-urban areas worldwide (80% in sub-Saharan Africa). Of these, 120 million have symptoms of the disease, and 20 million have severe disease, resulting in approximately 280,000 deaths annually [2, 4, 7, 14]. Human infection occurs by direct contact with *S. mansoni* cercariae-contaminated water. Following penetration of cercariae through the skin, they lose their tails and transform into schistosomula. The schistosomula then enter the venous system and reach the lungs, where they mature to pre-adult stages. About 8–10 days after infection, the pre-adult forms reach the portal system, where they mature to adult males and females [1, 5, 9]. Both male and female *S. mansoni* parasites achieve sexual maturity in the bloodstream, and then sexual reproduction occurs with the deposition of hundreds of eggs per day [12, 15, 16], predominantly in the liver and intestine. Deposition of schistosome eggs in the tissues is an important stimulus to the influx of immune cells that leads to the development of a granulomatous reaction. This immunological reaction protects the host by neutralizing the schistosome eggs antigens and destroying eggs. However, schistosome eggs elicit a CD4⁺ T-helper (Th) cell-mediated hepatic granulomatous inflammation, which is the major pathological consequence of the disease [15, 16]. Nevertheless, paradoxically, the development of granulomatous inflammation around parasite eggs has an essential host-protective and facilitates the successful excretion of the eggs from the host [14, 16, 17]. Two main clinical conditions are recognized in *S. mansoni*-infected individuals: acute schistosomiasis and chronic schistosomiasis. Acute schistosomiasis in humans is a debilitating febrile illness (Katayama fever) that can occur before the appearance of eggs in the stool and generally peaks around six to eight weeks after infection [18]. Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells after stimulation with parasite antigen reflects a dominant T helper 1 (Th1) response, with production of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-2 (IL-2) [19]. Thus, during the acute phase of the disease there is a predominance of a Th1 response, producing elevated levels of Th1 cytokines in the plasma [17]. Then, in the natural progression of the disease, after parasites mature, mate and start to produce eggs at the fifth-sixth week, the initial Th1 response is followed by a developing egg antigen-induced regulatory T cell (Treg cell) and T helper 2 (Th2) response that downregulates the production and effector functions of the pro-inflammatory Th1 mediators with accompanying granuloma formation [15, 20, 21]. Treg and Th2 cells share some features, notably their ability to synthesize interleukin-10 (IL-10) through which suppress the development of Th1 responses to schistosome egg antigens, thus cooperating both cell types to enforce the Th2 polarization that characterizes the immune response in

schistosome-infected mice [22]. The production of IL-10 during this latter period seems to have an important role in hepatic granuloma formation and in the regulation of CD4⁺ T cell responses in schistosomiasis, as well as in the transition from acute to chronic disease state [17, 23-25]. In the mouse model, both Th1 and Th2 cytokines can orchestrate granuloma development [16, 25, 26]. Th2-type responses are typically characterized by increases in the levels of interleukin-4 (IL-4) and other cytokines (including IL-5, IL-6, IL-9, and IL-13), activation and expansion of CD4⁺ Th2 cells, plasma cells secreting IgE, eosinophils, mast cells and basophils [16, 27]. IL-17 is the signature cytokine of the proinflammatory Th17 cell population [28, 29], and a subsequent Th17 response is elicited during infection that plays a major role for full deployment of inflammation [30] and for the development of severe schistosome egg-induced immunopathology [31]. Elucidation of the actual determinants of immunomodulation in human or murine schistosomiasis could lead to the development of drugs or vaccines for disease control or to spin-off benefits for other granulomatous diseases [16]. Praziquantel (PZQ) is currently the only available antischistosomal drug and it is distributed through mass administration programs to millions of people every year, thus increasing the risk for drug resistance, and therefore search for new antischistosomal drugs and therapeutic approaches is urgently needed [7, 32]. Adult worms are highly sensitive to PZQ, but unfortunately this drug has minor activity against juvenile stages like schistosomula, pre-adults and juvenile adults [32]. Despite the paucity of a concerted effort to develop novel antischistosomal drugs, with a lack of dedicated drug discovery and development programs pursued for schistosomiasis, a number of compounds with promising antischistosomal properties have been recently identified, such as the alkylphospholipid analogs (APLs) [33-35]. APLs are a class of structurally related synthetic lipid compounds, including edelfosine (EDLF) and miltefosine, which act on cell membranes rather than on DNA [36, 37]. EDLF (1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine), considered as the prototype APL molecule, is a promising antitumor ether phospholipid drug [38, 39], that acts by activating apoptosis through its interaction with cell membrane domains [36, 37, 40-42]. Interestingly, the APL miltefosine is currently being used in the clinic for the treatment of human and animal leishmaniasis [43, 44], and the APL EDLF has been reported to display anti-inflammatory properties [45] and to modulate cytokine production, including IFN- γ , IL-2 and IL-10 [45-47]. EDLF has also been shown to cause interruption of oviposition in a preliminary *in vitro* screening, and a significant reduction in worm burden *in vivo*, with a preferential activity against male worms [35]. Here, using both *in vitro* and *in vivo* approaches, we have found that EDLF is able to kill juvenile stages as schistosomula, and the combination of PZQ and EDLF behaves as a promising prophylactic treatment against schistosomiasis, showing a significant reduction in adult worm burden, number of parasite eggs in liver and intestine tissues and granuloma size, as well as exerting an anti-inflammatory action, through modulation of cytokine production in infected mice, that might be of special importance for the treatment and/or prevention of schistosomiasis

Materials and Methods 106

Ethics statement. 107

Animal procedures in this study complied with the Spanish (Ley 32/2007, Ley 108
6/2013 and Real Decreto 53/2013) and the European Union (European Directive 109
2010/63/EU) regulations on animal experimentation for the protection and 110
humane use of laboratory animals, and were conducted at the accredited Animal 111
Experimentation Facility of the University of Salamanca (Register number: 112
PAE/SA/001). Procedures were approved by the Ethics Committee of the 113
University of Salamanca (protocol approval number 48531). The animals' health 114
status was monitored throughout the experiments by a health surveillance 115
program according to Federation of European Laboratory Animal Science 116
Associations (FELASA) guidelines. All efforts were made to minimize suffering. 117

Drugs 118

EDLF was obtained from R. Berchtold (Biochemisches Labor, Bern, 119
Switzerland). Stock sterile solutions of EDLF (2 mM) were prepared in culture 120
medium by heating at 50°C for 30 min as previously described [38]. PZQ was 121
obtained as Biltricide tablets (Bayer Vital, Leverkusen, Germany) and was 122
dispersed in water with 2-2.5% Cremophor A6 oil-in-water emulsifier (Sigma, 123
MO). 124

Parasite culture and maintenance 125

S. mansoni (LE strain) was maintained by passage through *Biomphalaria* 126
glabrata snails and 4- to 6-week-old male SPF (Specific Pathogen Free) Swiss 127
CD1 mice from Charles River laboratory - CRIFFA (Barcelona, Spain). Mice 128
were infected with abdominal percutaneous exposure to 150 *S. mansoni* 129
cercariae per animal. Eight weeks after infection mice were humanely 130
euthanized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg) plus 131
heparin (2 IU/mL). The liver was removed and minced to obtain eggs to be 132
hatched for harvesting miracidia and subsequent infection of snails. Cercariae 133
were shed from infected snails by exposure to light (60 min at room 134
temperature), and mechanically transformed into schistosomula by passing back 135
and forth the parasites between two 10-mL syringes joined by a 22-gauge 136
double-ended luer lock needle [48]. Schistosomula were purified away from 137
cercarial tails by centrifugation through a 60% percoll gradient as described 138
previously [48]. Schistosomula were washed thrice in RPMI-1640 culture 139
medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), kept at pH 7.5 with 20 mM HEPES, and 140
supplemented with antibiotic/antimycotic, as previously described [48], and then 141
transferred to modified Basch's medium at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ 142
for 24 h before any further experimental manipulations proceeded 143
(Supplementary Video S1) [49, 50]. 144

***In vitro* schistosomula viability assay**

145

The principle of this assay is based on the differential membrane permeability to the membrane-impermeable fluorescent DNA intercalating agent propidium iodide, staining membrane-compromised cells (red fluorescence) [51]. After 24 h of culturing (37°C, 5% CO₂) in the presence of 10 and 20 μM EDLF, schistosomula were washed thrice to remove the test compound and culture media supplements. Each wash consisted of centrifuging microtiter plates containing schistosomula at 100 x g for 5 min, removal of half the old culture media and replacement with an equal amount of fresh Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (lacking phenol red). After washing the parasites, propidium iodide (2.0 μg/mL, final concentration) was simultaneously added to each well of the microtiter plate. The 96-well microtiter plates (containing ~100 parasites/well in triplicate), were subsequently loaded into a BioTek Synergy 2 plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT) containing appropriate filters for propidium iodide detection (485/20 excitation, 645/20 nm emission). The plate reader automatically sets the photo multiplier tube gain for the fluorescent dye and this may slightly vary between experiments. Inclusion of appropriate control samples (live and heat-killed dead schistosomula) compensates for any inter-plate variations in gain settings. Propidium iodide stains dead schistosomula, and then fluorescent intensity is determined to assess schistosomula viability, which could be quantified using a plate reader. A higher value of relative fluorescence units (RFU) indicates a higher number of dead parasites. Percentage of dead schistosomula was calculated using the following equation previously used by Peak et al. [51]: % of dead schistosomula = (sample – media control/negative control – media control) x 100, where “sample” represents RFU values from parasites treated with EDLF; “negative control” represents RFU values from parasites killed with heat shock (10 min incubation at 56°C); and “media control” represents RFU values from wells containing only medium (no parasites). In addition, schistosomula parasite death was also assessed under optical microscope by morphologic changes (granular appearance and tegument defects) and loss of motility. Supplementary Fig. S1 shows the differential morphology and propidium iodide permeability between live and dead parasites.

146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177

***In vivo* studies for testing the efficacy of EDLF and PZQ treatments**

178
179

A total of forty 6-week-old female SPF Swiss CD1 mice from Charles River laboratory Spain (CRIFFA S.A., Barcelona), weighing 16-25 g, were infected by abdominal percutaneous exposure to 150 *S. mansoni* cercariae per animal [48], and randomly allocated into five experimental groups (8 animals per group) as follows: naive, untreated and uninfected; infected untreated; PZQ, treated with PZQ and infected; EDLF, treated with EDLF and infected; PZQ+EDLF, treated with PZQ + EDLF and infected. Mice were treated daily, since three days before animals were infected until eight days after infection, with PZQ (100 mg/kg/day), EDLF (45 mg/kg/day) and the combination PZQ+EDLF with the

180
181
182
183
184
185
186
187
188

same individual drug doses, orally administered. The experimental design followed is shown in Fig. 1. The infected untreated control group received only the vehicle solution used for 12 days. Animals were humanely euthanized at 8 weeks post-infection (p.i.), and the following parasitological parameters were assessed: (i) worm burden through the recovery of parasites from hepatic and portomesenteric veins by using the Smithers and Terry perfusion technique for mice [48]; (ii) number of eggs per gram (epg) of hepatic and intestine tissues, by weighing fragments (about 0.3 g) of these tissues and subsequent processing by using the potassium hydroxide (KOH) digestion technique [52]; (iii) number of granulomas on liver. In addition, liver and intestine of each animal were harvested and adult worms were collected and counted. Portions of livers were collected for histological examination. Relative liver weight was calculated using the following equation [53]: relative liver weight = (absolute liver weight/body weight) x 100. Blood samples were taken at the beginning of the study, at the third week p.i., and after 8 weeks p.i. when animals were killed.

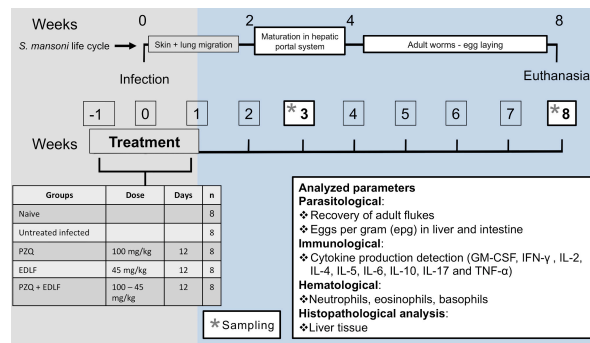


Figure 1. Experimental design for in vivo experiments. This scheme depicts schematically the studies conducted with *S. mansoni*-infected mice (n = 8) in this present work. Mice were treated daily (oral administration) with PZQ, EDLF or PZQ+EDLF since three days before animals were infected until eight days after infection. The untreated infected control group received only the vehicle solution used for 12 days. Animals that were untreated and uninfected (naive) were also run in parallel. Asterisks indicate when samples from animals were taken (sampling) to analyze the parameters indicated in the box. Animals were sacrificed at 8 weeks p.i., and the timeline of some major events in parasite life cycle and disease-related processes are indicated at the top of the scheme. See text for further details.

Histopathological analysis

After killing the mice at week 8 p.i., liver sections were removed from the central part of the left lateral lobe and fixed in 4% formalin. Histological section were cut using a microtome at a thickness of 4 μm and stained on a slide with hematoxylin and eosin [54-56]. The slides were viewed using an Olympus BX51 microscope (Olympus, Center Valley, PA). Images were captured using a DP70

digital camera and the DP Controller software (Olympus). Granuloma diameters (five granulomas per mouse) were measured in a horizontal plane bisecting central eggs [57, 58] using the Olympus DP Controller software.

Hematological techniques

Blood samples were collected in vacutainer tubes, containing EDTA as anticoagulant, with gentle shaking. Total white blood cells were quantified using a Hemavet HV950 system (Drew Scientific Co. Limited, Barrow in Furness, UK).

Cytokine determination in mouse sera samples

A flow cytometry-based technique was used for cytokine quantitation (IFN- γ , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-17) from mice sera. A FlowCytomix Mouse Th1/Th2 kit (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, different sized fluorescent beads, coated with capture antibodies specific for the aforementioned cytokines were incubated with mouse sera samples and with biotin-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature. The specific antibodies bind to the analytes captured by the first antibodies. After washing the tubes with PBS plus 2% fetal calf serum, Streptavidin-Phycoerythrin (S-PE) solution was added and incubated at room temperature for 1 h. S-PE binds to the biotin conjugate and emits fluorescent signals. Flow cytometry data were collected using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) (8000 events were collected, gated by forward and side scatter), and data were analyzed using FlowCytomix Pro 3.0 software (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Each cytokine concentration was determined from standard curves using known mouse recombinant cytokine concentrations.

Statistical analysis

Results were analyzed in GraphPad Prism Version 5 (Graphpad Software Inc.) and expressed as means \pm SEM. Test for normality was performed by Kolmogorov-Smirnov, and then one-way ANOVA analyses of variance, followed by Dunnett's or Kruskal Wallis comparison test, were performed to determine any statistical differences between treated groups and untreated controls. Data were considered significant if p -value was <0.05 .

Results

***In vitro* schistosomula viability determination in response to EDLF.**

Because propidium iodide is not permeable to viable cells, PI incorporation could be used as a means of parasite killing. We found that schistosomula treated with 20 μ M EDLF were stained with propidium iodide at a similar level

as that of heat-killed parasites used as a positive killing control (Fig. 2).
 Edelfosine induced schistosomula death as assessed by propidium iodide staining and morphological changes under microscopic observation (Fig. 2, Supplementary Video S2). Quantification of dead parasites, following the above two approaches, as indicated in the Materials and Methods section, showed that about 91% of schistosomula were killed upon 20 μ M EDLF treatment for 24 h.

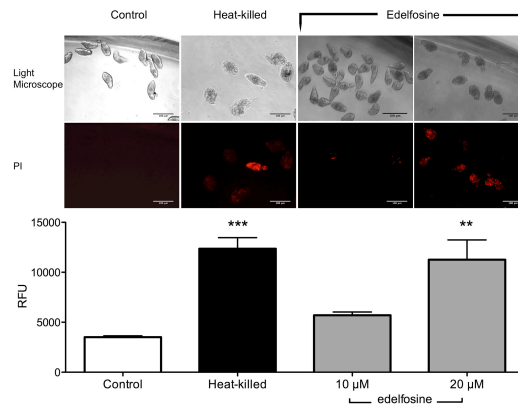


Figure 2. In vitro effects of EDLF on the viability of *S. mansoni* schistosomula. Schistosomula were untreated (Control), heat-killed at 56°C, or treated with 10 or 20 μ M EDLF for 24 h. Then, schistosomula viability was analyzed by propidium iodide (PI) incorporation and light microscopy morphology as shown in Materials and Methods. RFU, relative fluorescence units. Data are shown as means \pm SEM of three separate experiments. Asterisks represent statistical significance with respect to control-live group. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Scale bar, 100 μ m.

Combined prophylactic treatment of PZQ and EDLF reduces adult worm count and decreases the size of hepatic granulomas in a schistosomiasis mouse model.

In order to study the efficacy of EDLF in a prophylactic setting for schistosomiasis, we treated four different cohorts of CD1 mice with PZQ (100 mg/kg/day), EDLF (45 mg/kg/day), PZQ+EDLF and only vehicle (infected untreated control group), since three days before until eight days after being infected with *S. mansoni* cercariae as indicated in Materials and Methods and Fig. 1. Both PZQ and EDLF were orally administered, and live adult worm count from hepatic and portomesenteric veins as well as the size of hepatic granuloma, and the total number of eggs found in liver were determined after the eighth week of infection. All treatments reduced significantly the number of live worms as compared to infected untreated mice, with the groups treated with EDLF and PZQ+EDLF showing the highest decrease in worm count, even higher than that obtained by using PZQ alone (Fig. 3).

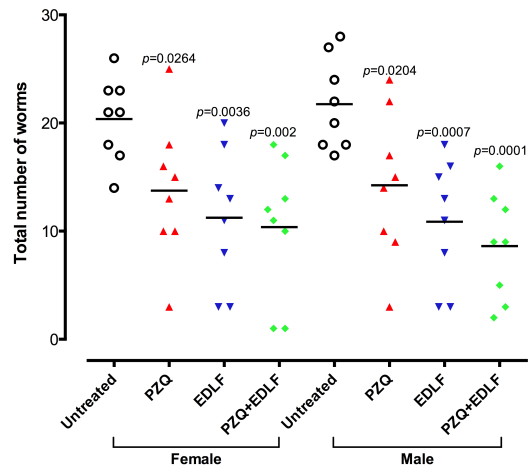


Figure 3. Effect on adult male and female worm burdens after PZQ, EDLF and PZQ+EDLF prophylactic treatments in mice infected with *S. mansoni*. Mice were treated by oral administration of 100 mg/kg/day PZQ, 45 mg/kg/day EDLF or PZQ+EDLF as prophylactic treatments for *S. mansoni* infection as shown in Materials and Methods. Infected untreated (untreated) mice were treated with vehicle. Each point represents data from an individual treated or infected untreated mouse. Horizontal bars indicate mean values. Significance (p) values with respect to infected untreated mice are indicated. The means \pm SEM (n = 8) for each experimental condition are as follows: female (untreated: 20.38 ± 1.36 ; PZQ: 13.75 ± 2.29 ; EDLF: 11.25 ± 2.23 ; PZQ+EDLF: 10.38 ± 2.26) and male (untreated: 21.75 ± 1.49 ; PZQ: 14.25 ± 2.44 ; EDLF: 10.88 ± 2.03 ; PZQ+EDLF: 8.62 ± 1.76).

Interestingly, following both macroscopic and microscopic histopathological examination, we observed a significant reduction in hepatic granuloma size in mice treated with PZQ, EDLF and PZQ+EDLF as compared to infected untreated mice, EDLF and PZQ+EDLF being the most efficient treatments in reducing granulomatous inflammation (Figs. 4A and 4B).

269
270
271
272
273

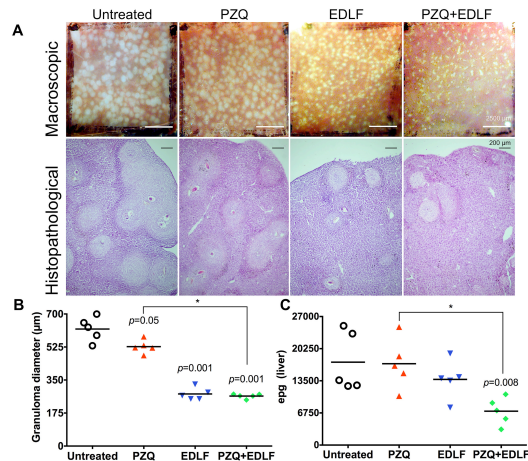


Figure 4. Effects on granuloma size and parasite egg burdens in liver after prophylactic treatment of *S. mansoni*-infected mice with PZQ, EDLF and PZQ+EDLF treatments. (A) Representative hepatic granulomas of 8-week-infected drug-untreated and drug-treated mice. Photographs were taken at 10 x. (B) Granuloma diameter. The average values of the diameters of 25 granulomas measured in liver sections from 5 infected mice per group (5 granulomas per mouse) are shown. Each point represents the value for an individual mouse. Significance (p) values with respect to infected untreated mice are indicated. Statistical significance between the PZQ and PZQ+EDLF groups is also included. (*) p<0.05. The means ± SEM (n = 5) for each experimental condition are as follows: untreated: 620.4 ± 28.70; PZQ: 526.9 ± 15.95; EDLF: 276 ± 14.41; PZQ+EDLF: 264.9 ± 5.41. (C) Parasite egg burden in liver. Infected mice were treated with 100 mg/kg PZQ, 45 mg/kg EDLF, or PZQ+EDLF. Infected untreated mice were run in parallel. Compounds were administered orally as described in Materials and Methods, and the number of eggs in liver was determined as eggs per gram (epg). Each point represents data from an individual treated- or infected untreated mouse. Horizontal bars indicate average values. Significance (p) values with respect to infected untreated mice are shown. Statistical significance between the PZQ and PZQ+EDLF groups is also included. (*) p<0.05. The means ± SEM (n = 5) for each experimental condition are as follows: untreated: 17411 ± 2805; PZQ: 17094 ± 2368; EDLF: 13796 ± 1804; PZQ+EDLF: 7126 ± 1279).

Because granuloma forms around the eggs we next determined the amount of eggs in liver. Intriguingly, despite the above reduction in adult worm count and hepatic granuloma size, we did not detect any statistical difference in the amount of parasite eggs in liver between the infected untreated control group and experimental groups receiving either PZQ or EDLF alone (Fig. 4C). Because PZQ kills preferentially schistosoma parasites at adult stages, but is not active against immature worms [59, 60], it is interesting to note a significant reduction in the number of eggs in liver when mice were treated with PZQ+EDLF as compared with the infected untreated group. The PZQ+EDLF combination treatment induced a statistically significant (p<0.05) decrease in

both granuloma diameter and parasite egg burden in liver as compared to PZQ-treated mice (Figs. 4B and 4C). To examine the effect of drug administration on the hepatomegaly caused by *S. mansoni* infection, liver was excised from dissected mice after treatment, weighed and the relative liver weight in relation to body weight was calculated. As shown in Supplementary Fig. S2, there was a significant decrease in the relative liver weight in PZQ+EDLF-treated mice as compared to infected untreated mice ($p < 0.05$), thus suggesting that the combined PZQ+EDLF treatment alleviates hepatomegaly. Similar results were obtained when the amount of parasite eggs in intestine was measured (Supplementary Fig. S3). The combined PZQ+EDLF treatment also induced a statistically significant decrease in the parasite egg burden in intestine as compared to infected untreated mice ($p < 0.01$) and PZQ-treated group ($p < 0.001$) (Supplementary Fig. S3).

Effect of PZQ+EDLF treatment on serum cytokine levels

In order to explore the effect of EDLF-containing treatments on cellular immune response, we used a flow cytometry-based methodology to measure the levels of several cytokines in the sera of mice at 3 and 8 weeks p.i. At early stages of infection (3rd week p.i.), the distinct PZQ, EDLF or PZQ+EDLF treatments drastically inhibited the infection-induced increase in IL-2 production, as a typical Th1 cytokine, whereas the Th2 cytokine IL-4 level was not affected (Fig. 5). Interestingly, the above three treatments induced an increase in the level of IL-10 at week 3 p.i. (Fig. 6), thus suggesting the triggering of an anti-inflammatory action as IL-10 inhibits production of pro-inflammatory cytokines [61, 62]. Because at this early stage of infection (week 3 p.i.) the IL-4 and IL-10 levels were not affected by the infection (Figs. 5 and 6), these data indicated that the Th2 and Treg responses were not elicited by the parasite at this infection period, and thereby the actions detected on the IL-10 level following the above three treatments suggested a direct interaction of PZQ and EDLF with the corresponding T cell subsets. Then, after eight weeks p.i. the data on IL-10 levels differed greatly from those obtained at early stages of infection (Fig. 6). As infection progresses to late stages (week 8 p.i.), infected untreated mice showed elevated levels of IL-10 in plasma (Fig. 6), indicative of Treg and Th2 responses. However, treatments with PZQ and above all PZQ+EDLF led to a drastic reduction in the level of IL-10, reaching a level that was even lower than that detected in naive mice (Fig. 6). Because mice were not treated any longer since the day 9 of infection, it is expected that they were free of PZQ and EDLF by the eighth week p.i., and therefore the changes in cytokine production could be due to an immunological reaction to either the surviving or dead parasites at their different developmental stages. Because IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *S. mansoni* [63], the inhibition of IL-10 production in the combined PZQ+EDLF treatment at late stages of infection, together with its drastic inhibitory action on granuloma formation and egg count, suggests that this combination treatment could be of particular interest for a prophylactic use against schistosomiasis. Interestingly, the levels of a number of Th1 (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) and Th2 (IL-5, IL-6) cytokines

were significantly reduced following the PZQ+EDLF combined treatment as compared to infected untreated mice at the late stage of infection (Fig. 7). Furthermore, the combined treatment of PZQ+EDLF also dramatically decreased the level of the IL-17 at the late stage of infection (Fig. 7), suggesting that the pro-inflammatory Th17 response, which plays a major role in hepatic granulomatous inflammation against parasite eggs [64], was largely diminished. In addition, a dramatic reduction in the plasma level of IL-17 in the PZQ+EDLF group was also detected at week 3 p.i. (726 ± 78 vs. 161 ± 32 pg/mL ($n = 8$), $p < 0.001$, between infected untreated mice and PZQ+EDLF-treated infected mice, respectively).

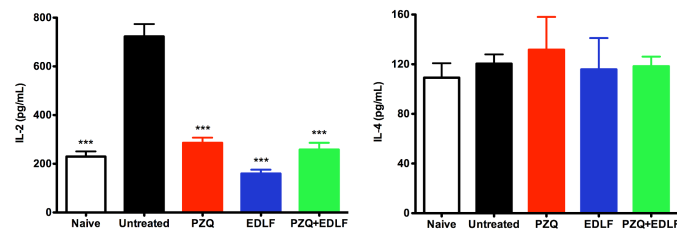


Figure 5. IL-2 and IL-4 plasma levels in drug treated- and untreated-mice. The plasma levels of the indicated cytokines were determined in uninfected-untreated naive mice and the distinct untreated and treated infected mice, namely infected untreated (untreated), PZQ, EDLF and PZQ+EDLF as shown in Materials and Methods. Samples were taken at week 3 p.i. Data are shown as means \pm SEM of eight mice. Asterisks represent statistical significance with respect to the infected untreated group. (***) $p < 0.001$.

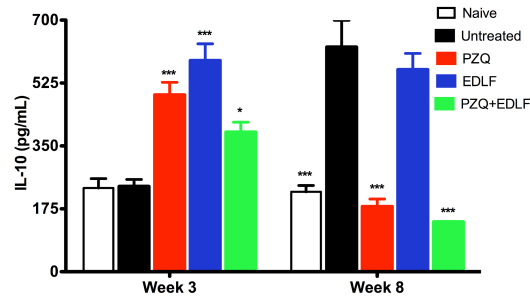


Figure 6. IL-10 plasma level in drug treated- and untreated-mice. The plasma levels of IL-10 were determined in uninfected-untreated naive mice and the distinct untreated and treated infected mice, namely infected untreated (untreated), PZQ, EDLF and PZQ+EDLF as shown in Materials and Methods. Samples were taken at weeks 3 and 8 p.i. Data are shown as means \pm SEM of eight mice. Asterisks represent statistical significance with respect to the infected untreated group. (*) $p < 0.05$; (***) $p < 0.001$.

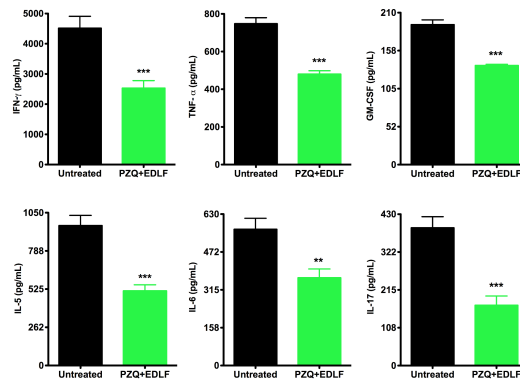


Figure 7. *IFN* - γ , *TNF* - α , GM-CSF, IL-5, IL-6 and IL-17 plasma levels in PZQ+EDLF-treated- and untreated infected mice. The plasma levels of the indicated cytokines were determined in infected untreated (untreated) and PZQ+EDLF-treated infected mice as shown in Materials and Methods. Samples were taken at week 8 p.i. Data are shown as means \pm SEM of eight mice. Asterisks represent statistical significance with respect to the infected untreated group. (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

Effects of EDLF-containing treatments on granulocyte count

It is well known the participation of leukocytes in inflammatory processes associated with parasitic diseases and also in the clearance of the disease, mainly due to granulocytes, which comprise neutrophils, eosinophils and basophils [65, 66]. The immune response in hepatic and intestinal tissues switches the expansion of Th2-associated myeloid cells, including eosinophils and basophils. In this regard, eosinophils have been found to constitute the majority of cells (~51%) within the hepatic granuloma in *S. mansoni*-infected mice [67]. Here, we examined the levels of the above leukocyte types in peripheral blood in each experimental group at 3 and 8 weeks p.i. At week 3 p.i. we detected a significant reduction in the level of eosinophils in the group of mice treated with PZQ+EDLF when compared to the PZQ-treated group (Fig. 8A), as well as a significant reduction in the levels of basophils in the mice treated with EDLF and PZQ+EDLF compared to the infected untreated group (Fig. 8A). In the late stages of infection (week 8 p.i.), a significant increase in the number of neutrophils, eosinophils and basophils was found in the infected untreated mice compared to the naive non-infected animals (Fig. 8B). Interestingly, we found a significant reduction in the levels of neutrophils, eosinophils and basophils in the groups of mice treated with EDLF and PZQ+EDLF as compared to the infected untreated group (Fig. 8B). However, no significant changes were observed regarding the number of lymphocytes and monocytes in the three experimental groups as compared to infected untreated mice (Supplementary Table S1).

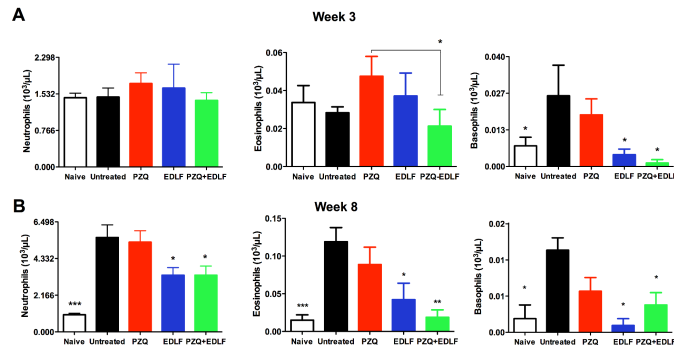


Figure 8. Granulocyte analysis in drug treated- and untreated-mice. Blood samples were analyzed for neutrophil, eosinophil and basophil counts in uninfected-untreated naive mice, infected untreated (untreated) mice and infected mice treated with PZQ, EDLF or PZQ+EDLF. Samples were taken at weeks 3 and 8 p.i. Data are shown as means \pm SEM of eight mice. Asterisks represent statistical significance with respect to the infected untreated group. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

Discussion

In the present study we have found that the combination of PZQ and the ether phospholipid EDLF behaves as a potent and promising prophylactic treatment for schistosomiasis. This prophylactic effect was significantly greater than those observed in the single drug treatment groups. Our results represent the first evidence that EDLF kills immature forms of *S. mansoni* using both *in vitro* and *in vivo* assays. Thus, we have found here that EDLF kills schistosomula, and both PZQ [59, 60] and EDLF [35] have been previously shown to be effective drugs against *S. mansoni* adult worms. Recently, we have shown that EDLF reduces worm burden in a murine model [35], and we report here a statistically significant decrease in worm count in an *in vivo* assay following a prophylactic treatment with EDLF or the PZQ+EDLF combination treatment that was higher than that detected following PZQ prophylactic treatment. PZQ is less active against the juvenile stages of *S. mansoni* than the adult schistosomes [59, 60]. The minor activity of PZQ against juvenile schistosomes is believed to be a key factor explaining the observed treatment ‘failures’ in areas highly endemic for schistosomiasis and that require frequent retreatments [32, 68]. The relative resistance of the larval stages of *S. mansoni* to schistosomicide drugs may result in a therapeutic failure because of the presence of migrating, drug-resistant, immature forms of the parasite [69]. On the other hand, although the existing antischistosomal drugs are highly effective against adult worms, they do not prevent against re-infection or granuloma formation [70, 71]. In this context, the present results on the killing activity of EDLF on *S. mansoni* schistosomula are of major importance in the development of effective schistosomicide drugs. It is worth mentioning that very recent evidence shows that EDLF elicits a selective and direct killing on soil-dwelling nematode *Caenorhabditis elegans* embryos

[72]. Taken together, these data suggest that EDLF is able to kill helminths at both early and late developmental stages. The mechanism of action of EDLF on schistosomes is still unclear. In this regard, it is worth mentioning that EDLF is a proapoptotic agent in cancer cells [38, 41, 42] affecting processes at the membrane level [37, 40, 73, 74], and recent evidence suggests that EDLF promotes an apoptosis-like process in *Leishmania* spp. and *S. mansoni* adult worms [35, 75]. APLs, including miltefosine and EDLF, have been recently shown to exert schistosomicide activity on various species and strains of schistosomes [33-35, 76, 77], by interfering with membrane stability and structural integrity of worms' tegument, and resulting in marked alterations of the digestive tract and the reproductive system of the worms. In addition, it has been very recently shown that Akt inhibition induces profound alterations in *S. mansoni* adult worm pairing and egg laying as well as affects the viability of schistosomula larvae [78], and EDLF also inhibits Akt signaling in cancer cells [79]. Interestingly, the herein reported treatments containing EDLF promoted a significant and high decrease in granuloma formation as well as in the immune response that underlies granuloma development. EDLF at the early stages p.i. drastically inhibited the infection-induced IL-2 generation, while upregulated IL-10, which inhibits Th1 inflammatory response. These data agree with recent data showing an anti-inflammatory effect of EDLF on different animal models for distinct diseases [45-47]. Elevated serum levels of IL-10 have also been observed in PZQ-treated humans, which paralleled an elevated anti-worm Th2 response [80]. Surprisingly, the combination of PZQ+EDLF induced a significant increase in the IL-10 level at early p.i. times, whereas this cytokine level was dramatically inhibited at late p.i. stages. This is of major importance as studies of human schistosomiasis indicate the importance of IL-10 in regulating morbidity [17], and IL-10 has been shown to inhibit the development of protective immunity to secondary schistosome infection [63]. Thus, blockade of IL-10 combined with PZQ treatment raised protective immunity against re-infection with *S. mansoni* [63]. Interestingly, we also found here that the combined treatment of EDLF and PZQ led to a marked inhibition in the Th1, Th2 and Th17 responses at late *S. mansoni* p.i. times. Prolonged Th2 [81] and Th17 [82] responses contribute to the development of hepatic granulomatous inflammation and hepatic fibrosis, and thereby the drastic reduction in the level of Th2 and Th17 cytokines in mice treated with PZQ+EDLF reported here could explain in part the significant reduction in granuloma formation. Th2 immunity involves the rapid activation and engagement of cells of both the innate (eosinophils and basophils) and adaptive ($CD4^+$ T cells committed to the Th2 pathway) immune systems [83], and constitutes a crucial factor in the generation of granuloma. Eosinophils play a role in the killing of schistosomula at about four weeks of infection [84] and constitute the major cell population in hepatic granulomas (~51%) [66, 67]. Basophils are found in very small numbers in the circulation (0.01 to 0.3% of total leukocytes), and following activation they secrete a number of mediators including histamine, leukotrienes, proteoglycans and proteolytic enzymes, as well as several cytokines, playing a major role in inflammation and modulating the number of eosinophils and

neutrophils present at the inflammatory site [85, 86]. Basophils have been 433
 thought to migrate into inflamed tissues after the Th2 cytokine-dependent 434
 response is established, and they are associated with chronic allergic 435
 inflammation and helminth infections [85, 87]. Recent studies have 436
 demonstrated that MHC class II+ murine basophils migrate to the draining 437
 lymph nodes following exposure to *S. mansoni* eggs [88], and depletion of 438
 basophils resulted in a concomitant downregulation of egg granuloma formation 439
 at 7 weeks p.i. [87]. In IL-17-associated pathogenicity of schistosomiasis, Th17 440
 response favors neutrophil accumulation and degranulation, thus exacerbating 441
 egg-induced tissue damage [31, 89, 90]. The results reported here show a marked 442
 decrease at late p.i. times in the number of neutrophils, eosinophils and 443
 basophils in the blood of *S. mansoni*-infected mice, treated with EDLF or 444
 PZQ+EDLF, further supporting an anti-inflammatory effect of 445
 EDLF-containing therapies, and thus ameliorating hepatic granulomatous 446
 inflammation and liver damage. However, no significant changes were detected 447
 in the total number of blood lymphocytes and monocytes following pretreatment 448
 with PZQ, EDLF or PZQ+EDLF when compared to infected untreated mice, 449
 showing figures similar to those previously reported [91]. On these grounds, our 450
 data indicate that the inclusion of EDLF in the prophylactic regimen leads to a 451
 dramatic change in the immune response elicited following *S. mansoni* infection. 452
 However, EDLF does not act by indiscriminately eliminating cells in secondary 453
 lymphoid organs that are crucial for triggering antigen-specific immunity [47]. 454
 Moreover, we have also shown here that PZQ+EDLF combination treatment 455
 significantly reduced the amount of eggs in both liver and intestine. Taken 456
 together, our data suggest that the inclusion of EDLF in combination therapy 457
 regimens improves schistosomiasis prophylaxis. Because in our present study 458
 mice were treated with PZQ and EDLF since three days before until eight days 459
 after infection, and the different experimental determinations were performed 3 460
 and 8 weeks p.i., an important factor to take into account is the 461
 pharmacokinetic parameters of both drugs. Whereas the elimination half-life of 462
 PZQ is between 1-3 h [92, 93], the APL EDLF shows a much slower elimination 463
 rate (half-life of elimination, 30.4 ± 26.8 h). EDLF has also a high distribution 464
 to tissues, being highly distributed extravascularly, and with a rapid distribution 465
 to organs that are highly irrigated, including liver, where it shows a low hepatic 466
 clearance value [94]. The APL miltefosine shows an extremely slow elimination, 467
 as assessed by the long elimination half-lives estimated from a two-compartment 468
 pharmacokinetic model, with a primary elimination half-life of 7.05 days and a 469
 terminal half-life of 30.9 days [43, 95]. Miltefosine is eliminated from the body 470
 at a very slow rate and is still detectable in human plasma samples taken 5 to 6 471
 months after the end of treatment [95]. Thus, APLs seem to be characterized by 472
 their long residence times in the body. This long elimination half-life could be of 473
 importance for the prophylactic action of EDLF and EDLF-containing regimens. 474
 Combination therapy, ideally among drugs with unrelated mechanisms of action 475
 and targeting the different developmental stages of schistosomes in the human 476
 host, could be pursued as an area for future research [96, 97]. Here, we have 477
 found that the combination of PZQ and EDLF leads to a prophylactic treatment 478

that promotes the killing of mature and immature forms of *S. mansoni*, as well as a drastic reduction in the immune response at late p.i. times that could lead to a significant decrease in granuloma formation and liver pathology. In conclusion, the results of this study demonstrate that the PZQ+EDLF combination prophylactic treatment described here is able to kill immature forms of *S. mansoni*, and modulate immune responses of infected mice, leading to a significant reduction in parasite burden and hepatic granuloma size. In addition, it is tempting to envisage that the combination of PZQ and EDLF could be a promising therapeutic regimen not only for prophylaxis treatment, but also for combination therapy against schistosomiasis. The results reported here warrant further studies on the putative use of the alkylphospholipid EDLF together with PZQ as a promising approach for treating schistosomiasis.

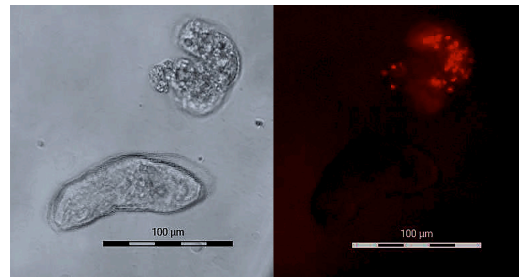
Supporting Information

S1 Video. *S. mansoni* schistosomula in culture.

This video shows a 24-h culture of *S. mansoni* schistosomula prepared by repeatedly passing the cercariae through a double-ended needle connected to two syringes to remove tails.

S2 Video. In vitro effect of edelfosine on *S. mansoni* schistosomula.

These movies show morphological changes in control untreated schistosomula (live control), heat-killed schistosomula (56°C, dead control), and schistosomula treated with 20 μM edelfosine for 24 h.

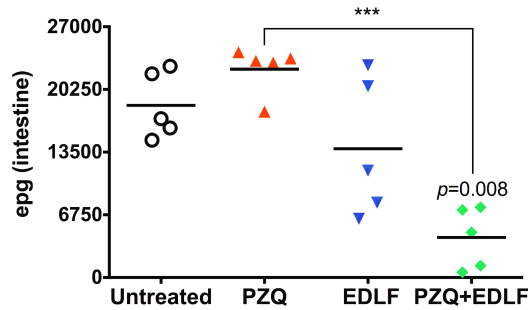


S1 Fig. Differential morphology and propidium iodide permeability between live and dead *S. mansoni* schistosomula.

Image shows two schistosomula, alive (bottom) and dead (top), under light (left) and fluorescence (right) microscopy. Dead schistosomula show loss in membrane permeability leading to propidium iodide staining, as well as tegumental deformation and a granular appearance in contrast to control live parasites, by

fluorescence microscopy (propidium iodide staining) and light microscopy morphology.

507
508

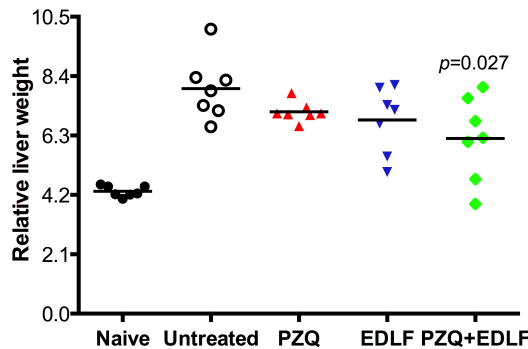


S2 Fig. Effects on relative liver weight after prophylactic treatment of *S. mansoni*-infected mice with PZQ, EDLF or PZQ+EDLF.

509
510
511

Infected mice were treated with 100 mg/kg PZQ, 45 mg/kg EDLF, or PZQ+EDLF. Control groups consisting of a normal untreated (naive) and an infected untreated (untreated) group, were given the same amount of the vehicle at the same time as the PZQ-, EDLF- or PRQ+EDLF-treated groups and were run in parallel. Compounds were orally administered. Relative liver weight was determined as follows: Relative liver weight = (absolute liver weight/body weight) x 100. Each point represents data from an individual drug-treated- or infected untreated-mouse. Horizontal bars indicate average values. Significance (p) value with respect to infected untreated mice is indicated. The means ± SEM (n = 7) for each experimental condition are as follows: naive (4.3 ± 0.07); untreated (7.95 ± 0.42); PZQ: (7.13 ± 0.13); EDLF: 6.85 ± 0.44; PZQ+EDLF: 6.19 ± 0.55).

512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523



S3 Fig. Effects on parasite egg burden in intestine after prophylactic treatment of *S. mansoni*-infected mice with PZQ, EDLF or PZQ+EDLF.

Infected mice were treated with 100 mg/kg PZQ, 45 mg/kg EDLF, or PZQ+EDLF. Infected untreated mice were run in parallel. Compounds were orally administered. Parasite egg burden in intestine was determined as eggs per gram (epg). Each point represents data from an individual treated- or infected untreated-mouse. Horizontal bars indicate average values. Significance (p) values with respect to infected untreated mice are indicated. Statistical significance between the PZQ and PZQ+EDLF groups is also included. (***) $p < 0.001$. The means \pm SEM (n = 5) for each experimental condition are as follows: untreated (18532 \pm 1600); PZQ (22435 \pm 1160); EDLF (13872 \pm 3333); PZQ+EDLF (4306 \pm 1465).

Time point	Groups	White blood cells (10 ³ /μL)	Lymphocytes (10 ³ /μL)	Monocytes (10 ³ /μL)
3 rd Week	Naive	6.013 (0.348)	4.178 (0.303)	0.709 (0.065)
	Untreated	5.231 (0.437)	3.267 (0.255)	0.449 (0.045)
	PZQ	5.367 (0.543)	3.853 (0.518)	0.429 (0.032)
	EDLF	4.950 (0.630)	2.770 (0.223)	0.491 (0.032)
	PZQ+EDLF	5.330 (0.454)	3.611 (0.319)	0.579 (0.070)
8 th Week	Naive	4.933 (0.377)**	2.676 (0.237)	0.595 (0.066)*
	Untreated	10.310 (1.052)	3.450 (0.399)	1.096 (0.072)
	PZQ	9.920 (1.241)	4.434 (1.049)	0.859 (0.069)
	EDLF	6.451 (0.787)*	2.897 (0.384)	0.951 (0.124)
	PZQ+EDLF	7.693 (0.8964)	3.828 (0.620)	1.246 (0.158)

Data are shown as means (SEM) of eight mice. Asterisk represents statistical significance with respect to untreated-infected group * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

S1 Table

White blood cell, lymphocyte and monocyte count in drug-treated and untreated mice.

Acknowledgments

We are indebted to María Gutiérrez Mateos, Francisco Collia and EL-Habib Dakir for their expert assistance in the histopathological studies.

References

1. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26: 383-97.
2. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE and King CH. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2014;383: 2253-64.
3. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M and Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006;6: 411-25.

4. King CH. Health metrics for helminthic infections. *Adv Parasitol.* 2010;73: 51-69.
5. Lewis F and Tucker M (2014) Schistosomiasis. In: R. Toledo and B. Fried, editors. *Digenetic Trematodes*: Springer New York. pp. 47-75.
6. WHO: Schistosomiasis, Fact sheet N^o 115, Update February 2014. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Accessed 20 October, 2014.
7. Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuem Tchuente LA, Garba A, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop.* 2013;128: 423-40.
8. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK and McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009;31: 163-76.
9. Colley DG and Secor WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2014;36: 347-57.
10. Wilson S, Vennervald BJ and Dunne DW. Chronic hepatosplenomegaly in African school children: a common but neglected morbidity associated with schistosomiasis and malaria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e1149.
11. Gryseels B, Polman K, Clerinx J and Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006;368: 1106-18.
12. Jurberg AD, Goncalves T, Costa TA, de Mattos AC, Pascarelli BM, de Manso PP, et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol.* 2009;219: 219-34.
13. Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA and Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit Vectors.* 2011;4: 131.
14. Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002;346: 1212-20.
15. Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.* 2009;31: 656-63.
16. Hams E, Aviello G and Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol.* 2013;4: 89.
17. Pearce EJ and MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2: 499-511.
18. Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM and McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2007;7: 218-24.

19. Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC and Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* 2008;108: 109-17.
20. Layland LE, Mages J, Loddenkemper C, Hoerauf A, Wagner H, Lang R, et al. Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. *J Immunol.* 2010;184: 713-24.
21. Anthony BJ, Ramm GA and McManus DP. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 2012;28: 572-9.
22. McKee AS and Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol.* 2004;173: 1224-31.
23. Schramm G and Haas H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes Infect.* 2010;12: 881-8.
24. Hoffmann KF, Cheever AW and Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol.* 2000;164: 6406-16.
25. Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ and Wilson RA. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol.* 2003;33: 880-8.
26. Allam G. Vasoactive intestinal peptide inhibits liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni and modulates IL-10, IL-12 and TNF-alpha production. *Immunobiology.* 2007;212: 603-12.
27. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ and Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007;7: 975-87.
28. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ and Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003;278: 1910-4.
29. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204: 1849-61.
30. Diaz A and Allen JE. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol.* 2007;37: 3319-26.
31. Rutitzky LI and Stadecker MJ. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma. *Eur J Immunol.* 2011;41: 2677-87.

32. Cioli D, Pica-Mattoccia L, Basso A and Guidi A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol.* 2014;195: 23-9.
33. Eissa MM, El Bardicy S and Tadros M. Bioactivity of miltefosine against aquatic stages of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and their snail hosts, supported by scanning electron microscopy. *Parasit Vectors.* 2011;4: 73.
34. Bertao HG, da Silva RA, Padilha RJ, de Azevedo Albuquerque MC and Radis-Baptista G. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res.* 2012;110: 2465-73.
35. Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Dakir ELH, Mollinedo F and Muro A. In vitro and in vivo anti-schistosomal activity of the alkylphospholipid analog edelfosine. *PLoS ONE.* 2014;9: e109431.
36. Gajate C and Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab.* 2002;3: 491-525.
37. Gajate C and Mollinedo F. Lipid rafts, endoplasmic reticulum and mitochondria in the antitumor action of the alkylphospholipid analog edelfosine. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14: 509-27.
38. Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.* 1997;57: 1320-8.
39. Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, et al. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene.* 2010;29: 3748-57.
40. Gajate C and Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood.* 2001;98: 3860-3.
41. Gajate C and Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood.* 2007;109: 711-9.
42. Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med.* 2004;200: 353-65.

43. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH and de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67: 2576-97.
44. Woerly V, Maynard L, Sanquer A and Eun HM. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2009;105: 463-9.
45. Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Janez E, Justies N, Colia F, et al. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329: 439-49.
46. Abramowski P, Otto B and Martin R. The orally available, synthetic ether lipid edelfosine inhibits T cell proliferation and induces a type I interferon response. *PLoS One.* 2014;9: e91970.
47. Abramowski P, Steinbach K, Zander AR and Martin R. Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2014;274: 111-24.
48. Lewis F. Schistosomiasis. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 19: Unit 19.1.
49. Basch PF. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *J Parasitol.* 1981;67: 179-85.
50. Mann VH, Morales ME, Rinaldi G and Brindley PJ. Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 2010;137: 451-62.
51. Peak E, Chalmers IW and Hoffmann KF. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e759.
52. Cheever AW. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull World Health Organ.* 1970;43: 601-3.
53. Allam G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiology.* 2009;214: 712-27.
54. Pyrrho Ados S, Ramos JA, Neto RM, Silva CS, Lenzi HL, Takiya CM, et al. Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46: 3490-8.
55. Pinho JM, Cardoso FC, Lopes DO, Pinheiro CS, Caliari MV, Oliveira FM, et al. Immunization with SmIg, a novel tegument protein from *Schistosoma mansoni*, fails to induce protection in mice but reduces liver pathology. *Parasitology.* 2010;137: 1079-88.

56. Mata-Santos HA, Lino FG, Rocha CC, Paiva CN, Castelo Branco MT and Pyrrho Ados S. Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. *Parasitol Res.* 2010;107: 1429-34.
57. von L. Host response to eggs of *S. mansoni*. I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. *Am J Pathol.* 1962;41: 711-31.
58. Nascimento M, Huang SC, Smith A, Everts B, Lam W, Bassity E, et al. Ly6Chi monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis. *PLoS Pathog.* 2014;10: e1004282.
59. Xiao SH, Catto BA and Webster LT, Jr. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 1985;151: 1130-7.
60. Aragon AD, Imani RA, Blackburn VR, Cupit PM, Melman SD, Goronga T, et al. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;164: 57-65.
61. Riley JK, Takeda K, Akira S and Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem.* 1999;274: 16513-21.
62. Haddad JJ, Saade NE and Safieh-Garabedian B. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signal.* 2003;15: 255-67.
63. Wilson MS, Cheever AW, White SD, Thompson RW and Wynn TA. IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 2011;7: e1002171.
64. Rutitzky LI, Bazzone L, Shainheit MG, Joyce-Shaikh B, Cua DJ and Stadecker MJ. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. *J Immunol.* 2008;180: 2486-95.
65. Makepeace BL, Martin C, Turner JD and Specht S. Granulocytes in helminth infection – who is calling the shots? *Curr Med Chem.* 2012;19: 1567-86.
66. Beschin A, De Baetselier P and Van Ginderachter JA. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. *J Pathol.* 2013;229: 186-97.
67. Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW, et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun.* 2006;74: 1471-9.

68. Doenhoff MJ, Cioli D and Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21: 659-67.
69. Silva LM, Menezes RM, de Oliveira SA and Andrade ZA. Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36: 335-41.
70. Fairfax KC, Amiel E, King IL, Freitas TC, Mohrs M and Pearce EJ. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002490.
71. Araujo JM, de Melo TT, de Sena IC, Alves CC, Araujo N, Duraes Fdo V, et al. *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection. *Acta Trop.* 2012;124: 140-6.
72. Sanchez-Blanco A, Rodriguez-Matellan AG, Reis-Sobreiro M, Saenz-Narciso B, Cabello J, Mohler WA, et al. *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell Cycle.* 2014;13: 3375-89.
73. Gajate C, Fonteriz RI, Cabaner C, Alvarez-Noves G, Alvarez-Rodriguez Y, Modolell M, et al. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer.* 2000;85: 674-82.
74. Gajate C, Gonzalez-Camacho F and Mollinedo F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS One.* 2009;4: e5044.
75. Varela MR, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, Munoz DL, et al. In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6: e1612.
76. Eissa MM, El-Azzouni MZ, Amer EI and Baddour NM. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. *Int J Parasitol.* 2011;41: 235-42.
77. Pachioni Jde A, Magalhaes JG, Lima EJ, Bueno Lde M, Barbosa JF, de Sa MM, et al. Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16: 742-59.
78. Morel M, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Lancelot J and Dissous C. Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new

- chemotherapeutics against schistosomiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014;4: 256-66.
79. Reis-Sobreiro M, Roue G, Moros A, Gajate C, de la Iglesia-Vicente J, Colomer D, et al. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 2013;3: e118.
 80. Joseph S, Jones FM, Walter K, Fulford AJ, Kimani G, Mwatha JK, et al. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *J Infect Dis.* 2004;190: 835-42.
 81. Cheever AW, Hoffmann KF and Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol Today.* 2000;21: 465-6.
 82. Shainheit MG, Lasocki KW, Finger E, Larkin BM, Smith PM, Sharpe AH, et al. The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1beta. *J Immunol.* 2011;187: 5328-35.
 83. Bruschi F, Chiumiento L and Prete G (2010) Immunodulation and Helminths: Towards New Strategies for Treatment of Immune-Mediated Diseases? In: M. Viola Magni, editor. *Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi: Springer Netherlands.* pp. 357-380.
 84. Capron M and Capron A. Rats, mice and men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol Today.* 1986;2: 69-75.
 85. Siracusa MC, Wojno ED and Artis D. Functional heterogeneity in the basophil cell lineage. *Adv Immunol.* 2012;115: 141-59.
 86. Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, et al. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood.* 2007;110: 913-20.
 87. Anyan WK, Seki T, Kumagai T, Obata-Ninomiya K, Furushima-Shimogawara R, Kwansa-Bentum B, et al. Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitol Int.* 2013;62: 508-13.
 88. Phythian-Adams AT, Cook PC, Lundie RJ, Jones LH, Smith KA, Barr TA, et al. CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J Exp Med.* 2010;207: 2089-96.
 89. Burke ML, McManus DP, Ramm GA, Duke M, Li Y, Jones MK, et al. Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e598.

90. Zhang Y, Chen L, Gao W, Hou X, Gu Y, Gui L, et al. IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *Schistosoma japonicum* infected mice. *Eur J Immunol.* 2012;42: 1523-35.
91. Perez del Villar L, Vicente B, Blanco-Gomez A, Castellanos A, Perez-Losada J and Muro A. Identifying phenotypes involved in susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection in F1B6CBA mice. *Acta Parasitol.* 2014;59: 529-39.
92. Sotelo J and Jung H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin Pharmacokinet.* 1998;34: 503-15.
93. Kokwaro GO and Taylor G. Effect of experimentally-induced hepatic cirrhosis on the pharmacokinetics of orally administered praziquantel in the rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1990;15: 199-202.
94. Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F and Blanco-Prieto MJ. Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 858-64.
95. Dorlo TP, van Thiel PP, Huitema AD, Keizer RJ, de Vries HJ, Beijnen JH, et al. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52: 2855-60.
96. Danso-Appiah A, Olliaro PL, Donegan S, Sinclair D and Utzinger J. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2: CD000528.
97. Utzinger J, Chollet J, You J, Mei J, Tanner M and Xiao S. Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. *Acta Trop.* 2001;80: 9-18.

III.3 PATENTE

Uso de la edelfosina para la
prevención y/o tratamiento de
helmintiasis

Antonio Muro,
Julio López-Abán,
Edward Yepes
y
Faustino Mollinedo.

Patente: 2378812

19.03.2013

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 812**

21 Número de solicitud: 201031387

51 Int. Cl.:

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 33/10 (2006.01)

A61P 33/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.09.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.04.2012

Fecha de la concesión:

06.03.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.03.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (40%)
PATIO DE ESCUELAS, 1
37008 SALAMANCA (Salamanca) ES;
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (40%) y
APOINTECH, S.L. (20%)**

72 Inventor/es:

**MURO ALVAREZ, Antonio;
LÓPEZ ABÁN, Julio;
YEPES VICTORIA, Edward y
MOLLINEDO GARCÍA, Faustino**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE EDELFOFINA PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE HELMINTIASIS**

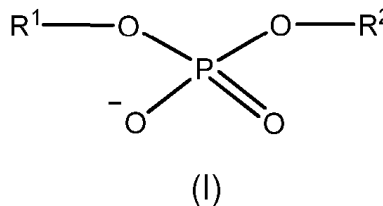
57 Resumen:

Uso de edelfosina para la prevención y/o tratamiento de helmintiasis.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I)

****IMAGEN****

donde preferiblemente el compuesto es edelfosina (1-O-octadecil-2-O-metil-rac-glicero-3-fosfocolina), para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de helmintiasis, es decir, para su uso como antihelmíntico, preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de esquistosomiasis y/o estrongiloidiasis.



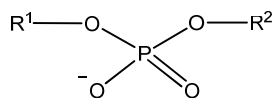
ES 2 378 812 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

USO DE EDELFOFINA PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE HELMINTIASIS.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la actividad
5 terapéutica de compuestos o preparaciones medicinales, en concreto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I)



(I)

10 donde preferiblemente el compuesto es edelfosina (1-*O*- octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina), para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de helmintiasis, es decir, para su uso como antihelmíntico, preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de esquistosomiasis y/o estrombiloidiasis.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades infecciosas
20 constituyen la primera causa de morbilidad y mortalidad en los países en vía de desarrollo (Morel, 2000, *Parasitol Today*, 16(12):522-8). SIDA, tuberculosis y diarreas de diferentes etiologías son las más prevalentes, seguidas de enfermedades infecciosas típicamente tropicales causadas por organismos protistas como paludismo, tripanosomiasis o leishmaniasis, o causadas por
25 helmintos, pertenecientes al reino animal, de mayor complejidad, como la filariasis, esquistosomiasis o estrombiloidiasis, etc. Algunas de ellas incluidas en las NTD (de las siglas en inglés *Neglected Tropical Diseases*). Estas últimas enfermedades han ido reemergiendo a raíz de los movimientos migratorios y al auge del turismo internacional (Pardo et al., 2005. *Semergen* 2005, 31 (3) 109-
30 116).

El control de estas enfermedades se basa, además de la aplicación de las medidas generales preventivas diferentes en cada una de ellas, principalmente, en el tratamiento farmacológico y en el desarrollo de vacunas efectivas. En la actualidad no existen vacunas comerciales disponibles para el control de estas enfermedades, aunque muchos grupos están trabajando en esta dirección (Martínez-Fernández et al., 2004. *Vet Parasitol.*, 126(3):287-9; López Abán et al., 2008. *MurVet Parasitol.*,153(1-2):176-81). Por el contrario, existen tratamientos farmacológicos frente a la mayor parte de ellas, basados en la utilización y la combinación de diferentes fármacos (Aparicio et al., 2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 21(10):579-92).

Independientemente del escenario se han descrito *resistencias* a la mayoría de los fármacos utilizados. Bien conocido son las resistencias causadas por los fármacos antipalúdicos (Woodrow y Krishna, 2006. *Cell Mol Life Sci.*, 63(14):1586-96). La OMS recomienda la búsqueda continua de nuevos antimaláricos con vistas a paliar este efecto. No son menores las resistencias descritas frente a los fármacos de elección contra las leishmaniasis, como los antimoniales pentavalentes, pentamidina, anfotericina B, paramomicina, etc. (Croft et al., 2006. *Indian J Med Res.*, 123(3):399-410; Loiseau y Bories, 2006. *Curr Top Med Chem.*, 6(5):539-50). Incluso existen resistencias descritas para los antihelmínticos más utilizados. Hay evidencias de resistencias al praziquantel tanto en personas tratadas en zonas endémicas de esquistosomiasis (Ribeiro Dos Santos et al., 2006. *Parasitol Res*, 99(5): 505-21), como en viajeros que visitan dichas zonas (Alonso et al., 2006. *Am J Trop Med Hyg.*, 74(2):342-4). También son conocidas las resistencias generadas frente a derivados bencimidazólicos, o frente a ivermectina (Kohler, 2001. *Int J Parasitol.*, 31(4):336-45), este último es el tratamiento de elección de la estrombiloidosis. Por estas razones es necesario el desarrollo de nuevos fármacos útiles contras estas enfermedades.

Los denominados lípidos sintéticos antitumorales (ATLs, synthetic "*antitumor lipids*") constituyen una prometedora familia de compuestos anticancerosos que

a diferencia de la mayoría de los antitumorales utilizados en clínica en la actualidad no tiene como diana el ADN (Gajate y Mollinedo, 2002. *Curr Drug Metab.*, 3(5):491-525; Mollinedo et al., 2004. *Curr Med Chem.*, 11(24):3163-84). Los ATLs pueden clasificarse en dos grandes categorías: a) los fosfolípidos alquiléter, conocidos colectivamente como éter lípidos antitumorales o análogos de alquil-lisofosfolípidos, de los que su prototipo es la edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina); b) las alquilfosfocolinas, de las que su prototipo es la miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Gajate y Mollinedo, 2002. *Curr Drug Metab.*, 3(5): 491-525; Mollinedo et al., 2004. *Curr Med Chem.*, 11(24):3163-84). Aunque se ha considerado que los ATLs y como prototipo la edelfosina actúan de forma similar, ciertas diferencias parecen emerger entre ambos tipos de familias de ATLs. La edelfosina induce apoptosis de forma selectiva en células tumorales (Mollinedo et al, 1997. *Cancer Res.*, 57(7): 1320-8), a través de un nuevo mecanismo de acción que implica la activación intracelular del receptor de muerte Fas/CD95 mediante su reclutamiento y concentración en los denominados "*lipids rafts*" (Gajate y Mollinedo, 2001. *Blood*, 98(13): 3860-3; Gajate et al., 2004. *J Exp Med*, 200(3): 353-65). La edelfosina, actuando a través de este mecanismo, parece ser particularmente eficaz frente a malignidades hematológicas (Gajate y Mollinedo, 2007. *Blood*, 109(2): 711-9). La acción antitumoral de la edelfosina es más potente que la miltefosina, comportándose como el ATL con mayor actividad anticancerosa. En tumores sólidos parece actuar vía un mecanismo diferente que implica la activación de la apoptosis a través del retículo endoplásmico (Nieto-Miguel et al., 2006. *J Biol Chem*, 281(21): 14833-40; Nieto-Miguel, 2007. *Cancer Res.*, 67(21): 10368-78). Por otra parte, aunque el proceso de apoptosis se inicie a través de distintos mecanismos, la mitocondria es fundamental en la inducción de apoptosis por edelfosina (Gajate et al, 2000. *Int J Cancer*, 86(2): 208-18; Vrablic et al, 2001. *Faseb J.*, 15(10): 1739-44). Los datos obtenidos hasta el momento indican que la edelfosina induce la muerte de las células tumorales a través de la activación directa de la maquinaria apoptótica y de esta forma podría considerarse como un buen inductor de apoptosis en distintos sistemas.

Es conocido que la edelfosina ha sido empleada para el tratamiento de organismos sencillos pertenecientes al reino Protista como *Leishmania amazonensis* (Santa-Rita et al., 2004. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54: 704–710), *Leishmania infantum* (Alzate et al., 2008. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52(10): 3779–3782) o se ha demostrado que induce alteraciones en la membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi* (Santa-Rita et al., 2006. Parasitol Res, 100:187–190). Sin embargo, hasta la fecha actual, los fármacos usados para el tratamiento de enfermedades causadas por protistas (por ejemplo, antimoniales pentavalentes, pentamidina, anfotericina B o paramomicina para el tratamiento de la leishmaniasis) se han mostrado inservibles en el tratamiento de enfermedades causadas por organismos superiores como por ejemplo los helmintos, tratadas por ejemplo con praziquantel (esquistosomiasis) o con ivermectina (estrongiloidosis).

Por tanto, persiste el problema de encontrar fármacos eficaces para el tratamiento de enfermedades causadas por helmintos como esquistosomiasis o estrongiloidosis, alternativos a los escasos fármacos usados actualmente, cuyo único uso está provocando la aparición de resistencias de dichos helmintos a los tratamientos efectuados.

20

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

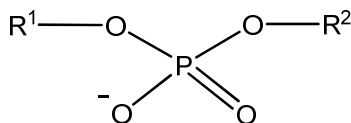
La presente invención se refiere al uso de un fosfolípido alquiléter de fórmula (I), preferiblemente la edelfosina, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de helmintiasis, es decir, para su uso como antihelmíntico, preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de esquistosomiasis y/o estrongiloidiasis.

A pesar de que los fármacos conocidos usados para el tratamiento de enfermedades parasitarias producidas por protistas, como por ejemplo *Leishmania* sp., no muestran resultados satisfactorios en el tratamiento de

enfermedades causadas por parásitos más complejos como por ejemplo los helmintos, los inventores de la presente invención, han demostrado que la edelfosina es eficaz en la disminución de la carga helmíntica en hospedadores de dichos parásitos. Concretamente, tal como puede verse en los ejemplos, la edelfosina es capaz de actuar en una fase temprana de la esquistomatosi-
 5 edelfosina es capaz de actuar reduciendo la carga helmíntica de Strongiloides. El efecto técnico mostrado en la presente invención es la eficacia en el tratamiento de esquistosomiasis y/o estrogiloidiasis cuando se usa el fármaco edelfosina, solucionando con ello un problema técnico cada vez más importante ya que, tal como se ha mencionado en el apartado anterior, el uso de los escasos antihelmínticos eficaces en el tratamiento de estas enfermedades, está provocando la aparición de resistencias de dichos helmintos.

15 Por tanto, la presente invención aporta al estado de la técnica información de alto valor para el tratamiento de los helmintos que provocan graves problemas en países tropicales y que, debido a la creciente inmigración, también supone un problema incipiente y potencialmente grave en los países desarrollados no tropicales. El uso de la edelfosina supone un refuerzo en el tratamiento de dichas enfermedades y, mediante la alternancia con otros fármacos o su combinación con los mismos, podría suponer la evitación o el retraso en la aparición de resistencias frente a los fármacos antihelmínticos conocidos.

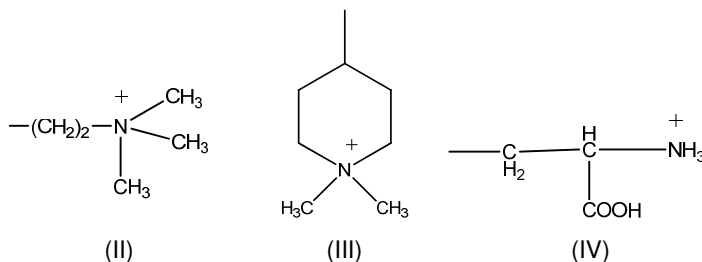
25 Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de helmintiasis,



(I)

Donde: R¹ se selecciona entre un alquilo (C₁₄-C₃₀), un alquenilo (C₁₄-C₃₀), un alquinilo (C₁₄-C₃₀) o un grupo -CH₂-CH(OR³)-CH₂-O-R⁴; R³ es un alquilo (C₁-C₈), R⁴ se selecciona entre un alquilo (C₁₂-C₃₀), un alquenilo (C₁₂-C₃₀), un alquinilo (C₁₂-C₃₀):

R² se selecciona entre un grupo de fórmula (II), (III) ó (IV):



10

Los compuestos de fórmula general (I) tienen uno o más centros asimétricos y por tanto, pueden existir en forma de enantiómeros o diastereómeros. En la presente invención también se contempla el uso de solvatos del compuesto de fórmula general (I) (como por ejemplo, pero sin limitarse, hidratos), prodrugas (sinónimo de profármacos), o claratos. Las sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan de entre cloruro, bromuro, yoduro o cualquier otra sal farmacéuticamente aceptable.

20 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

En la presente invención, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos se seleccionan de la lista que comprende, pero sin limitarse: acético, 5 algínico, antranílico, benzenesulfónico, benzoico, camforsulfónico, cítrico, etensulfónico, fórmico, fumárico, furoico, glucónico, glutámico, glucorénico, galacturónico, glicídico, hidrobromico, hidroclicrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanesulfónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, propiónico, fosfórico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, 10 sulfúrico, tartárico o p-toluenosulfónico.

El compuesto de la invención puede estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente y farmacológicamente 15 aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es 20 crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las prodrogas o 25 profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "profármaco" o "prodroga" tal como aquí se utiliza incluye cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, amidas 30 biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, fosfatos biohidrolizables. Otros ejemplos de prodrogas incluyen compuestos que comprenden grupos -NO, -NO₂, -ONO, o -ONO₂- que

al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica, siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico del mismo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los términos “amidas biohidrolizables”, “ésteres biohidrolizables”, “carbamatos biohidrolizables”, “ureidos biohidrolizables”, “fosfatos biohidrolizables”, se refieren a carbamato, carbonato, ureido y fosfato, respectivamente, de un compuesto que: 1) no interfiera con la actividad biológica del complejo pero que confiere al compuesto propiedades ventajosas in vivo, como absorción, duración del efecto, o del inicio del efecto; o 2) es biológicamente inactivo, pero se convierte in vivo a compuesto biológicamente activo.

En la presente invención, el término “alquilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas lineales o ramificadas que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio. El término “alquenilo” y “alquinilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas que tienen uno o varios dobles (alquenilo) o triples (alquinilo), respectivamente, entre sus átomos de carbono.

El término “alquenilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales

alquenos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

- 5 En la presente invención el término "alquino" se refiere a un radical de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más triples enlaces y que puede tener uno o más enlaces dobles a lo largo de la cadena carbonada. Los radicales alquino pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amino, etc.
- 10

En la presente invención, el grupo R^1 es un alquilo C_{14} - C_{30} . Preferiblemente el alquilo es C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{29} , o C_{30} . Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), tal como se ha descrito en los párrafos anteriores, donde R^1 es un alquilo C_{14} - C_{20} . Más preferiblemente el alquilo es C_{16} - C_{18} .

15

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), donde R^1 es un grupo $-CH_2-CH(OR^3)-CH_2-O-R^4$.

20

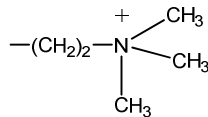
En la presente invención, el grupo R^3 es un alquilo C_1 - C_8 . Preferiblemente el alquilo es C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 o C_8 . Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), donde R^3 es un alquilo (C_1 - C_3). Más preferiblemente R^3 es un grupo metilo.

25

En la presente invención, el grupo R^4 es un alquilo C_{12} - C_{30} . Preferiblemente el alquilo es C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{29} , o C_{30} . Otra realización más preferida se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), donde R^4 es un alquilo (C_{14} - C_{20}).

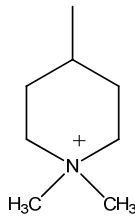
30

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de fórmula general (I) descritos anteriormente, donde R² es un grupo de fórmula (II):



5

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de fórmula general (I) descritos anteriormente, donde R² es un grupo de fórmula (III):



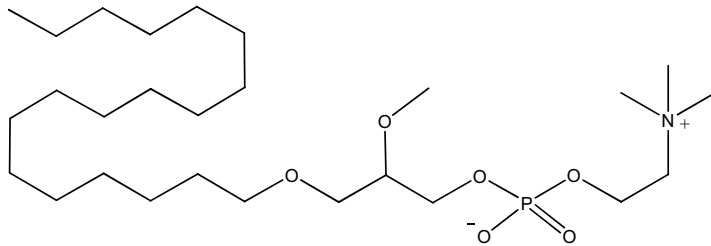
10

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de fórmula general (I) descritos anteriormente, donde dicho compuesto se selecciona entre miltefosina, edelfosina o perifosina.

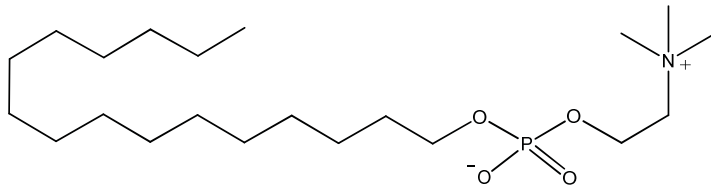
15 Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), donde dicho compuesto es edelfosina. La edelfosina (1-O- octadecil-2-O-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) también es conocida como ET-18-OCH₃.

20 La edelfosina tiene la fórmula siguiente:

ES 2 378 812 B1

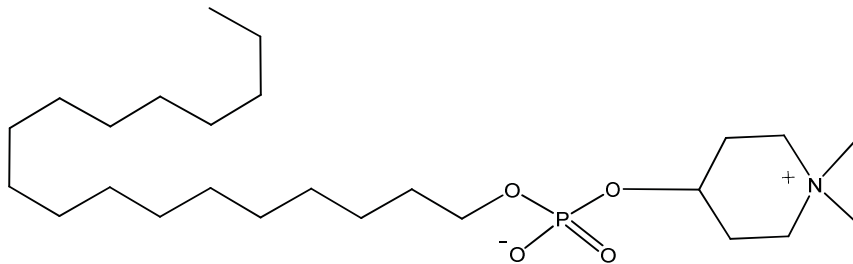


La miltefosina tiene la fórmula siguiente:



5

La perifosina tiene la fórmula siguiente:



- 10 En adelante, para referirse a cualquiera de los compuestos definidos en la presente invención, se puede emplear el término "compuesto de la invención" o "compuesto de la presente invención".

- 15 En la presente invención el término "tratamiento" se refiere a la erradicación o mejoramiento de una enfermedad, o de uno o más síntomas asociados con la helmintiasis, así como a minimizar la propagación o el empeoramiento de la helmintiasis, o retrasar la progresión, propagación o empeoramiento de helmintiasis. En la presente invención, el término "prevención" o "profilaxis" se

refiere a evitar la aparición, recurrencia o la propagación de la helmintiasis, o de uno o más síntomas de la misma.

5 La helmintiasis es una enfermedad parasitaria en la que una parte del cuerpo esta infestada de gusanos, como lo son las lombrices intestinales, solitarias o gusanos redondos. La helmintiasis puede ser por ejemplo pero sin limitarse nematodiasis (helmintiasis por nemátodos), cestodiasis (helmintiasis por céstodos) o trematodiasis (helmintiasis por tremátodos). La nematodiasis se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, anisakiasis, 10 anquilostomiasis, ascariasis, dracunculiasis, elefantiasis, enterobiasis, estrongiloidiasis, filariasis, oncocercosis, toxocariasis, tricuriasis o triquinelosis. La cestodiasis se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, cisticercosis, hidatidosis o teniasis. La trematodiasis se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, esquistosomiasis o tricuriasis.

15 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de esquistosomiasis. La esquistosomiasis está producida por al menos un platelminto parásito del género *Schistosoma*.

20 La esquistosomiasis (bilharziasis o bilharziosis) es una enfermedad parasitaria producida por gusanos platelmintos de la clase trematodos del género *Schistosoma*. La esquistosomiasis generalmente es adquirida por medio de la ingesta de agua dulce infectada con formas larvarias (cercarias) 25 esquistosomas. La esquistosomiasis afecta por lo menos 200 millones de personas alrededor del mundo, y más de 700 millones de personas viven en zonas endémicas. La infección es frecuente en zonas tropicales y subtropicales, en las zonas pobres sin agua potable y saneamiento adecuado.

30 El platelminto parásito del género *Schistosoma* se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma bovis* x *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma curassoni*, *Schistosoma edwardiense*,

Schistosoma guineensis, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis*, *Schistosoma haematobium/matthei*, *Schistosoma hippopotami*, *Schistosoma incognitum*, *Schistosoma indicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma leiperi*,
5 *Schistosoma malayensis*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma mansoni* X *Schistosoma rodhaini*, *Schistosoma margrebowiei*, *Schistosoma matthei*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma nasale*, *Schistosoma ovuncatum*, *Schistosoma rodhaini*, *Schistosoma sinensium* o *Schistosoma spindale*.

10 En humanos, la esquistosomiasis urinaria es causada por *Schistosoma hematobium*, la esquistosomiasis intestinal está causada por cualquiera de los organismos *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, o *Schistosoma mekongi*. Por tanto, una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, donde el
15 platelminto parásito del género *Schistosoma* se selecciona de la lista que comprende *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum* o *Schistosoma mekongi*. Preferiblemente el platelminto parásito del género *Schistosoma* es *Schistosoma mansoni*.

20 Otra realización más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, donde la esquistosomiasis está producida por al menos un platelminto parásito del género *Schistosoma* en una fase temprana inmadura en un mamífero, preferiblemente un humano. Las fases tempranas inmaduras de dicho parásito en humanos son la forma de larva (cercaria) y de
25 esquistosómula, forma del ciclo anterior a la del parásito adulto. Preferiblemente la fase temprana inmadura es esquistosómula.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la fabricación de un medicamento para la
30 prevención y/o el tratamiento de estrogiloidiasis. La estrogiloidiasis está producida por al menos un nemátodo parásito del género *Strongyloides*.

La estrongiloidiasis es una enfermedad causada por una infección de una especie del género *Strongyloides*, nemátodos que se encuentran ampliamente diseminados en las áreas tropicales y subtropicales. El género *Strongyloides* está clasificado en el orden *Rhabditida*, y la mayoría de los miembros son
5 nematodos que viven en el suelo. *Strongyloides stercoralis* es el patógeno más común para los humanos. La infección grave, que resulta del aumento de la generación de larvas filariformes, ocurre cuando la inmunidad del paciente se encuentra alterada, especialmente por terapia esteroidea y, menos comúnmente, otros inmunosupresores, neoplasias hematológicas o
10 desnutrición.

El nemátodo parásito del género *Strongyloides* se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Strongyloides akbari*, *Strongyloides callosciureus*, *Strongyloides cebus*, *Strongyloides fueleborni*, *Strongyloides fueleborni fueleborni*, *Strongyloides fueleborni kellyi*, *Strongyloides mirzai*,
15 *Strongyloides myopotami*, *Strongyloides ophidae*, *Strongyloides papillosus*, *Strongyloides planiceps*, *Strongyloides procyonis*, *Strongyloides ransomi*, *Strongyloides ratti*, *Strongyloides robustus*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides suis*, *Strongyloides venezuelensis*, *Strongyloides vitali* o
20 *Strongyloides westeri*. Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, donde el platelminto parásito del género *Schistosoma* se selecciona de la lista que comprende *Strongyloides venezuelensis*, *Strongyloides stercoralis* o *Strongyloides fueleborni*. Preferiblemente el platelminto parásito del género *Schistosoma* es
25 *Strongyloides stercoralis*.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, donde el medicamento además comprende al menos otra sustancia activa. Esta sustancia activa debe permitir la actividad del
30 compuesto de la invención, es decir, debe ser compatible.

El compuesto de la presente invención, sales, enantiómeros, diastereómeros, solvatos, prodrogas (profármacos), o claratos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales, para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención(I), sales, enantiómeros, diastereómeros, solvatos, prodrogas (profármacos), o claratos del mismo.

Según una realización más preferida de la presente invención, la sustancia activa es un agente antiparasitario. Preferiblemente el agente antiparasitario es un agente antihelmíntico.

Una realización aún más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de esquistosomiasis, donde el medicamento además comprende praziquantel, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se muestra en el ejemplo 2 de la presente invención, el uso conjunto de edelfosina y de praziquantel es compatible, por tanto, ambos antihelmínticos pueden usarse de forma conjunta. También se contemplan en la presente invención, enantiómeros, diastereómeros, solvatos, prodrogas o claratos de praziquantel. El medicamento puede comprender el compuesto de la invención junto con otros fármacos, solos, o en cualquiera de sus combinaciones, con o sin praziquantel, utilizados para el tratamiento de la esquistosomiasis como por ejemplo, pero sin limitarse, albendazol, mebendazol u Oxamniquina. El medicamento también puede comprender otros fármacos antiparasitarios.

Una realización aún más preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la fabricación de un medicamento para la

prevención y/o el tratamiento de estrogiloidiasis, donde el medicamento además comprende ivermectina, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables. La ivermectina es el fármaco más empleado y más eficaz hasta la fecha, para el tratamiento de estrogiloidiasis. También se contemplan en la
5 presente invención, enantiómeros, diastereómeros, solvatos, prodrogas o claratos de ivermectina. El medicamento puede comprender el compuesto de la invención junto con otros fármacos, solos, o en cualquiera de sus combinaciones, con o sin ivermectina, utilizados para el tratamiento de la estrogiloidiasis como por ejemplo, pero sin limitarse, albendazol, tiabendazol,
10 pamoato de oxantel o pamoato de pirantel. El medicamento también puede comprender otros fármacos antiparasitarios.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, donde el medicamento además comprende al
15 menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, el excipiente o el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables.

El término "farmacológicamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a
20 los organismos a los que se administra. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia permita la actividad del compuesto de la presente invención.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la
25 absorción del compuesto de la presente invención, estabiliza dicho compuesto o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante,
30 función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función

desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

5 El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” hace referencia a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga al compuesto de la
10 presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del compuesto de la invención y/o de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente.

15 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración por vía oral.

En cada caso, la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de
20 administración utilizada, por ello, el medicamento de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida.

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que
25 pueda permitir su administración oral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

30 El medicamento se puede presentar en una forma adaptada a la administración por vía oral La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir,

preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral.

5

Otra posibilidad es que el medicamento se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

Es decir, el compuesto de la presente invención, sales, enantiómeros, diastereómeros, solvatos, prodrogas (profármacos), o claratos, se formulan en medicamento, en una cantidad terapéuticamente efectiva. El medicamento puede formularse junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables, así como también puede comprender otra sustancia activa, en una forma sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de la invención, sus sales, enantiómeros, diastereómeros, solvatos, prodrogas (profármacos), o claratos.

Teniendo en cuenta que la edelfosina es un fármaco que se comercializa como anticancerígeno, su farmacocinética es conocida. Dichas características farmacocinéticas de la edelfosina pueden consultarse en Estella-Hermoso de Mendoza et al., 2009 (Estella-Hermoso de Mendoza et al., 2009. Clin Cancer

Res., 15(3):858-64).

Todos los medicamentos tienen unas características concretas en lo que se refiere a su liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación.
5 Cuando se introduce un fármaco en el organismo debe superar numerosas barreras biológicas antes de llegar al receptor que dependen de la vía de administración. Para que un fármaco pueda ejercer su acción debe alcanzar una concentración adecuada y en el lugar adecuado en el cual un fármaco está en posición de interactuar con sus receptores para realizar su efecto biológico
10 sin que intervengan barreras de difusión.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas
15 y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Muestra la mortalidad larvaria valorado por motilidad en tratamiento con ET-18-OCH₃ (edelfosina) y ET-18-OH (análogo inactivo).
25

FIG. 2. Muestra la mortalidad larvaria valorado por motilidad. Motilidad de larvas L3 de *S. venezuelensis* expuestas a edelfosina.

FIG. 3. Muestra larvas L3 de *S. venezuelensis* tratadas con el donador de óxido nítrico DETA (100 g/ml) analizadas por el método TUNEL.
30

Fluorescencia roja del ADN de las células del parásito (A). Fluorescencia verde del los núcleos apoptóticos mediante microscopia confocal (B). Larva vista con microscopia óptica (C). Superposición de la fluorescencia roja y verde sobre la larva (D).

5

FIG. 4. Muestra ratones BALB/c infectados con larvas tratadas con edelfosina.

C: Cantidad de huevos por gramo de heces.

10 T post-infec: Días después de la infección de dichos ratones por las larvas tratadas con 2,5; 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de edelfosina.

ET-18OCH3: Edelfosina.

15 **FIG. 5. Muestra ratones BALB/c infectados con larvas tratadas con edelfosina e ivermectina.**

C: Cantidad de huevos por gramo de heces.

T post-infec: Días después de la infección de dichos ratones por las larvas tratadas con 0,1; 0,5; 1 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de edelfosina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de ivermectina.

20 ET-18OCH3: Edelfosina.

Iver: Ivermectina.

25 **FIG. 6. Muestra ratones BALB/c infectados con 100 L3 de *S. venezuelensis* y tratados vía oral.**

C: Cantidad de huevos por gramo de heces.

T post-infec: Días después de la infección de dichos ratones por las larvas tratadas con 1; 2,5; 5 y 10 $\mu\text{g/g}$ de peso vivo (PV) de edelfosina y, 5 y 10 $\mu\text{g/g}$ PV de ivermectina.

30 ET-18OCH3: Edelfosina.

Iver: Ivermectina.

FIG. 7. Muestra la respuesta a los diferentes tratamientos al final del experimento.

En (A) se observan las medias de los parásitos adultos de *S. mansoni* recuperados por perfusión al final del ensayo y en (B) la media de los huevos por gramo de tejido, localizados en los granulomas del intestino.

TP: Medida del nº total de parásitos.

G1-NT: Grupo 1 no tratados.

Las barras horizontales representan la media de los datos: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

FIG. 8. Muestra el recuento de eosinófilos (A) y basófilos (B) a la octava semana del experimento.

15 Eosin: Eosinófilos.

Baso: Basófilos.

G1-NT: Grupo 1 no tratados.

Las columnas representan la media de los datos para cada grupo con su respectiva barra de error, los valores presentan diferencias estadísticas con * $p < 0.05$.

FIG. 9. Muestra los títulos de anticuerpos IgG2a, frente al antígeno somático de *S. mansoni* en los diferentes grupos experimentales durante la tercera semana post-infección (A; día 21) y octava semana post infección (B; día 56).

G1-NT: Grupo 1 no tratados.

Las columnas representan la medias de las densidades ópticas (D.O) de los grupos con su respectiva barra de error, los valores representan diferencias estadísticamente significativas con * $p < 0.05$.

FIG. 10. Muestra los análisis de los datos hematológicos de eosinófilos a lo largo de 8 semanas.

Eos: Eosinófilos.

5 PZQ: Plaziquantel.

EDLF: Edelfosina.

NT: No tratados.

Sem: Semana. Se muestran datos a la semana 0, 3, 5 y 8.

10 **FIG. 11. Muestra los análisis de los datos hematológicos de basófilos a lo largo de 8 semanas.**

Bas: Basófilos.

PZQ: Plaziquantel.

15 EDLF: Edelfosina.

NT: No tratados.

Sem: Semana. Se muestran datos a la semana 0, 3, 5 y 8.

20 **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente
25 invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Actividad antihelmíntica de edelfosina frente a Strongyloides.

1.1. Mantenimiento del ciclo biológico de *S. venezuelensis*.

5 Las larvas infectivas de tercer estadio (L3) de *S. venezuelensis*, se
obtuvieron a partir de la cepa que se mantiene en el Laboratorio de
Parasitología de la Facultad de Farmacia de La Universidad de Salamanca por
pases sucesivos en ratas wistar. El ciclo se realizó a partir de heces de
animales infectados se recuperan huevos de *S. venezuelensis*, para permitir el
10 desarrollo de estos a larvas de primero (L1), segundo (L2) y tercer estadio (L3).
Se mezclaron las heces con un sustrato inerte formado por vermiculita.,
posteriormente se recogían las L3 mediante la técnica de *Baermann* con
modificaciones. Esta técnica se fundamenta en el termo-hidrotropismo
característico de esta fase parasitaria. Se contarón las larvas 3 y se confirmó
15 que al menos el 80% tuvieran movilidad. Finalmente se ponían en una
concentración de 3.000 L3 en 0,5 ml de solución salina que eran inyectados por
vía subcutánea a ratas macho de 60-120 g.

**1.2. Establecimiento de un modelo de infección de *S. venezuelensis*
20 en ratones BALB/c.**

Se emplearon un total de 80 ratones BALB/c de 6 semanas, con pesos
entre 18-20 g. Los ratones fueron divididos en 8 grupos de 10 ratones. Uno de
los grupos se mantuvo sin infección y los 7 grupos restantes fueron infectados
25 subcutáneamente con dosis de 100, 500, 1.000, 3.000, 5.000, 10.000 y 30.000
L3 respectivamente. Para el seguimiento de las infecciones se determinó
diariamente el número de huevos en heces, Se extrajo de cada animal 1,5 ml
de sangre del plexo retro-ocular, 0,5 ml se depositaron en tubos de ensayo con
anticoagulante (EDTA), 1 ml fue dejado en reposo 4 horas, centrifugado a
30 7.000 *g*, durante 10 minutos a 4°C. El suero fue retirado, almacenado
congelado a -20°C, hasta su procesamiento. Se estudió el hemograma; número
de plaquetas, número de leucocitos totales y fórmula leucocitaria (neutrófilos,

linfocitos, eosinófilos, basófilos) utilizando un citómetro (Beckman: Coulter LH 750). En el suero se determinó alanina transaminasa GPT (EC 2.6.1.2), aspartato transaminasa GOT (EC 2.6.1.1), lactato deshidrogenasa LDH (EC 1.1.1.27), amilasa (EC 3.2.1.2), creatin-quinasa CK (EC 2.7.3.2), glucosa, utilizando un auto-analizador (Beckman: Synchron CX9). Las determinaciones fueron realizadas en los días 0, 1, 2, 5 y 20 después de la infección. Un animal de cada grupo fue sacrificado a las 6 horas, 1, 3, 5, 7, 14 y 20 días post-infección y se recogió piel, pulmón, corazón, hígado, intestino y cerebro. Posteriormente se realizaron cortes histológicos. También se recogieron larvas del pulmón y hembras del intestino (ver figura nueva insertada).

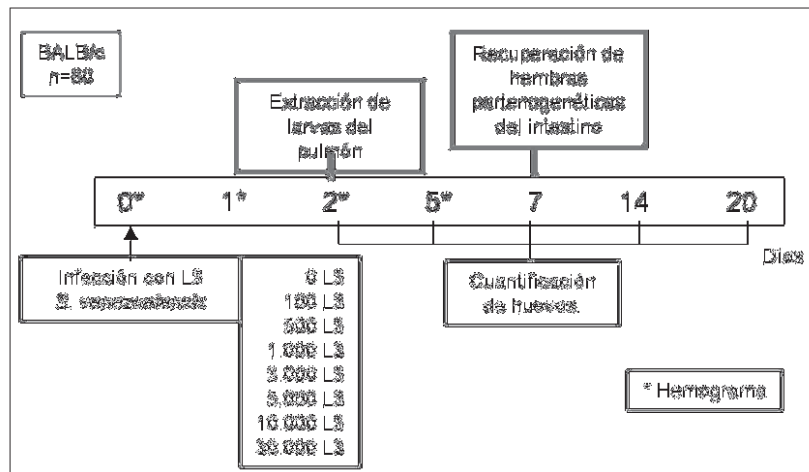


Diagrama 1. Desarrollo del modelo de estrogiloidosis en ratones BALB/c infectados con *S venezuelensis*.

15

1.3. Análisis estadísticos.

Los datos se expresaron como media y error estándar de la media. Para el análisis inferencial se estudió inicialmente la normalidad y homoscedasticidad de las muestras. En aquellos casos en los que las muestras tenían distribución normal y sus varianzas fueron similares, se emplearon en el

20

análisis pruebas paramétricas t de *Student* para comparar dos grupos o análisis de varianza (ANOVA) para comparar varios grupos. Cuando se obtuvieron diferencias entre grupos mediante ANOVA se aplicó la prueba post-ANOVA *Fisher PLSD*. Para los casos en los que la distribución no era normal se realizaron pruebas no paramétricas (*Wilconxon* y *Friedman*). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows.

1.4. Actividad in vitro frente a larvas de Strongyloides.

Se utilizaron cultivos de larvas de tercer estadio de *Strongyloides venezuelensis* cuyo ciclo biológico se mantienen en ratas Wistar mediante infecciones experimentales periódicas. Se emplearon dosis de edelfosina en un rango de entre 2,5-50 μg (FIG. 1). La viabilidad celular se midió mediante movilidad larvaria y fosfatasa alcalina. En la FIG. 2 se observan los resultados de inhibición con edelfosina, mostrando que con dosis de 10 μg existió una inhibición el 60% a los 30 minutos de exposición y de 80% a las 24 horas. Se utilizó como control negativo Et18OH (edelfosina inactiva), observándose que no se producía reducción significativa.

Posteriormente se evaluó el mecanismo de acción utilizado por edelfosina. Se realizó técnica de TUNEL con el fin de analizar su actividad proapoptótico. Los resultados mostraron que con las dosis efectivas de edelfosina en la inhibición e la motilidad se inducía apoptosis (FIG. 3).

1.5. Actividad ex vivo anti-Strongyloides.

Larvas de tercer estadio de *S. venezuelensis* fueron tratadas con dosis de edelfosina de 2,5; 5 y 10 μg y posteriormente inoculadas a ratones CD1. Se realizaron análisis coprológicos diarios para valorar el número de huevos por gramo de heces. Los resultados se muestran en la FIG. 4. Los ratones a los que se administró larvas del parásito sin tratar tenían una eliminación de

huevos que comenzó al 5^º día postinfección, con un pico máximo al 7^º día y una disminución al 14^º día postinfección. Ratones tratados con 2,5 µg de edelfosina presentaron una reducción del 78% en el número de huevos por gramo de heces, siendo del 100% durante toda la infección cuando se administraban larvas tratadas con 10 µg del fármaco.

Posteriormente se realizó un experimento en ratones BALB/c ampliando el rango de dosis utilizadas en el experimento anterior. Las respuestas inmunológicas en helmintos son diferentes dependiendo de las cepas de ratones utilizados. Los ratones BALB/c son ratones con predominio de respuestas Th2 y por tanto indicados para realizar experimentos de eficacia terapéutica. Se utilizaron larvas 3 de *S. venezuelensis* tratadas con dosis de 0,1; 0,5; 1; 2,5 y 20 µg de edelfosina. Tras 24 h. de cultivo se introdujeron en ratones BALB/c. Se utilizaron como controles negativo y positivo larvas sin tratar y larvas tratadas con 10 µg de ivermectina (fármaco de elección de la estrogiloidosis). Los resultados se reflejan en FIG. 5. A partir de 0,5 µg de edelfosina, las larvas tratadas y posteriormente administradas a ratones BALB/c presentaban 100% de reducción durante el experimento.

20 **1.6. Actividad in vivo anti-Strongyloides.**

Se utilizaron 7 grupos experimentales de ratones BALB/c para realizar los estudios in vivo. Grupo 1: ratones infectados con 110 L3 de *S. venezuelensis*; Grupos 2 y 3: Ratones infectados y tratados con ivermectina (5 y 10 µg). Grupos 4-7: Ratones infectados y tratados con edelfosina (dosis 1; 2,5; 5 y 10 µg). Se midieron diariamente los huevos excretados en heces como marcador de infección. Los resultados obtenidos con dosis de 1 µg de edelfosina mostraron reducciones del 100% a lo largo del experimento. Ratones tratados con ivermectina no mostraron reducción del 100% en número de huevos (FIG. 6).

Ejemplo 2.- Actividad antihelmíntica de edelfosina frente a *Schistosoma mansoni*. Actividad in vivo anti-*S. mansoni*.

La edelfosina (EDLF) fue suministrada por Apointech. La dosis utilizada a cada animal fue de 45mg/Kg vía oral. El Praziquantel (PZQ) se obtuvo al resuspender una tableta de Biltricide (Bayer Vital, 51368 Leverkusen) 600mg en un volumen 10ml de (líquido) al 2 % de Propilenglicol (200 µl) y se utilizó a dosis de 100 mg/Kg/día vía oral.

10 **2.1. Mantenimiento del Ciclo de vida del *S. mansoni*.**

La cepa de *S. mansoni* fue mantenida en laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular (CIETUS) a través de caracoles del género *Biomphalaria glabrata* como hospedador intermediario y ratones hembras CD1 (Edad: seis semanas) como hospedador definitivo. Los caracoles fueron mantenidos en acuarios de vidrio con capacidad de 20 litros y alimentados con lechuga en laboratorio. Ambiente controlado a temperaturas 26 a 28 °C y ciclos de 12 horas luz/oscuridad. El proceso de infección de los caracoles y la obtención de las cercarías se efectuó de acuerdo a Lewis et al. (Lewis et al., 1986. J Parasitol, 72(6): 813-29)

2.2. Infección en Ratones.

En este experimento se utilizaron cincuenta ratones hembras no consanguíneos CD1 procedentes de *Charles River* Laboratorios España (CRIFFA S.A., Barcelona). Los animales fueron mantenidos en condiciones de experimentación con ambiente y temperatura controlados, en ciclos de 12 horas luz/oscuridad, acceso libre al agua y alimento. Cuatro de los cinco grupos fueron infectados con ciento cincuenta cercarías de *S. mansoni*, cada uno de forma percutánea bajo inmovilización con una combinación de anestésico y sedante (Ketamina/Diazepam/Atropina(50/5/1/-mg/Kg)) vía i.p., para luego ser sujetos con cinta adhesiva y fijarles un cilindro plástico a nivel abdominal,

5 previamente afeitado, donde se depositan un volumen máximo de 0,5 ml de agua que contiene las ciento cincuenta cercarías. Los ratones son mantenidos en oscuridad por aproximadamente 45 minutos, tiempo estimado de penetración de las cercarías a través de la piel del ratón. El anterior procedimiento pretende homogenizar la infección en el grupo de ratones infectados.

10 El diseño experimental se puede observar de manera gráfica en el diagrama 1, donde se representan dos líneas de tiempo, la primera corresponde a parte del ciclo del *S. mansoni* en el modelo experimental y la segunda, los eventos de tratamiento y toma de muestras en las diferentes fases del ciclo. Las actividades del ensayo comienzan con la toma de muestra de sangre en los ratones tres días antes de la infección, posteriormente se suministra los diferentes tratamientos, con previa distribución de cinco grupo de ratones con 10 animales cada uno, así: No infectados no tratados o grupo control (Control), grupo infectados pero no tratados (G1-No tratados), grupo infectados tratados con PZQ (G2-PZQ), grupo infectados tratados con edelfosina (G3-EDLF), y grupo infectado tratados con la combinación PZQ más edelfosina suministrada en forma separada (G4-PZQ+EDLF).

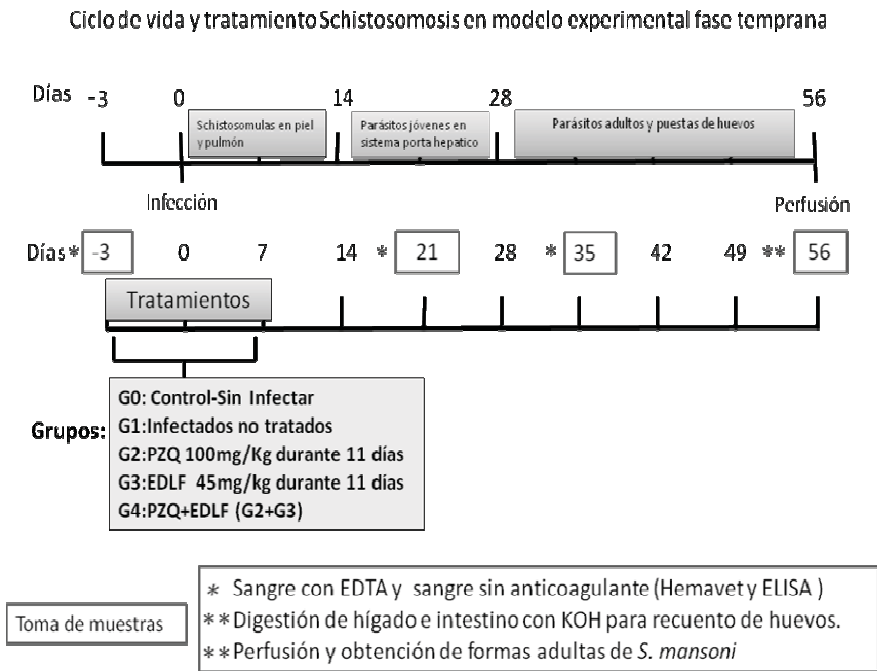


Diagrama 2. Representación del diseño experimental, con dos líneas de tiempo, la primera indicando los días en la fase del ciclo del parásito *S. mansoni* y la segunda donde se realizan los tratamientos y las tomas de muestras.

2.3. Técnicas parasitológicas.

Los animales fueron eutanasiados a las ocho semanas de experimentación (día 56), con pentobarbital sódico a una dosis 60mg/kg i.p, los datos parasitológicos como numero de parásitos obtenidos al realizar una incisión del músculo abdominal en el animal paralelamente a la línea alba, para despejar los órganos abdominales y lograr realizar la disección de la vena porta hepática efectuando un pequeño corte para facilitar la salida de los parásitos, posteriormente se realiza un corte a lado y lado el arco costal despejando la

caja torácica y dejando al descubierto el corazón por donde se inyecta en el ventrículo izquierdo con una jeringuilla (10 ml) una solución salina (0,85% NaCl, 1000 U.I. de heparina) y con este procedimiento se realiza la perfusión del hígado (Smithers y Terry, 1965. *Parasitology*, 55(4): 695-700), con el fin de
5 recuperar las formas adultas del parásito para su clasificación y conteo; otros datos a recopilar son los huevos por gramo de hígado e intestino en cámara de *Mac Master* previa disolución del tejido en KOH al 5% durante 6-24h a 37°C (Cheever, 1970. *Bull World Health Organ*, 43(4): 601-3), estas prácticas se
10 llevaron a cabo en el animalario de la universidad de Salamanca y en el laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular (CIETUS) de conformidad con la normativa de bienestar animal de la Unión Europea.

2.4. Técnicas hematológicas.

15 Los ratones fueron sangrados cuatro veces durante todo el experimento con un intervalo aproximado de cada tres semanas, labor realizada por personal calificado. Las muestras fueron recolectadas en tubos Vacutainer® (Cat. 367841) previamente etiquetados que contenían anticoagulante EDTA, homogenizando bien la sangre con el anticoagulante para evitar alteraciones
20 en los resultados por coagulación. Se transfirió un volumen mínimo de 20 µl en tubos *Eppendorf* (1,5 ml), para ser colocados en el soporte del equipo Hemavet® HV950 (*Drew Scientific Co. Limited, Barrow in Furness; England*) y realizar el análisis.

25 2.5. Técnica inmunológica de ELISA indirecto (*Indirect-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Para esta técnica se utilizó antígeno somático de *S. mansoni* (Ag-SO-Sm) el cual se obtuvo de tomar 20 parejas de parásitos adultos y se sometieron
30 a congelación en nitrógeno líquido para luego ser homogenizados en un macerador de cristal, adicionando 1ml de PBS pH 7,2 con cuatro inhibidores de proteasas: 1mM de EDTA (E6758, Sigma), 1 mM de PMSF (P7626, Sigma),

1µM de Pepstatin A (P5318, Sigma) y 0,1 mM de TPCK (T4376, Sigma). Todo fue centrifugado a 10.000 x g a 4 °C durante 30 min, para luego recoger el sobrenadante y realizar una electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% y cuantificar la cantidad de proteína obtenida por BCA. (Micro BCA TM Protein Assay Kit).

Con 100 µl del antígeno somático (Ag-SO-Sm) en tampón carbonato(pH 9,6) con una concentración de 5 µg/ml, se tapizaron cada pocillo de una placa de poliestireno de fondo plano, luego se incubó durante 24 horas a 4°C, se descartó el líquido de la placa y se hicieron tres lavados con 200 µl PBS-tween durante 4 min, se incorporó 100 µl por pocillo de una solución de leche descremada al 5% en PBS, se cubrió con papel de aluminio y se incubó (1 hora a 37 °C), se descartó el líquido de la placa y se hicieron tres lavados con 200 µl PBS-tween durante 4 min. Se diluyeron los sueros a 1:100 en PBS-tween y se dispensaron por duplicado (100 µl/pocillo), se cubrió la placa con papel de aluminio y se incubó (1 hora a 37 °C). Se descartó el líquido de la placa y se hicieron tres lavados con 200 µl PBS-tween durante 4 min, se añadieron 100 µl en cada pocillo de la anti-inmunoglobulina como anticuerpo secundario a una dilución 1:1000, en PBS-tween al 5% de leche descremada. Para cada suero de cada ratón se evaluó una Anti-IgG total (A-5906, Sigma), anti-IgG1(5037, Nordic Immunology) y anti-IgG2a(5018, Nordic Immunology), se cubrió con papel de aluminio y se incubó (1 hora a 37°C). Se descartó el líquido de la placa y se hicieron tres lavados con 200 µl PBS-tween durante 4 min, se añadieron 100 µl de la solución de revelado que consta de 10 ml de tampón citrato (pH 5), 4 µl de H₂O₂ y 0.053 g de OPD (P1526, Sigma), se incubó en oscuridad durante 20 min. Se paró la reacción con 50 µl por pocillo de solución de H₂SO₄ 2N y se leyó la placa en un espectrofotómetro a 450 nm (Anthos 2020).

2.6. Análisis estadístico.

30

Los resultados se expresaron en medias ± errores estándar. Los datos fueron analizados en una dirección grupo por grupo en múltiples

comparaciones con la prueba U de *Mann Whitney*. Las diferencias entre los resultados de cada grupo se consideraron estadísticamente significativas cuando la $p < 0,05$ en la quinta versión del programa estadístico *Graphpad Prism*.

5

2.7. Resultados parasitológicos.

En los resultados obtenidos de la recuperación de vermes a las ocho semanas (56 días) de la infección, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo infectado no tratado (G1-Control) y la reducción de vermes en el grupo infectado y tratado con edelfosina (G3-EDLF), la combinación PZQ más edelfosina (G4- PZQ+EDLF) también presentó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en este parámetro cuando se comparó con los ratones del grupo infectado no tratado (G1-Control) y a su vez con el grupo infectado tratado con PZQ (G2-PZQ); datos representados en la FIG. 7A.

El recuento de huevos del parásito en tejidos de los animales infectado "huevos por gramo de tejido" (h.p.g), se llevó a cabo en hígado e intestino. El conteo de número de huevos en hígado entre los grupos infectados no presentó diferencias significativas en la reducción de vermes con respecto al grupo infectado no tratado (datos no mostrados); a diferencia de los intestinos donde se presentan diferencias estadísticamente significativas. El grupo tres infectado y tratado con EDLF (G3-EDLF) mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), comparado con el grupo uno infectado no tratado (G1-No tratado) y a su vez el grupo cuatro (G4-PZQ+EDLF) presentó diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$), comparándolo con los grupos uno (G1-No tratados) y el grupo dos infectado y tratado con PZQ (G2-PZQ), datos representados en la FIG. 2B.

2.8. Resultados hematológicos.

El análisis de los datos hematológicos recopila los resultados del hemograma. Los resultados de la serie roja: recuento de glóbulos rojos y hematocrito (HCT) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) cuando se compararon los grupos estudiados, al igual que la hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), dispersión en el tamaño de eritrocitos (RDW) y de plaquetas (PLT).

10

En la línea celular de glóbulos blancos, los resultados del conteo de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos no presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los diferentes grupo infectados, mientras que los resultados de conteo de # Eosinófilos $10^3/\mu\text{L}$ (Eos) (FIG. 10) y de # Basófilos $10^3/\mu\text{L}$ (Bas) (FIG. 11), se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al realizar comparaciones entre los grupos de ratones infectados. Los resultados se expresaron de forma gráfica en columnas y las barras de error representan el error estándar de la media.

15

2.9. Resultados inmunológicos- ELISA.

Los resultados de la respuesta humoral contra antígenos somáticos de *S. mansoni*, de tipo IgG2a, comparando los grupos infectados G1 y G2 con respecto al grupo (G3-EDLF) presentaron diferencias estadísticamente significativas. Frente a la IgG1 y IgG total no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados.

20

Conclusiones del ejemplo 2

La edelfosina presenta un efecto positivo en el tratamiento temprano de la schistosomosis en el modelo experimental de ratón, donde se logra reducir la carga parasitaria de los grupos tratados con edelfosina y la combinación con

25

30

Praziquantel de manera estadísticamente significativa comparada con el grupo infectado no tratado (FIG. 7), esta reducción se ve reflejada en la disminución de formas adultas de *S. mansoni* al final del experimento como consecuencia de la muerte temprana de la fase inmadura del parásito (esquistosómula) y la
5 disminución en la producción de huevos a nivel intestinal, lugar donde finalmente se aloja la forma adulta del parásito.

La respuesta celular ante el tratamiento con edelfosina provocó una disminución en dos grupos de las células (eosinófilos y basófilos),
10 estadísticamente significativa, en la octava semana post infección (56 días), contrario a lo que se presenta de forma natural (FIG. 8), por el grupo infectado no tratado (G1-No tratado) donde se observa eosinofilia y basofilia; en este proceso y ante un constante estímulo antigénico provocado por el parásito y la producción de huevos, se favorece la proliferación celular hacia una respuesta
15 exacerbada y formación de granulomas, ocasionando daño funcional en diferentes órganos como el hígado, bazo e intestinos, a diferencia del efecto que ocasiona el tratamiento con edelfosina donde no se presentó una eosinofilia y basofilia. Esto hace pensar que se deba a la disminución temprana de la carga parasitaria. Lo anterior se puede también argumentar de forma
20 inmunológica a través de la disminución de los títulos de anticuerpos IgG2a frente antígeno somático de *S. mansoni* (Ag.SO-Sm) en los grupos tratados con (EDLF) comparados con los grupos infectado no tratado (G1-No tratado) y el grupo infectado tratado con PZQ (G2-PZQ), esto se interpreta como una baja respuesta Th1, ante la poca presencia de esquistosomas (Cardoso, Macedo
25 et al. 2008. PLoS Negl Trop Dis, 2(10): e308) en la primera fase de la schistosomosis, en los grupos tratados con (EDLF).

Por tanto se demuestra que un compuesto como la edelfosina podría resultar un tratamiento complementario en la equistosomosis, en combinación
30 con el tratamiento actual (PZQ), que representa el beneficio de poder tener mayor cubrimiento del control de la enfermedad con un tratamiento complementario o combinado que cubra en lo posible todo el ciclo y formas del

parásito en el huésped definitivo. Este hallazgo podría aportar mucho en las áreas de mayor transmisión como un tratamiento profiláctico y/o combinación de moléculas que presenten sinergismo o que puedan ser combinadas con el mismo en una composición farmacéutica. Dada la preocupación de depender
5 de un solo medicamento para tratar a más de 200 millones de personas y riesgo eminente de crear resistencia a PZQ por el uso masivo en campañas sanitarias; la edelfosina se presenta en este trabajo como un compuesto con gran potencial farmacéutico para dar solución complementaria a esta enfermedad.

10

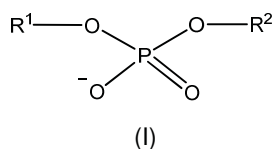
En resumen:

- 1 La edelfosina actúa en la fase temprana de la esquistosomosis y con su efecto ayuda a disminuir la carga parasitaria.
2. La combinación de Praziquantel más edelfosina también ocasiona un efecto
15 positivo en el tratamiento de la esquistosomosis durante la fase temprana de la enfermedad.
3. El tratamiento instaurado en forma profiláctica con edelfosina para la esquistosomosis influye en la disminución de eosinófilos y basófilos por efecto temprano en la reducción de la carga parasitaria.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos farmacéuticamente aceptables,

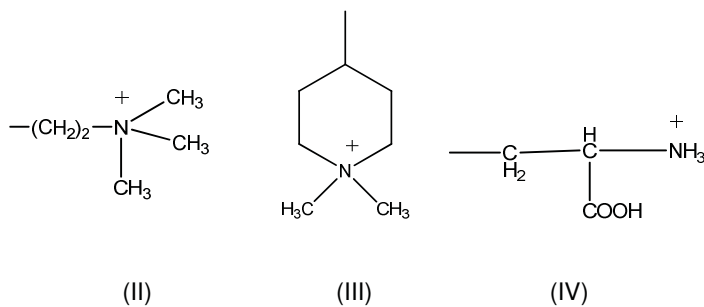
5



- Donde: R¹ se selecciona entre un alquilo (C₁₄-C₃₀), un alquenilo (C₁₄-C₃₀), un alquinilo (C₁₄-C₃₀) o un grupo -CH₂-CH(OR³)-CH₂-O-R⁴; R³ es un alquilo (C₁-C₈), R⁴ se selecciona entre un alquilo (C₁₂-C₃₀), un alquenilo (C₁₂-C₃₀), un alquinilo (C₁₂-C₃₀):

10

R² se selecciona entre un grupo de fórmula (II), (III) ó (IV):



15

- para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de helmintiasis.

20

2. Uso según la reivindicación 1, donde R¹ es un alquilo (C₁₄-C₂₀).

3. Uso según la reivindicación 2, donde R¹ es un alquilo (C₁₆-C₁₈).

4. Uso según la reivindicación 1, donde R¹ es un grupo -CH₂-CH(OR³)-CH₂-O-R⁴.
- 5
5. Uso según la reivindicación 4, donde R³ es un alquilo (C₁-C₃).
6. Uso según la reivindicación 5, donde R³ es un metilo.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, donde R⁴ es un alquilo (C₁₄-C₂₀).
- 10
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde R² es un grupo de fórmula (II).
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R² es un grupo de fórmula (III).
- 15
10. Uso según la reivindicación 1, donde dicho compuesto se selecciona entre miltefosina, edelfosina o perifosina.
- 20
11. Uso del compuesto según la reivindicación 10, donde dicho compuesto es edelfosina.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de esquistosomiasis, producida por al menos un platelminto parásito del género *Schistosoma*.
- 25
13. Uso según la reivindicación 12, donde la esquistosomiasis está producida por al menos un platelminto parásito del género *Schistosoma* en una fase temprana inmadura.
- 30

14. Uso según la reivindicación 13, donde la fase temprana inmadura es esquistosómula.
- 5 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde el platelminto parásito del género *Schistosoma* se selecciona de la lista que comprende *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum* o *Schistosoma mekongi*.
- 10 16. Uso según la reivindicación 15, donde el platelminto parásito del género *Schistosoma* es *Schistosoma mansoni*.
- 15 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de estrongiloidiasis, producida por al menos un nemátodo parásito del género *Strongyloides*.
- 20 18. Uso según la reivindicación 17, donde el nemátodo parásito del género *Strongyloides* se selecciona de la lista que comprende *Strongyloides venezuelensis*, *Strongyloides stercoralis* o *Strongyloides fuelleborni*.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde el medicamento además comprende al menos otra sustancia activa.
- 25 20. Uso según la reivindicación 19, donde la sustancia activa es un agente antiparasitario.
21. Uso según la reivindicación 20, donde el agente antiparasitario es un agente antihelmíntico.

22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde el medicamento además comprende praziquantel, o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos farmacéuticamente aceptables.
- 5 23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, donde el medicamento además comprende ivermectina, o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos farmacéuticamente aceptables.
24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde el medicamento además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacéuticamente aceptables.
- 10
25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración por vía oral.
- 15

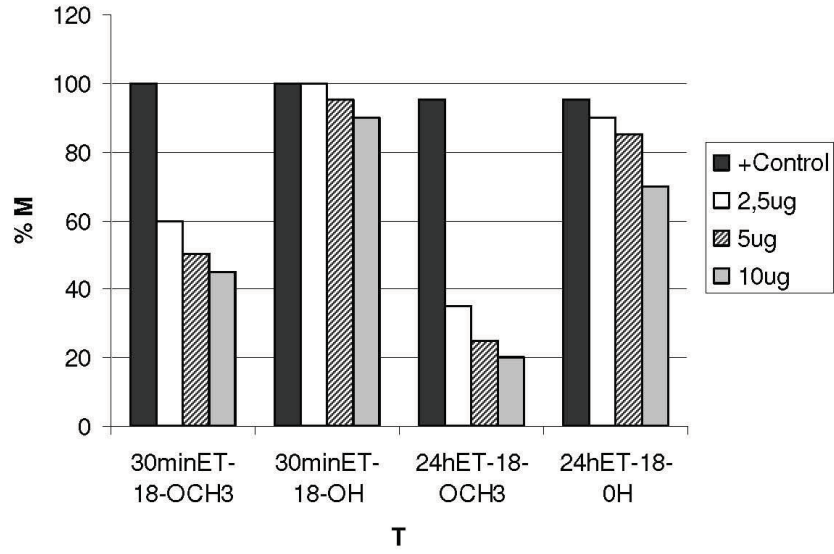


FIG. 1

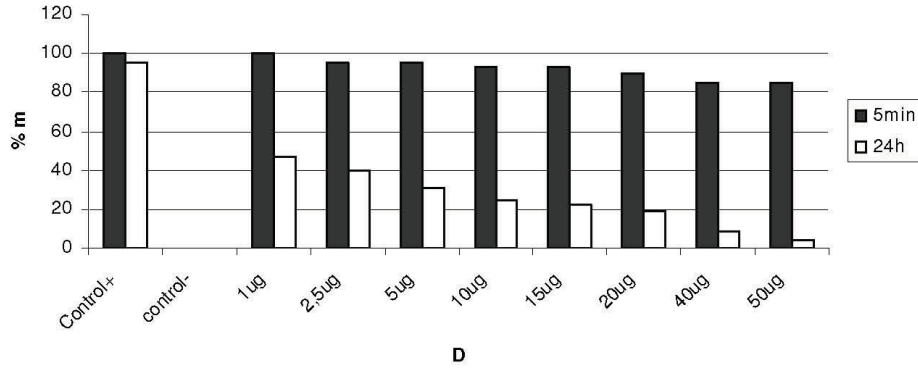


FIG. 2

ES 2 378 812 B1

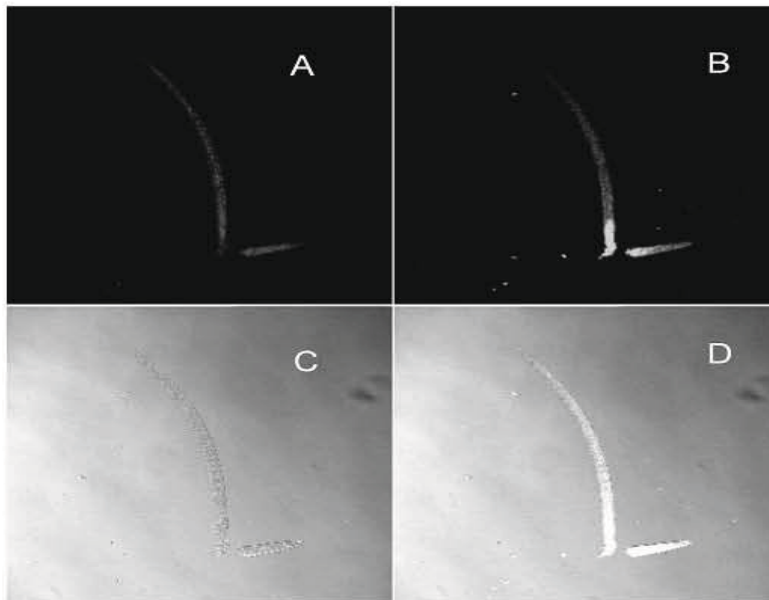


FIG. 3

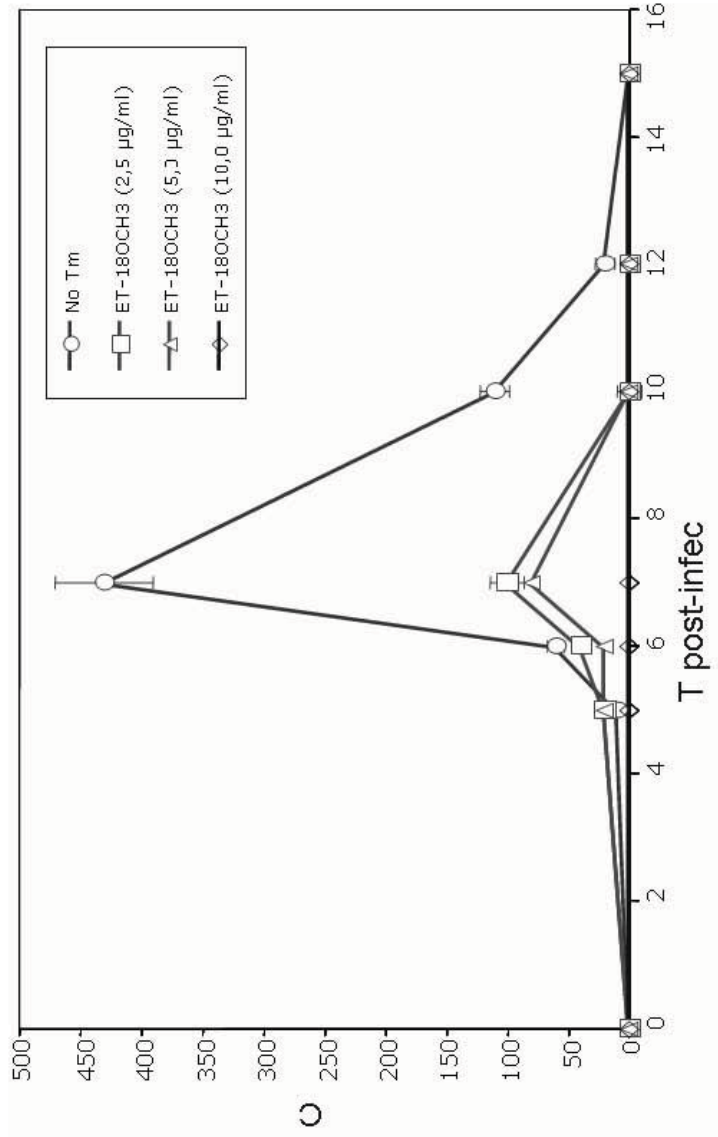


FIG. 4

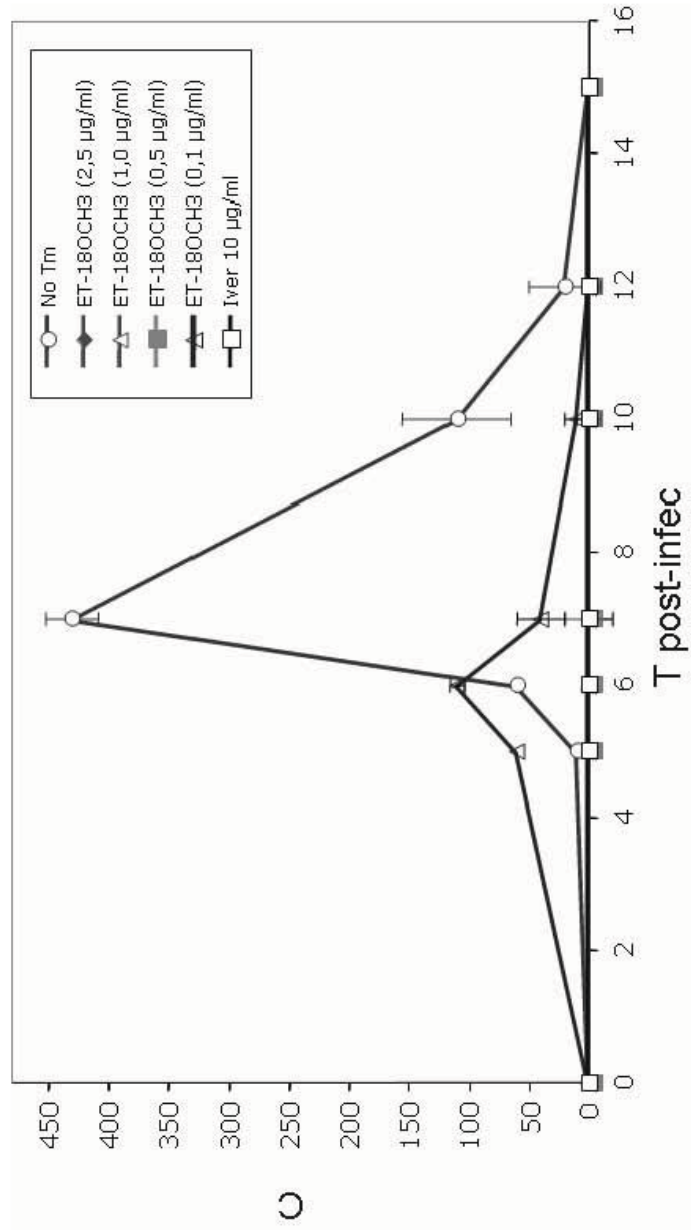


FIG. 5

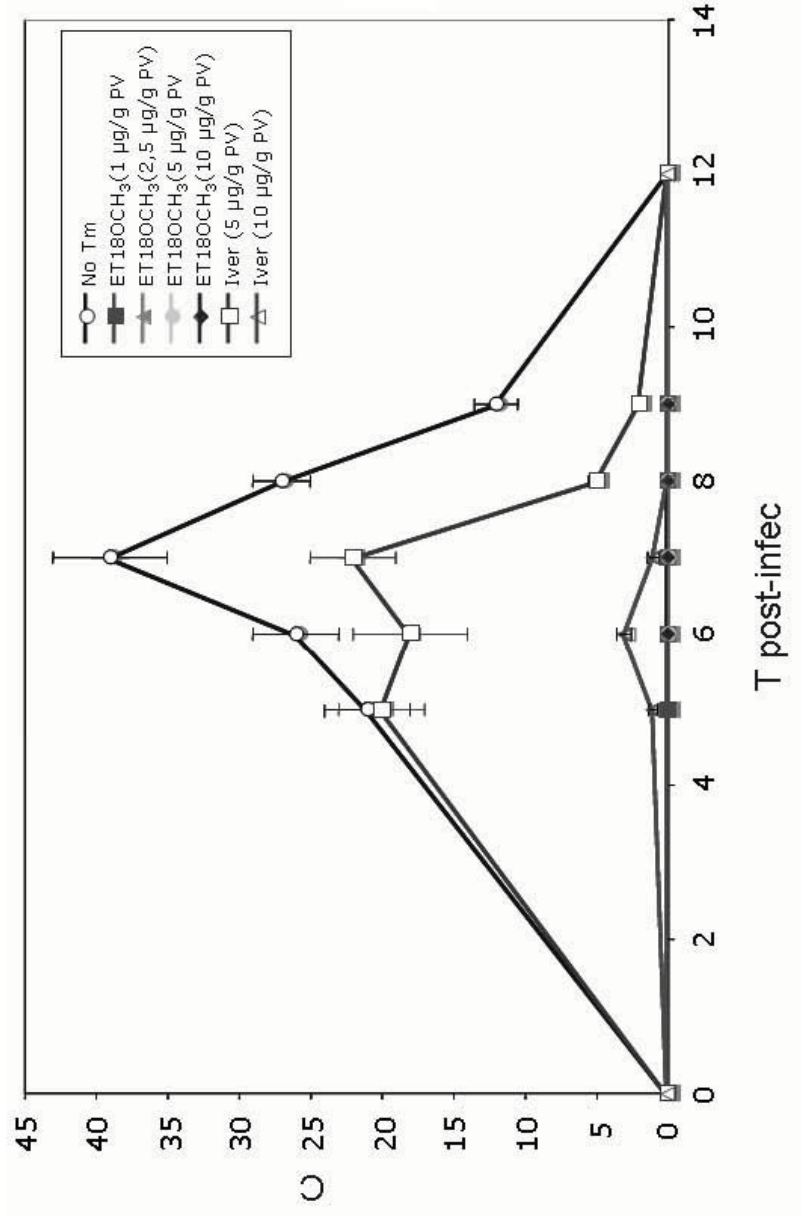


FIG. 6

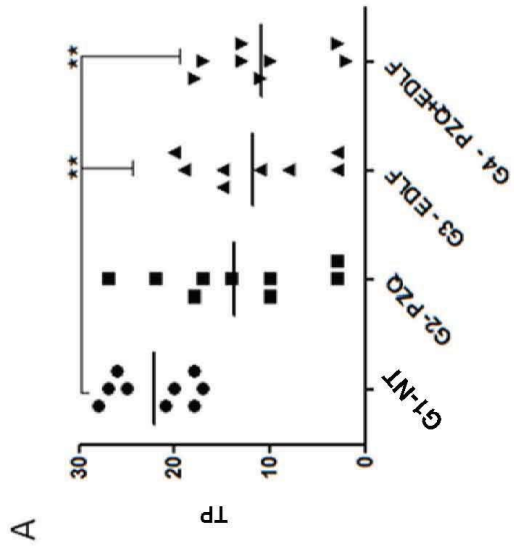
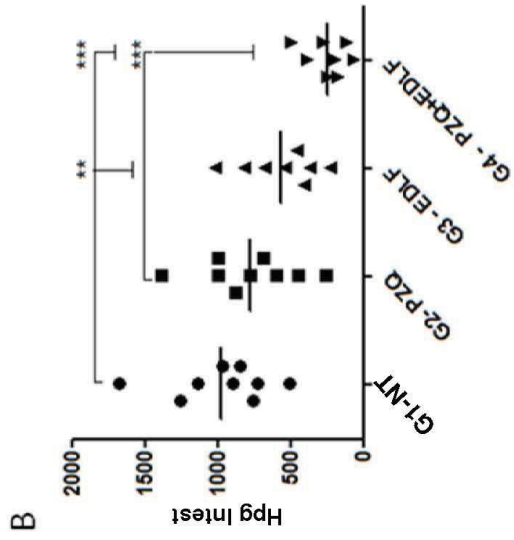


FIG. 7

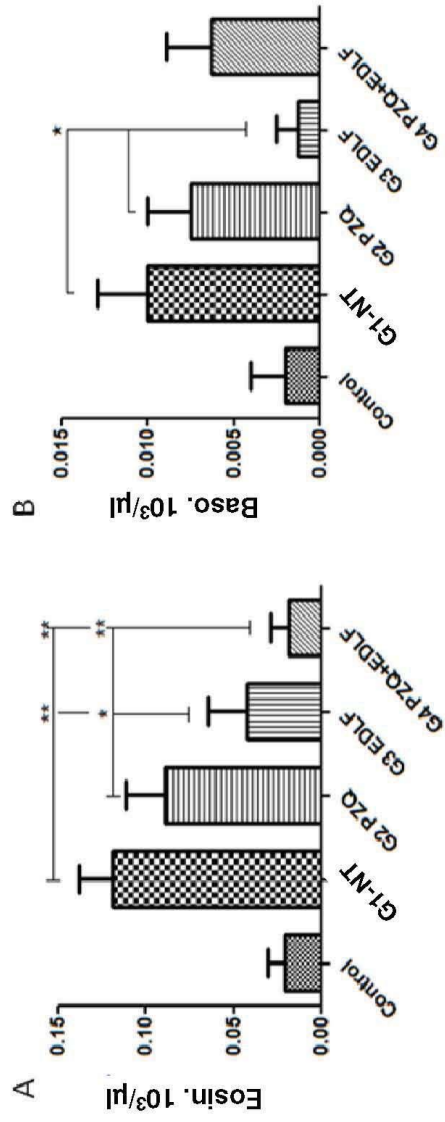


FIG. 8

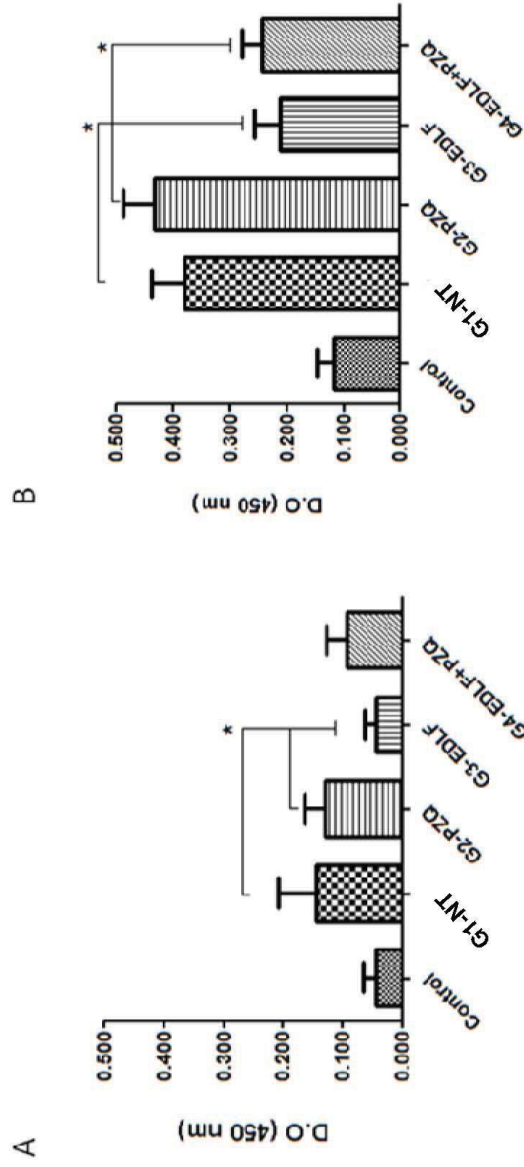


FIG. 9

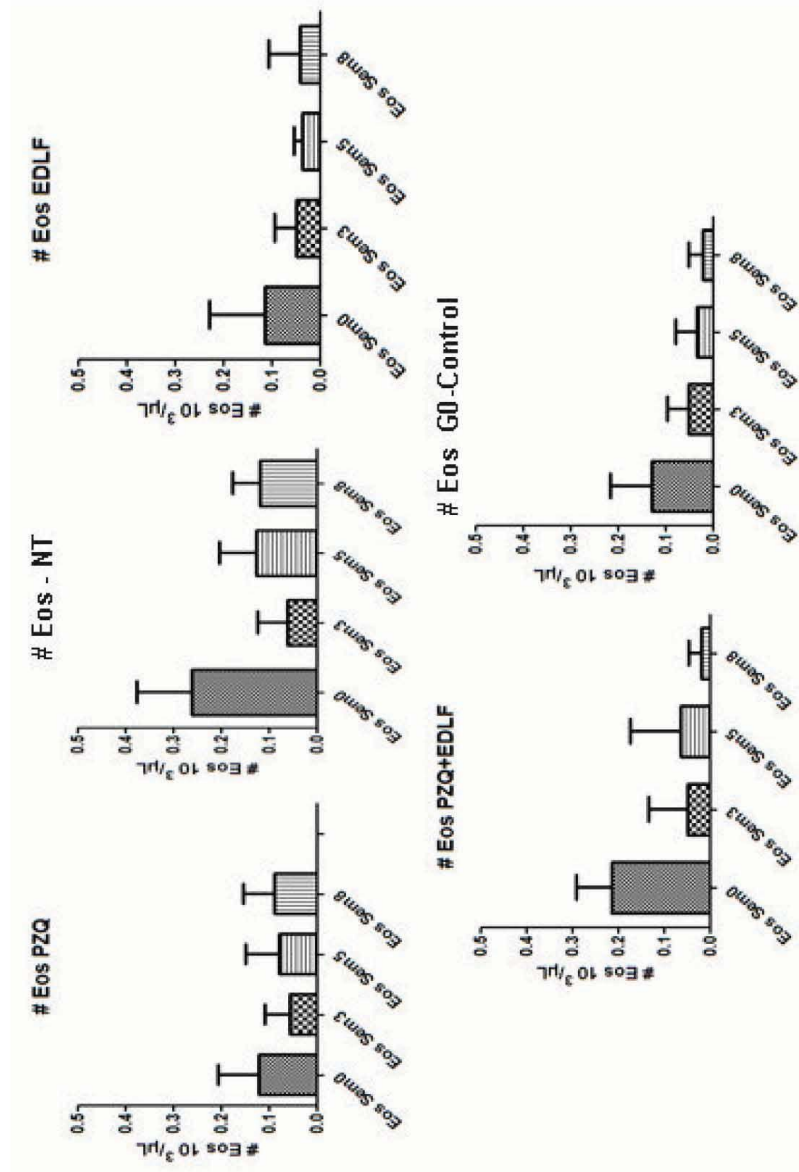


FIG. 10

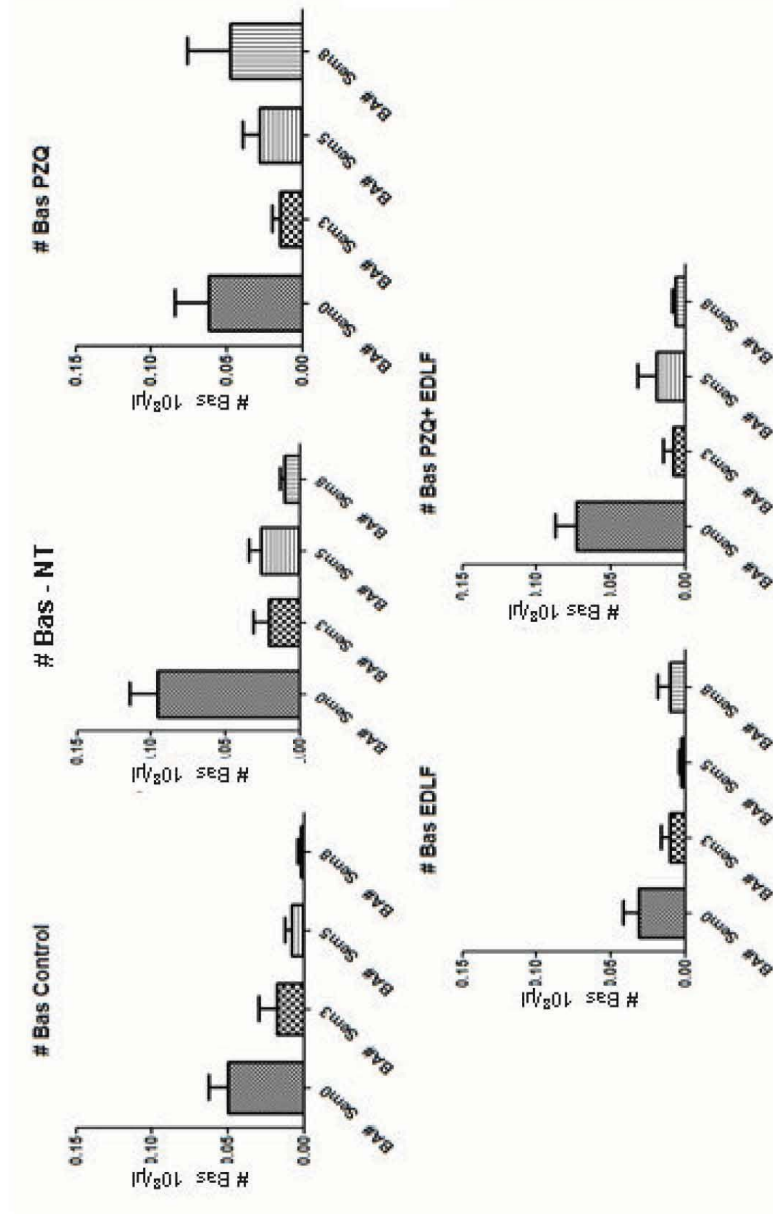


FIG. 11



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031387

22 Fecha de presentación de la solicitud: 16.09.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	NIETO-MIGUEL, T. y col. Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of Edelfosine in solid tumor cells. Cancer Research. 2007, Vol. 67, páginas 10368- 10378. Todo el documento.	1-25
A	ANDER ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA y col. Antitumor Alkyl Ether Lipid Edelfosine: Tissue Distribution and Pharmacokinetic Behavior in Healthy and Tumor-Bearing Immunosuppressed Mice. Clinical Cancer Research. 2009, Vol. 15, Nº 3, páginas 858-864. Todo el documento.	1-25
A	AZZOUZ, S. y col. Leishmanicidal activity of Edelfosine, Mitelfosine and Ilmofofosine. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2005, Vol. 96, Nº 1, páginas 60-65. Todo el documento.	1-25
A	FAGHIRI, Z. & SKELLY, P.J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, Schistosoma mansoni, in osmoregulation and drug uptake. The FASEB Journal 2009, Vol. 23, Nº 8, páginas 2780–2789.	1-25
<p>Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica</p> <p>O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p>El presente informe ha sido realizado <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p>		
<p>Fecha de realización del informe 14.07.2011</p>	<p>Examinador E. Albarrán Gómez</p>	<p>Página 1/4</p>

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/685 (2006.01)

A61P33/10 (2006.01)

A61P33/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones 1-25
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-25
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	NIETO-MIGUEL, T. y col. Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of Edelfosine in solid tumor cells. <i>Cancer Research</i> . 2007, Vol. 67, páginas 10368- 10378. Todo el documento.	
D02	ANDER ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA y col. Antitumor Alkyl Ether Lipid Edelfosine: Tissue Distribution and Pharmacokinetic Behavior in Healthy and Tumor-Bearing Immunosuppressed Mice. <i>Clinical Cancer Research</i> . 2009, Vol. 15, Nº 3, páginas 858-864. Todo el documento.	
D03	AZZOUZ, S. y col. Leishmanicidal activity of Edelfosine, Miltefosine and Ilmofosine. <i>Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology</i> . 2005, Vol. 96, Nº 1, páginas 60-65. Todo el documento.	
D04	FAGHIRI, Z. & SKELLY, P.J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, <i>Schistosoma mansoni</i> , in osmoregulation and drug uptake. <i>The FASEB Journal</i> 2009, Vol. 23, Nº 8, páginas 2780–2789.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto el uso de un compuesto de fórmula general (I), en concreto del compuesto conocido como Edelfosina para la prevención y/o tratamiento de las helmintiasis, esquistosomiasis y/o estrogiloidiasis.

La descripción de la presente solicitud solo aporta datos experimentales que avalan la actividad de Edelfosina contra *Schistosoma* y *Strongyloides*. No se incluyen datos experimentales para los compuestos Miltefosina y Perifosina que apoyen su actividad antihelmíntica.

El documento D01 describe la acción antitumoral de la Edelfosina en tumores sólidos y su posible mecanismo de acción que implica la activación de la apoptosis a través del retículo endoplasmático.

El documento D02 analiza la distribución tisular y el comportamiento farmacocinético de la Edelfosina en ratones sanos, inmunodeficientes e inmunodeficientes con tumores.

En el documento D03 describe la actividad contra Leishmania de Edelfosina, Miltefosina e Ilmofosina.

El documento D04 se refiere al papel de la proteína tegumental de *Schistosoma mansoni* aquaporin en la osmoregulación y en la penetración de drogas.

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el uso de Edelfosina para la prevención y/o tratamiento de las helmintiasis, esquistosomiasis y/o estrogiloidiasis.

Por lo tanto se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1 a 25 de la presente solicitud tiene novedad e implica actividad inventiva (Art.6.1 y 8.1. LP 11/1986).

IV

CAPÍTULO

CONCLUSIONES

IV.1 CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados indican que la edelfosina es el análogo alquilfosfolípido más potente de los probados en este estudio, ya que es capaz de inducir *in vitro* tanto la muerte de esquistosómulas como de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Este efecto es consecuencia de la permeabilización de la membrana celular y del daño estructural del tegumento, a través de un proceso con características similares a la apoptosis.
2. La combinación de praziquantel y edelfosina es útil para la profilaxis de la esquistosomosis ya que mata las formas inmaduras de *Schistosoma mansoni*, modula la respuesta inmune de ratones infectados y reduce significativamente tanto el número de parásitos adultos como el tamaño de los granulomas hepáticos.
3. La edelfosina es una alternativa terapéutica al tratamiento con praziquantel en la fase crónica de la esquistosomosis ya que disminuye significativamente tanto la carga parasitaria como la producción de huevos.

ADENDUM

GEOHELMINTOSIS

**Infecciones difícilmente
transmisibles VI:
Geohelminosis**

Edward Yepes Victoria;
M^a Teresa Moreiro Barroso;
Pérez Arellanos, JL;
Antonio Muro.

*En: Manual de Enfermedades
Importadas. Capítulo 44, 2012.
pp 503-511. Ed. Elsevier España.*

Infecciones difícilmente transmisibles VI: Geohelmintosis

Edward Yepes Victoria, M.^a Teresa Moreiro Barroso,
José Luis Pérez-Arellano y Antonio Muro Álvarez

ÍNDICE DE CAPÍTULO

INTRODUCCIÓN
AGENTES CAUSALES Y CICLOS BIOLÓGICOS
EPIDEMIOLOGÍA
MECANISMOS PATOGENÉTICOS
Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

DIAGNÓSTICO
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las geohelmintosis son las parasitosis más prevalentes. Su denominación deriva de la palabra griega «*Gea*» o «*Gaya*», que significa suelo o tierra, lugar donde los parásitos adquieren su capacidad infectiva. Pertenecen a la clase Nematoda y sus especies más importantes son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Strongyloides* spp. Estas parasitosis están asociadas a la pobreza, especialmente a la falta de higiene ambiental (inadecuado manejo o eliminación de materia fecal) y a la falta de acceso a los servicios de salud. En las zonas endémicas afectan a toda la población general, aunque tienen un mayor impacto en niños menores de 15 años, constituyendo una de las causas más importantes de retraso en el crecimiento y en el desarrollo intelectual.

AGENTES CAUSALES Y CICLOS BIOLÓGICOS

Ascariosis, tricurosos y uncinariosis presentan ciclos biológicos similares, pero no iguales. Todos los parásitos señalados tienen fases adultas con morfología cilíndrica, sin segmentación corporal, con una capa externa denominada cutícula, una capa muscular y una cavidad celómica o

pseudocele. Entre la cutícula y la capa muscular se encuentra la hipodermis. Además, una lámina basal separa la hipodermis del pseudocele. La cavidad celómica incluye el tubo digestivo, sistema excretor, nervioso y reproductor con sexos separados. Las hembras producen huevos que eclosionan dentro del hospedador o en el medio ambiente, de los cuales emerge una larva que pasa por cuatro fases hasta llegar a la fase de adulto.

Ascaris lumbricoides es el nematodo intestinal de mayor tamaño (*round worm*). La hembra adulta mide de 20 a 30 cm de longitud y entre 3-6 cm de diámetro; los machos son de menor tamaño. La vida media de los parásitos adultos es hasta de un año y cuando mueren se eliminan espontáneamente. Residen en la luz del intestino delgado (principalmente en yeyuno) y, aunque no tienen órganos de fijación, se mantienen adheridos a las paredes del intestino evitando ser arrastrados por el peristaltismo intestinal gracias a la capa muscular que tienen debajo de la cutícula. La hembra grávida elimina al exterior los huevos inmaduros. Se calcula que una hembra puede contener 27 millones de huevos, con una oviposición entre 200.000 a 240.000 huevos por día. Los huevos maduran en el medio externo en un período de seis semanas y, en condiciones ambientales favorables (temperaturas entre 15 y 30 °C), tienen forma oval o redondeada, miden entre 70 × 30 mm y poseen una cubierta

mamelonada. El mecanismo de transmisión es la ingestión de los huevos embrionados ¹⁶, que eclosionan en el intestino delgado emergiendo una larva de pequeño tamaño (250 µm de diámetro) que atraviesa la pared intestinal y emigra por el sistema venoso hasta llegar, inicialmente, al corazón derecho y, después, a la circulación pulmonar. Desde los capilares pulmonares, atraviesan la pared accediendo al alvéolo, donde permanecen varios días mientras hacen dos mudas y aumentan de tamaño. Posteriormente, las larvas inician una emigración ascendente por las vías respiratorias pasando por la tráquea, la epiglotis y la faringe, siendo deglutidas para llegar de nuevo al intestino delgado, en donde continúa su crecimiento hasta su fase adulta. El período comprendido desde la ingestión del huevo embrionado hasta que la hembra adulta tiene capacidad de poner huevos oscila entre 8 y 12 semanas.

Trichuris trichiura es un nematodo intestinal cuyo nombre procede del griego «*thrikhos*», que significa «pelo». El gusano adulto mide de 3 a 5 cm y el tercio posterior es más grueso que los dos tercios anteriores, simulando forma de látigo (*whipworm*). Se localizan en el intestino grueso, específicamente en túneles dentro del epitelio del colon. El ciclo biológico es directo ¹⁶, desarrollándose en el tubo digestivo del hospedador definitivo y en el medio externo. La hembra produce entre 7.000 y 20.000 huevos al día, los cuales son muy característicos y fáciles de identificar ¹⁷; miden aproximadamente 25 µm de ancho × 50 µm de largo, son de color café y tienen tapones en los dos extremos. Salen al exterior con las heces sin tener aún capacidad para infectar. Cuando se depositan en tierra húmeda, en condiciones adecuadas de temperatura (entre 14 y 30 °C), a las dos semanas, adquieren la capacidad de infección, pudiendo permanecer activos en el suelo durante varios meses o años. La infección se produce al ingerir huevos embrionados en el agua o con alimentos contaminados. Estos, una vez en el intestino delgado, liberan larvas que tienen un corto período de desarrollo y luego pasan al colon, en donde maduran y se enclavan por su parte delgada a la mucosa intestinal. El tiempo transcurrido entre la infección y la formación de parásitos adultos con capacidad de producir huevos puede ser de tres meses.

Existen más de 18 géneros de uncinarias (*hookworm*) que parasitan un amplio rango de mamíferos. Las dos principales uncinarias

que infectan al ser humano son *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*. Ambas pertenecen a la familia Ancylostomidae, son gusanos cilíndricos de 10 mm de longitud y poseen una cápsula bucal con órganos cortantes (que funcionan como órganos de fijación, lesionando la mucosa intestinal induciendo pérdidas de sangre). Aunque las diferentes especies pueden distinguirse en su etapa adulta por su tamaño y morfología, sin embargo los huevos de las uncinarias son idénticos. Los gusanos adultos viven fijados a la mucosa del duodeno y del yeyuno principalmente. Las diferencias más llamativas entre las fases adultas de las dos especies son ¹⁸: *N. americanus* es más pequeño que *A. duodenale*, vive más tiempo (entre 4 y 20 años para *N. americanus*, y entre 5 y 7 años para el *A. duodenale*), produce menos huevos (10.000 huevos/día para *N. americanus* y hasta 25.000 huevos/día para *A. duodenale*) y succiona menos sangre (0,03 ml/día para *N. americanus* y hasta 0,20 ml/día para *A. duodenale*). Tras la cópula, las hembras grávidas depositan sus huevos en la luz del intestino. Cuando alcanzan el suelo y en condiciones óptimas de humedad y temperatura, los huevos se desarrollan liberando la larva de primer estadio o larva rhabditiforme (250-300 µm) entre las 24 y 48 h. Esta larva se alimenta de bacterias y desechos orgánicos hasta sufrir dos mudas, transformándose en larva de tercer estadio o larva filariforme (600 µm), la cual infecta al ser humano. Las larvas de *N. americanus* penetran exclusivamente por la piel, mientras que las de *A. duodenale*, además de penetrar por la piel, también pueden infectar por vía oral, en cuyo caso no tienen ciclo pulmonar y se localizan directamente en el intestino. En algunas ocasiones, las larvas de *Ancylostoma* acceden al tejido muscular o intestinal, donde permanecen en período latente reactivándose cuando encuentran condiciones favorables. Este fenómeno es conocido como hipobiosis. Las larvas filariformes presentan tigmotropismo, termotropismo y geotropismo negativo, por esta razón se adhieren a la piel cuando tienen oportunidad, para posteriormente penetrar en el tejido subcutáneo y finalmente, acceder a las vénulas superficiales desde donde son transportadas al corazón derecho y desde este a los pulmones. Después ascienden por el árbol bronquial, tráquea, laringe y por último, son deglutidas. Cuando llegan al intestino se transforman en L4 desarrollando una cápsula bucal temporal que les

Geohelmintosis

permite fijarse a la mucosa intestinal, aumentar de tamaño y alcanzar la diferenciación sexual, desarrollando una cápsula bucal definitiva. El período comprendido desde la infección hasta la oviposición de los gusanos adultos dura aproximadamente entre cinco y siete semanas.

La estrongiloidosis es una geohelmintosis causada principalmente por *Strongyloides stercoralis*, aunque se han descrito infecciones por *S. fuelleborni fuelleborni* en África y *S. fuelleborni kellyi* en Papúa Nueva Guinea. Posee un ciclo biológico muy peculiar ya que presenta dos formas de transmisión: heteroinfección y autoinfección.

1. Heteroinfección: El mecanismo habitual de transmisión entre humanos se produce de forma similar al de *A. duodenale*, mediante penetración transcutánea de larvas filariformes (550 mm), aunque en ocasiones excepcionales puede ocurrir la transmisión mediante ingestión de larvas filariformes. Estas larvas atraviesan el tejido celular subcutáneo accediendo a la circulación sanguínea, para llegar luego a las cavidades cardíacas derechas y pulmón. En el pulmón, atraviesan la barrera alvéolo-capilar y desde la región alveolar ascienden por el árbol bronquial hasta llegar a la tráquea, la laringe y la faringe, accediendo después al tubo digestivo. Cuando llegan al intestino delgado alcanzan su madurez sexual. Un dato característico en la biología de *Strongyloides* es la presencia única de hembras (2,2 mm) a nivel intestinal que se reproducen mediante partenogénesis. De esta manera, ponen sus huevos en la mucosa intestinal, eclosionan y liberan larvas rhabditiformes (250-300 mm). En el medio ambiente (suelo) las larvas rhabditiformes evolucionan de dos formas:
 - a) Pueden sufrir una transformación (en un máximo de dos semanas) en larvas filariformes, capaces de penetrar en un nuevo hospedador.
 - b) Pueden transformarse en adultos de vida libre, con posterior cópula, producción de huevos, eclosión y muda primero a larvas rhabditiformes y, posteriormente, a filariformes, que también serán capaces de infectar.
2. Autoinfección: Una característica biológica propia de *Strongyloides* spp es la posibilidad de transformación en el intestino grueso del

hospedador de larvas rhabditiformes en larvas filariformes. De esta manera, las larvas filariformes no tienen que salir al medio externo y pueden volver a penetrar a través de la mucosa intestinal y/o la piel perianal, produciendo autoinfección. En este proceso pueden intervenir factores locales como estreñimiento, divertículos o disminución de la motilidad intestinal o bien factores sistémicos como la administración de glucocorticoides o la infección por HTLV-1. Por el contrario, la infección por VIH o la administración de ciclosporina no son factores condicionantes de la autoinfección. Por último, debido a la autoinfección, se produce una reactivación del ciclo que puede dar lugar a una persistencia de la infección u originar un cuadro de hiperinfección con consecuencias fatales.

EPIDEMIOLOGÍA

Las geohelmintosis son helmintosis de distribución mundial con mayor prevalencia en áreas tropicales y subtropicales (fig. 44-1). Se calcula que existen más de 2.000 millones de personas infectadas (tabla 44-1). La más prevalente es la ascariosis (se estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada por *Ascaris lumbricoides*). Entre las uncinariosis, son más prevalentes las infecciones producidas por *N. americanus* que las de *A. duodenale*. Hay tres factores epidemiológicos importantes en estas parasitosis relacionados entre sí:

- La contaminación fecal del suelo (deficiente saneamiento ambiental).
- Las condiciones ambientales apropiadas para el desarrollo de huevos y larvas (tierra cálida, húmeda y sombría).
- El contacto de las personas con la tierra contaminada (directamente o a través de la ingestión de alimentos o agua contaminada).

Las geohelmintosis tienen diferente perfil atendiendo a la edad. Así, los niños son la población más afectada en la infección por *Ascaris* spp y *Trichuris* spp, con un pico máximo de infección a los 7 años. Sin embargo, las uncinariosis presentan una curva ascendente de infección desde los 0 hasta los 25 años, estabilizándose a partir de esa edad. El principal índice epidemiológico utilizado en las geohelmintosis es la

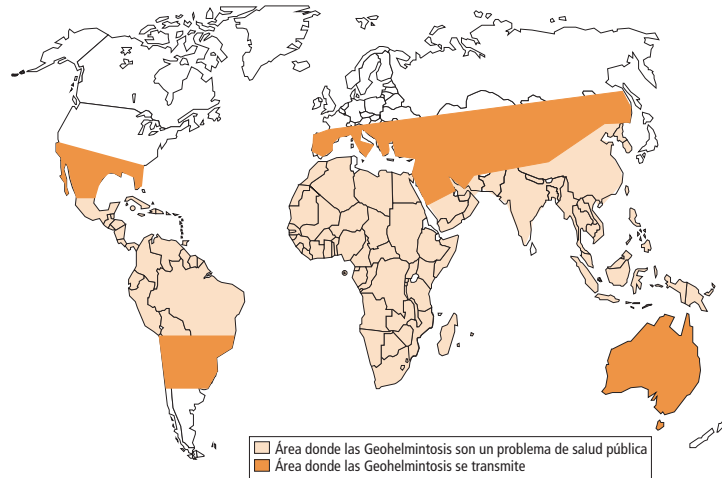


FIGURA 44-1 Distribución geográfica de geohelmintosis.

intensidad de la infección, ya que se relaciona directamente con la morbilidad (2). El grado de infección se mide por el número de huevos por gramo de heces, lo que permite inferir el número de gusanos adultos presentes en el intestino (carga parasitaria). En las zonas endémicas, la mayor parte de la carga parasitaria se concentra en algunos individuos (el 10% de la población infectada porta el 70% de los gusanos). Esta variabilidad en la distribución de la carga para-

sitaria entre individuos en condiciones similares de exposición al parásito sugiere la existencia de factores genéticos o inmunológicos. En el caso de *Strongyloides stercoralis*, la carga parasitaria no se correlaciona necesariamente con el tiempo de exposición. Esto se debe a que mediante el proceso de «autoinfección» se completa su ciclo biológico en el mismo individuo y se aumenta la carga parasitaria sin necesidad de una nueva reinfección. Esta característica explica cómo las

TABLA 44-1 Prevalencia y factores de riesgo en geohelmintosis		
Geohelmintos	Prevalencia	Factores de riesgo
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1,2 billones	Malos hábitos higiénicos y condiciones sanitarias insuficientes
<i>Trichuris trichiura</i>	795 millones	Malos hábitos higiénicos y condiciones sanitarias insuficientes
Uncinarias	740 millones	Malos hábitos higiénicos y condiciones sanitarias insuficientes Caminar descalzo
<i>Strongyloides stercoralis</i>	200 millones	Malos hábitos higiénicos y condiciones sanitarias insuficientes Caminar descalzo Enfermedades inmunosupresoras y/o tratamientos con corticoides

infecciones crónicas pueden perpetuarse durante décadas después de la exposición inicial. Esta consideración tiene especial importancia en el inmigrante que sufre una estrongiloidosis crónica a pesar de no haber regresado a zonas endémicas durante años. No detectar y tratar esta enfermedad puede tener consecuencias fatales en caso de iniciar un tratamiento inmunosupresor.

MECANISMOS PATOGENICOS Y MANIFESTACIONES CLINICAS

La mayoría de los pacientes con infección por estos nematodos van a permanecer asintomáticos durante años y la eosinofilia puede ser el único dato que indique que el paciente sufre una infección parasitaria. La gravedad de los cuadros puede variar desde formas leves a graves, pudiendo llegar a comprometer la vida del paciente (p. ej., estado de hiperinfección en la estrongiloidosis). Los factores que influyen en el curso de la enfermedad dependen tanto del parásito como del hospedador. Los principales factores relacionados con el parásito son:

- La intensidad de la infección, de tal forma que, en general presentan más síntomas los individuos que albergan mayor número de parásitos.
- La coexistencia con otras parasitosis, siendo frecuente la coinfección por más de una especie en un mismo individuo. Además, en muchas regiones de África subsahariana las geohelmintosis se solapan geográficamente con la malaria.
- *Los mecanismos de evasión* que permiten vivir al parásito en el hospedador durante largos periodos de tiempo. Los factores dependientes del hospedador son, entre otros, los siguientes:
 - El estado nutricional. Así, los niños y las mujeres en edad fértil son los más vulnerables a las pérdidas de sangre por tener menores depósitos de hierro y ser mayores los requerimientos de este oligoelemento. A su vez, la desnutrición y la carencia de hierro agravan la enfermedad en zonas endémicas.
 - La respuesta inmunológica desencadenada frente a estos parásitos es prioritariamente dirigida por los linfocitos Th2 con producción de citocinas como IL-4 e IL-5,

anticuerpos como IgE y células efectoras como eosinófilos o basófilos.

Los ciclos biológicos de estos parásitos, aunque tienen características similares, muestran diferencias que son importantes para comprender los mecanismos fisiopatológicos. De esta forma, algunas manifestaciones clínicas son comunes a todos ellos y otras son propias de cada geohelmintosis. En general, los mecanismos de expresión de enfermedad pueden encuadrarse en tres apartados:

1. *Migración larvaria precoz*: Las larvas atraviesan distintos tejidos del organismo. En su recorrido, según el número de larvas y la sensibilidad del hospedador, dan lugar a diferentes signos y síntomas. Así, las larvas filariformes de *A. duodenale*, *N. americanus* y *S. stercoralis* contactan con la piel, casi siempre en los espacios interdigitales de los pies o las manos, y la atraviesan pudiendo ocasionar dermatitis. Esta situación, excepcional en inmigrantes, y frecuente en viajeros (fig. 44-2A y B; v. cap. 28), y en el caso de las uncinarias recibe el nombre de «prurito del suelo» y consiste en una erupción pruriginosa que puede durar hasta dos semanas. Por otro lado, es muy característica en la infección crónica por *S. stercoralis* la denominada *larva currens*, una erupción serpiginosa y muy pruriginosa, que aparece y desaparece en horas, moviéndose a la velocidad de 10 cm/h y observada habitualmente en el tronco y nalgas ⁽²⁾.

Las lesiones ocasionadas por los parásitos en su emigración a través del pulmón y del árbol traqueobronquial pueden deberse a factores mecánicos y a una respuesta de hipersensibilidad del huésped. Las manifestaciones son inespecíficas e incluyen: fiebre, tos no productiva, hemoptisis, disnea, sibilancias e irritación faríngea. Debido a la respuesta de hipersensibilidad, puede observarse un infiltrado pulmonar inflamatorio asociado a eosinofilia en sangre periférica, lo que constituye el síndrome de Löfller (v. cap. 30 y ⁽²⁾). Algunos pacientes con infección crónica por *S. stercoralis* presentan episodios repetidos de fiebre y neumonitis que simulan cuadros recurrentes de neumonía bacteriana. Otra posible vía de infección reconocida de *A. duodenale* es la vía oral. Cuando esto ocurre,

la migración larvaria causa el denominado síndrome de Wakana, que se caracteriza por náuseas, vómitos, irritación faríngea, tos, disnea y ronquera.

2. Parasitismo intestinal: Solo cuando la intensidad de la infección es moderada o grave aparecen manifestaciones gastrointestinales. Las más comunes son anorexia, náuseas, vómitos, molestias epigástricas, diarrea y meteorismo. Otras manifestaciones son características de cada parasitosis.

a) Ascariosis: En el intestino delgado, los vermes adultos obtienen los nutrientes del contenido intestinal pero no aspiran sangre ni dañan significativamente la mucosa. Cuando el paciente presenta parasitosis masivas, estos parásitos de gran tamaño ocasionan obstrucción intestinal. Las formas más graves tienen lugar cuando la obstrucción

se localiza en áreas del tubo digestivo de escaso calibre como la vía biliar, el conducto pancreático o el apéndice vermicular ocasionando colangitis, abscesos hepáticos, pancreatitis y apendicitis. A diferencia de la obstrucción intestinal, más frecuente en niños, la obstrucción hepatobiliar y pancreática es más habitual en adultos. Por último, estos helmintos pueden aparecer por la boca o eliminarse por las heces (fig. 44-2C y D).

b) Tricuriasis: El parásito, al introducirse en la mucosa del intestino, habitualmente en la región ileocecal, origina una reacción inflamatoria y pequeñas pérdidas de sangre (estimada en 5 ml al día con una infección de 1.000 tricocéfalos). La afectación de los plexos nerviosos incrementa el peristaltismo dando lugar a diarrea, dolor de tipo

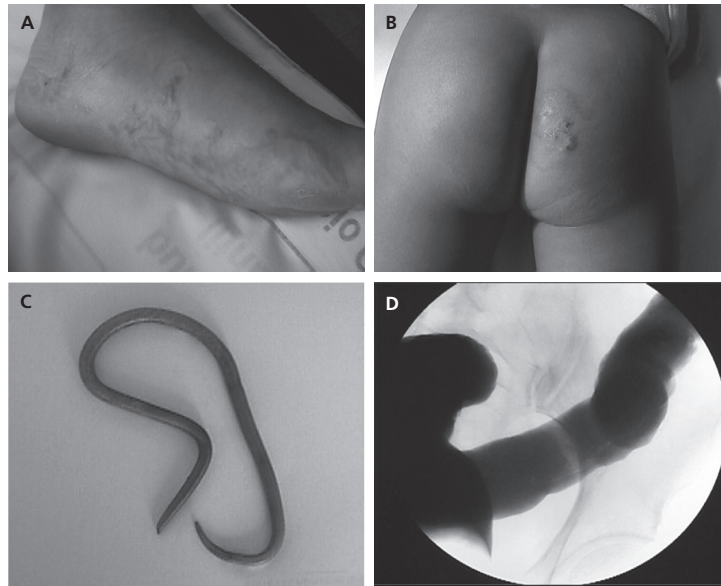


FIGURA 44-2 Clínica de la geohelmintosis. Larva *migrans* (A, B). Emisión de gusano por boca (C). Eliminación intestinal de *Ascaris lumbricoides* (D).

- cólico, tenesmo rectal y, en infecciones masivas, a un prolapso rectal que puede acompañarse de un cuadro de disentería.
- c) Uncinariosis: Como se ha señalado previamente, estos geohelminios poseen una cápsula bucal provista de dientes o láminas cortantes, con los cuales se adhieren a la mucosa del intestino causando pequeñas úlceras y hemorragias. La ruptura de los capilares ocurre por un efecto no solo mecánico, sino también químico mediado por la acción de enzimas hidrolíticas (tripsina que inhibe la agregación plaquetaria, quimiotripsina que actúa inhibiendo el factor X activado o elastasa que actúa inhibiendo el complejo factor VIIa/FT). Por otro lado, se calcula que cada gusano consume de 0,03 ml (*N. americanus*) a 0,05 ml (*A. duodenale*) de sangre al día. La pérdida continua de sangre y proteínas séricas puede originar al cabo de unos meses una anemia ferropénica, asociada a veces a hipoalbuminemia y edema.
- d) *Estrongiloidosis*: Las larvas, al atravesar la pared intestinal, provocan una respuesta inflamatoria con dolor epigástrico, diarrea intermitente o pérdida de peso. En fases crónicas, la fibrosis y la atrofia muscular convierten el duodeno y yeyuno en un tubo liso y rígido. En infecciones crónicas con una carga parasitaria elevada la enterocolitis crónica se manifiesta como un síndrome de malabsorción.
3. Otras manifestaciones: síndrome de hiperinfección por *S. stercoralis*: Esta complicación rara, pero grave, de la infección por *S. stercoralis* puede aparecer en las situaciones de inmunosupresión previamente mencionadas. La migración larvaria diseminada incluye órganos y tejidos que no son habituales en su ciclo biológico (p. ej., hígado, corazón, cerebro). Además de las manifestaciones intestinales y pulmonares comunes, aparecen las derivadas de la disfunción de los distintos órganos, en ocasiones, complicadas por un shock séptico. Generalmente, está ausente la eosinofilia debido a una infección bacteriana concomitante, o al tratamiento esteroideo. A pesar del tratamiento de soporte y antihelmíntico habitual, el pronóstico de esta entidad es grave, con una mortalidad que puede alcanzar el 70%.

DIAGNÓSTICO

El principal método diagnóstico de las geohelminiosis es el análisis coproparasitario directo y la detección de larvas de *Strongyloides* en heces y/o fluido duodenal. En el análisis coproparasitario directo se utilizan dos técnicas principales; Kato-Katz o Ritchie (sedimentación en la que se emplea formol, alcohol tamponado y éter etílico). Ambas técnicas son complementarias y, en trabajos de nuestro grupo, se ha constatado que la técnica de Kato-Katz es más sensible en el diagnóstico de ascariosis y tricurosis mientras que la de Ritchie es más sensible en el diagnóstico de uncinariosis. Los datos característicos de la fase de huevo se han descrito previamente (fig. 44-3). Las técnicas más utilizadas para la detección de larvas son las de concentración en formalina-éter y las de migración larvaria en medio líquido (técnica de Baermann, técnica de Harada-Mori) o sólido (cultivo en placas de agar enriquecido). Recientemente, se ha desarrollado una PCR a tiempo real para detectar *Strongyloides* en muestras de heces. También se emplean métodos inmunológicos basados en la detección de anticuerpos específicos frente a *Strongyloides*, utilizando extractos crudos procedentes de larvas filariformes. Esta prueba presenta una elevada sensibilidad pero también reactividad cruzada con otras infecciones producidas por helmintos (principalmente filarias, esquistosomas y otros geohelminios). Recientemente se ha desarrollado un sistema de inmunoprecipitación con luciferasa para la detección de IgG contra dos antígenos, uno recombinante denominado NIE y otro inmunorreactivo llamado SsIR, con especificidad del 100%.

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

El tratamiento individual se basa en eliminar los vermes adultos del tracto gastrointestinal. Los fármacos más empleados son dos benzimidazoles: albendazol y mebendazol. Una diferencia importante radica en que albendazol se absorbe mejor a nivel del tracto gastrointestinal y el principio derivado de su metabolismo hepático tiene un volumen de distribución tisular elevado; por esta razón, se emplea cuando existe migración larvaria a través de los tejidos (uncinariosis y ascariosis). En muchos pacientes, la infección

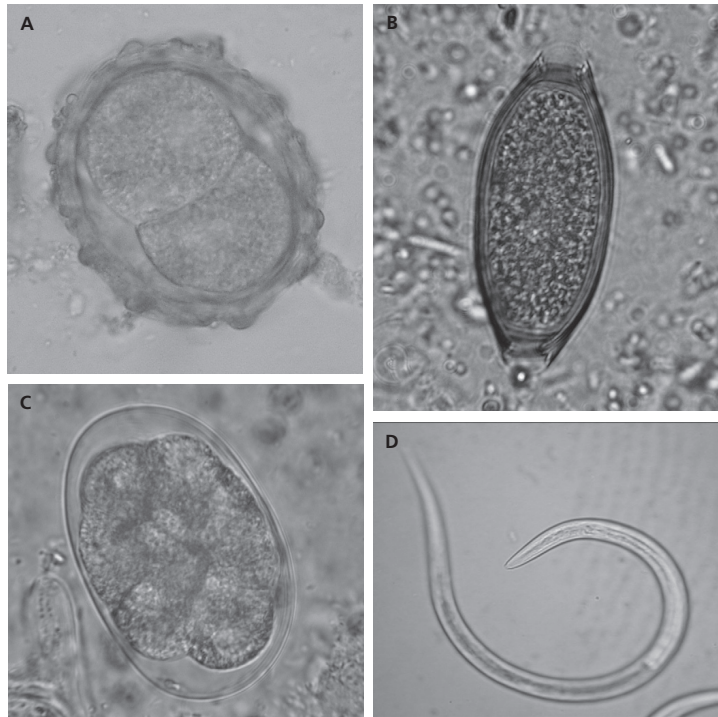


FIGURA 44-3 Huevo de *Ascaris lumbricoides* (A). Huevo de *Trichuris trichiura* (B). Huevo de uncinarias (C). Larva filariforme de *Strongyloides stercoralis* (D).

por geohelminfos incluye 2 o más especies, en cuyo caso el tratamiento de elección es mebendazol (100 mg/12 h \times 3 días). La ivermectina es el fármaco de elección para el tratamiento de la estrogiloidosis tabla 44-2.

El tratamiento colectivo de estas parasitosis varía atendiendo a la prevalencia en la población global. Cuando es mayor del 50%, se recomienda el tratamiento de toda la población (excepto embarazadas en el primer trimestre de gestación). Si, por el contrario, la prevalencia en la población es menor del 50% (como ocurre en España) se deben tratar únicamente a las

personas infectadas. Ante la posible aparición de resistencias debido al uso extendido de los benzimidazoles en los tratamientos en masa, las nuevas estrategias terapéuticas incluyen combinaciones de los fármacos ya empleados así como otros nuevos con propiedades antihelmínticas como la nitazoxanida y el oxibendazol ².

De momento, no se dispone de vacunas para los geohelminfos y el control de estas parasitosis se basa principalmente en medidas de saneamiento ambiental, sobre todo la adecuada eliminación de residuos fecales, y en la adopción de hábitos higiénicos personales como el lavado de manos ².

Geohelmintosis

TABLA 44-2 Tratamiento de las geohelmintosis		
	Elección	Alternativas
<i>Ascariosis</i>	Albendazol 400 mg en dosis única	<ul style="list-style-type: none"> Mebendazol 100 mg/12 h × 3 días (co-parasitosis) Pamoato de pirantel 11 mg/Kg* diario × 3 días (embarazada)
<i>Trichuriasis</i>	Mebendazol 100 mg/12 h × 3 días	<ul style="list-style-type: none"> Mebendazol 500 mg dosis única (tratamientos en masa) Albendazol (400 mg) + ivermectina (200 µg/Kg) (si otras helmintosis)
<i>Uncinariosis</i>	Albendazol 400 mg en dosis única	<ul style="list-style-type: none"> Mebendazol 100 mg/12 h × 3 días (co-parasitosis) Pamoato de pirantel 11 mg/Kg* diario × 3 días (embarazada)
<i>Estrongiloidosis</i>	Ivermectina 200 µg/Kg 2 días consecutivos Repetir a la semana	<ul style="list-style-type: none"> Albendazol 400 mg/12 h × 3 días Tiabendazol 25 mg/Kg/12 h hasta 3 g día 2 días en inmunocompetente, 7 en inmunodeprimido

BIBLIOGRAFÍA

- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis and hookworm. *Lancet* 2006;367:1521-32.
- Brooker S, Hotez PJ, Bundy DA. Hookworm-related anaemia among pregnant woman: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;17:e291.
- Hotez PJ, Brooker S, Phil D, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, et al. Hookworm Infection. *N Engl J Med* 2004;351:799-807.
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascaris, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 2006;367:1521-32.
- Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:208-17.
- Loukas A, Bethony J, Brooker S, Hotez P. Hookworm vaccines: past, present and future. *Lancet Infect Dis* 2006;6:733-41.
- Martín AM, Hernández A, González M, Alfonso O, Hernández M, Pérez-Arellano JL. Parasitosis intestinales en población inmigrante subsahariana asintomática. *Gran Canaria* 2000. *Rev Clin Esp* 2004;204:14-7.
- Montes M, Sawhney C, Barros N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:500-4.
- Muro A, Martínez-Ubeira F, Rodríguez E. Otras trematodosis tisulares de origen zoonótico. En: *Tratado de enfermedades infecciosas microbiología clínica*. Ausina V, Moreno S, eds. Madrid, Editorial Médica Panamericana, 2006, pp.: 1145-53.
- Muro A, Dib J, Yepes E, Pérez Arellano JL. Geohelmintosis y nematodosis tisulares. *Medicine* 2010;10:3739-46.
- Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases?. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:967-72.
- Pardo J, Pérez Arellano JL, Galindo I, Belhassen M, Cordero M, Muro A. Diagnóstico de helmintiasis importadas. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2007;25:329-35.
- Rosenblatt JE. Clinical importance of adequately performed stool ova and parasite examinations. *Clin Infect Dis* 2006;42:979-80.
- Ruano AL, Martín T, Pardo J, López J, Muro A. Avances en el estudio de la estrongiloidosis. *Enf Emerg* 2005;7:102-9.

WEBS DE INTERÉS

- <http://www.cdc.gov>
<http://www.who.int/>

**OTROS
ARTÍCULOS**

ARTÍCULO 4

In Vitro and *In Vivo* Efficacy
of Ether Lipid Edelfosine
against *Leishmania spp.* and
SbV-Resistant Parasites

Rubén E. Varela-M,*

Janny A. Villa-Pulgarin*

Edward Yepes, Ingrid Müller

Manuel Modolell, Diana L. Muñoz,

Sara M. Robledo, Carlos E. Muskus,

Julio López-Abán, Antonio Muro,

Iván D. Vélez and Faustino

Mollinedo.

* The authors contributed equally to
this work.

En: PLoS Negl Trop Dis 2013,
6(4):e1612. doi:10.13171

In Vitro and In Vivo Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites

Rubén E. Varela-M^{1,2,3}, Janny A. Villa-Pulgarin^{1,2,3}, Edward Yepes^{2,3}, Ingrid Müller⁴, Manuel Modolell⁵, Diana L. Muñoz⁶, Sara M. Robledo⁶, Carlos E. Muskus⁶, Julio López-Abán³, Antonio Muro³, Iván D. Vélez⁶, Faustino Mollinedo^{1*}

1 Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain, **2** APOINTECH, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Parque Científico de la Universidad de Salamanca, Villamayor, Salamanca, Spain, **3** Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain, **4** Department of Medicine, Section of Immunology, St. Mary's Campus, Imperial College London, London, United Kingdom, **5** Department of Cellular Immunology, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, Germany, **6** Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Abstract

Background: The leishmaniases are a complex of neglected tropical diseases caused by more than 20 *Leishmania* parasite species, for which available therapeutic arsenal is scarce and unsatisfactory. Pentavalent antimonials (SbV) are currently the first-line pharmacologic therapy for leishmaniasis worldwide, but resistance to these compounds is increasingly reported. Alkyl-lysophospholipid analogs (ALPs) constitute a family of compounds with antileishmanial activity, and one of its members, miltefosine, has been approved as the first oral treatment for visceral and cutaneous leishmaniasis. However, its clinical use can be challenged by less impressive efficiency in patients infected with some *Leishmania* species, including *L. braziliensis* and *L. mexicana*, and by proneness to develop drug resistance *in vitro*.

Methodology/Principal Findings: We found that ALPs ranked edelfosine > perifosine > miltefosine > erucylphosphocholine for their antileishmanial activity and capacity to promote apoptosis-like parasitic cell death in promastigote and amastigote forms of distinct *Leishmania* spp., as assessed by proliferation and flow cytometry assays. Effective antileishmanial ALP concentrations were dependent on both the parasite species and their development stage. Edelfosine accumulated in and killed intracellular *Leishmania* parasites within macrophages. *In vivo* antileishmanial activity was demonstrated following oral treatment with edelfosine of mice and hamsters infected with *L. major*, *L. panamensis* or *L. braziliensis*, without any significant side-effect. Edelfosine also killed SbV-resistant *Leishmania* parasites in *in vitro* and *in vivo* assays, and required longer incubation times than miltefosine to generate drug resistance.

Conclusions/Significance: Our data reveal that edelfosine is the most potent ALP in killing different *Leishmania* spp., and it is less prone to lead to drug resistance development than miltefosine. Edelfosine is effective in killing *Leishmania* in culture and within macrophages, as well as in animal models infected with different *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. Our results indicate that edelfosine is a promising orally administered antileishmanial drug for clinical evaluation.

Citation: Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, et al. (2012) In Vitro and In Vivo Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites. PLoS Negl Trop Dis 6(4): e1612. doi:10.1371/journal.pntd.0001612

Editor: Jayne Raper, New York University School of Medicine, United States of America

Received: November 7, 2011; **Accepted:** February 27, 2012; **Published:** April 10, 2012

Copyright: © 2012 Varela-M et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-02251; SAF2011-30518; RD06/0020/1037 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union; and TRA2009-0275), European Community's Seventh Framework Programme FP7-2007-2013 (grant HEALTH-F2-2011-256986), Junta de Castilla y León (CSI052A11-2; GR15-Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program) and Spain-UK International Joint Project grant from The Royal Society-CSIC (2004GB0032). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: FM is co-founder of ApoinTech and a member of its scientific advisory board. REV, JAVP and EY are employees of ApoinTech. The other authors disclose no potential conflicts of interest.

* E-mail: fmollin@usal.es

☞ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The impact of the leishmaniases on human health has been grossly underestimated for many years, and this complex of diseases has been classified by the World Health Organization (WHO) as one of the most neglected tropical diseases [1]. During the last decade, endemic areas have been spreading and a sharp increase in the number of leishmaniasis cases has been recorded. The WHO classifies leishmaniasis as a category 1 disease

(“emerging and uncontrolled”), and there is an urgent need to develop new therapeutic drugs and approaches. Currently, about 350 million people in 98 countries around the world are at risk, and an estimated 12 million people are infected [1]. Despite progress in the diagnosis and treatment, leishmaniasis remains a major public health problem, particularly in tropical and sub-tropical developing countries. Published figures indicate an estimated incidence of two million new cases per year, with 1.5 million cases of self-healing, but disfiguring, cutaneous leishman-

Author Summary

Leishmaniasis represents a major international health problem, has a high morbidity and mortality rate, and is classified as an emerging and uncontrolled disease by the World Health Organization. The migration of population from endemic to nonendemic areas, and tourist activities in endemic regions are spreading the disease to new areas. Unfortunately, treatment of leishmaniasis is far from satisfactory, with only a few drugs available that show significant side-effects. Here, we show *in vitro* and *in vivo* evidence for the antileishmanial activity of the ether phospholipid edelfosine, being effective against a wide number of *Leishmania* spp. causing cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Our experimental mouse and hamster models demonstrated not only a significant antileishmanial activity of edelfosine oral administration against different wild-type *Leishmania* spp., but also against parasites resistant to pentavalent antimonials, which constitute the first line of treatment worldwide. In addition, edelfosine exerted a higher antileishmanial activity and a lower proneness to generate drug resistance than miltefosine, the first drug against leishmaniasis that can be administered orally. These data, together with our previous findings, showing an anti-inflammatory action and a very low toxicity profile, suggest that edelfosine is a promising orally administered drug for leishmaniasis, thus warranting clinical evaluation.

iasis, and 500,000 cases of life-threatening visceral leishmaniasis [1,2]. Approximately 60,000 people die from visceral leishmaniasis each year, a rate surpassed among parasitic diseases only by malaria; and a loss of about 2.4 million disability-adjusted life years (DALYs) throughout the world has been calculated as the total disease burden of leishmaniasis [1–3]. Furthermore, a number of reports have emphasized the increasing importance of visceral leishmaniasis as an opportunistic infection among HIV-positive patients in areas where both infections are endemic [4].

The chemotherapy currently available for the leishmaniases is far from satisfactory and presents several problems, including toxicity, many adverse side-effects, high costs and development of drug resistance [2,5]. Two pentavalent antimonial (SbV) compounds, sodium stibogluconate (Pentostam) and meglumine antimoniate (Glucantime), were first introduced in the 1940's and have since been used as first-line chemotherapeutic agents against all forms of leishmaniasis through parenteral administration. Although SbV, administered by intramuscular or intravenous route, remains the first-line drug for the treatment of leishmaniasis worldwide, its efficacy is becoming increasingly lower [6], and highly depends on *Leishmania* species and distinct endemic regional variations, even within the same country. Resistance is now common in India, and rates of resistance have been shown to be higher than 60% in parts of the state of Bihar, in north-east India [7,8]. In addition, the incidence of adverse effects, including myalgia, arthralgias, pancreatitis, nephrotoxicity, hepatotoxicity, and cardiotoxicity [1,2,9], makes the search for new alternative medicines to SbV an urgent issue, and a number of drugs are now in clinical trials [10]. Intravenous infusion of liposomal amphotericin B (AmBisome) is at present the most effective anti-*Leishmania* drug [2,11], but its relatively high cost makes it unaffordable in several poor areas of the world where the disease is more prevalent [2]. In addition, the requirement for long periods of parenteral administration, frequently requiring hospitalization, has also limited the clinical use of amphotericin B.

Miltefosine (Impavido) is a new oral agent that has shown high cure rates in visceral leishmaniasis in India (*L. donovani*; 94% cure) [12], and in cutaneous leishmaniasis in Colombia (*L. panamensis*; >90% cure) [13]. However, a recent therapeutical trial has revealed a limited potential of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis, with an unsatisfactory cure rate of 69.8% in Colombia [14]. Furthermore, this percentage fell to 49% when miltefosine was administered to patients with lesions caused by *L. braziliensis*, which comprise more than 60% of cutaneous leishmaniasis in Colombia [14]. Additional recent clinical trials in Brazil showed a cure rate of miltefosine for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* of 75% [15], and for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis* of 71% [16]. Miltefosine treatment also led to approximately 70% cure rate for mucosal leishmaniasis due to *L. braziliensis* in Bolivia [17,18]. Moreover, the miltefosine cure rate was approximately 53% for cutaneous leishmaniasis (33% for *L. braziliensis* infection, and 60% for *L. mexicana* infection) in Guatemala [13,19,20], and a cure rate of 63% was reported for *L. tropica* in Afghanistan [20]. These figures contrast with cure rates of more than 82% in the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in India [21,22] and Bangladesh [23]. These data point out the great variability in the outcome depending on the geographical area for reasons that are not well understood. In addition, miltefosine commonly induces gastrointestinal side-effects, such as anorexia, nausea, vomiting and diarrhea, that sometimes lead to drop out from treatment [1,2,22]. Miltefosine is potentially teratogenic and should not be administered to pregnant women [1,2], for whom adequate contraception should be guaranteed during treatment and for up to 3 months afterwards [1], given the teratogenic potential of miltefosine in animal models [24]. An additional concern is the rapid *in vitro* generation of resistance to miltefosine [25–27] that could limit its clinical use. Thus, these studies reinforce the need to search for new therapeutic alternatives in the treatment of leishmaniasis.

Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine, ET-18-OCH₃) is a promising antitumor ether lipid drug [28–30], which is not mutagenic and acts by activating apoptosis through its interaction with cell membranes [31–34]. In addition to its antitumor activity, edelfosine has been shown to exert *in vitro* antiparasitic activity against different species of *Leishmania* parasites [35–37]. Edelfosine has been considered the prototype molecule of a rather heterogeneous family of synthetic compounds collectively known as alkyl-lysophospholipid analogs (ALPs), that comprise the above clinically relevant miltefosine as well as perifosine, which also shows anti-*Leishmania* activity [38,39]. Although the mechanism of action of miltefosine against *Leishmania* parasites remains to be fully elucidated, there are some reports showing that the ability of this compound to promote an apoptosis-like cell death is critical for its leishmanicidal activity [40,41]. Because edelfosine has been shown to have a higher proapoptotic activity than both miltefosine and perifosine in human cancer cells [29,30,33], we have carried out here a comprehensive *in vitro* and *in vivo* study, investigating the putative anti-*Leishmania* traits of edelfosine, as compared to other ALPs, using different *Leishmania* species as well as mouse and hamster experimental models.

Materials and Methods

Ethics statement

Animal procedures in this study complied with the Spanish (Real Decreto RD1201/05) and the European Union (European Directive 2010/63/EU) guidelines on animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals, and were

conducted at the accredited Animal Experimentation Facility (Servicio de Experimentación Animal) of the University of Salamanca (Register number: PAE/SA/001). Procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Salamanca (protocol approval number 48531).

Drugs

Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) was from INKEYSA (Barcelona, Spain) and Apointech (Salamanca, Spain). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) was from Calbiochem (Cambridge, MA). Perifosine (octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidinio-4-yl)-phosphate) and erucylphosphocholine ((13Z)-docos-13-en-1-yl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate) were from Zentaris (Frankfurt, Germany). Stock sterile solutions of the distinct ALPs (2 mM) were prepared in RPMI-1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) as previously described [28].

Leishmania cells and culture conditions

The following *Leishmania* strains were used in this study: *L. amazonensis* (MHOM/Br/73/LV78), *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301), *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8), *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150), *L. major* LV39 (MRHO/SU/59/P), *L. mexicana* (MHOM/MX/95/NAN1), and *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140).

Leishmania promastigotes were grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 26°C. Promastigotes were treated with the indicated compounds during their logarithmic growth phase (1.5×10^6 parasites/ml) at 26°C. Late stationary promastigotes were obtained after incubation of the parasites for 5–6 days with starting inocula of 1×10^6 parasites/ml. *Leishmania* axenic amastigotes were obtained at pH 5.0 in Schneider's culture medium following a stepped temperature increase to 30, 31 and 32°C, except for *L. infantum* amastigotes, which were exposed to 34, 36 and 37°C, as previously described [42].

Growth inhibition assay

The antileishmanial activity in promastigotes and axenic amastigotes was determined by using the XTT (sodium 3,3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) cell proliferation kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) as previously described [42,43]. Cells were resuspended in FBS-containing RPMI-1640 culture medium (1.5×10^6 cells/ml for promastigotes, and 2×10^6 cells/ml for axenic amastigotes), and plated (100 µl/well) in 96-well flat-bottomed microtiter plates at 26°C, in the absence and in the presence of different concentrations of the indicated ALPs. After 72-h incubation at 26°C, IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) values, defined as the drug concentration causing 50% inhibition in cell proliferation with respect to untreated controls, were determined for each compound. Measurements were done in triplicate, and each experiment was repeated four times.

Analysis of apoptosis-like cell death by flow cytometry

One and a half million *Leishmania spp.* promastigotes or axenic amastigotes were treated in the absence and in the presence of the indicated concentrations of ALPs for different incubation times. Then, parasites were pelleted by centrifugation ($1000 \times g$) for 5 min,

and analyzed for apoptosis-like DNA breakdown by flow cytometry following a protocol previously described [44]. Quantitation of apoptotic-like cells was monitored as the percentage of cells in the sub-G₀/G₁ region (hypodiploidy) in cell cycle analysis [44,45], using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 488 nm argon laser. WinMDI 2.8 software was used for data analysis.

Intracellular distribution of fluorescent edelfosine analog in *L. panamensis*-infected J774 macrophages

The mouse macrophage-like cell line J774, grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, at 37°C in humidified 95% air and 5% CO₂, was infected overnight at the exponential growth phase (3×10^5 cells/ml) with stationary-phase *L. panamensis* promastigotes, at a macropage/promastigote ratio of 1/10 in complete RPMI-1640 culture medium. Non-internalized promastigotes were removed by 2–3 successive washes with PBS. Then, uninfected and *L. panamensis*-infected J774 macrophages were incubated for 1 h with 10 µM of the fluorescent edelfosine analog all-(E)-1-*O*-(15'-phenylpentadeca-8',10',12',14'-tetraenyl)-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (PTE-ET) [34,46,47] (kindly provided by F. Amat-Guerri and A.U. Acuña, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain) in complete RPMI-1640 culture medium. In addition, J774 cells were also incubated first with 10 µM PTE-ET for 1 h, then washed with PBS and infected with *L. panamensis* in the darkness for 6 h. Samples were fixed with 1% formaldehyde, and analyzed with a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) (40× magnification).

Assessment of intracellular parasitic load in macrophage-like cells

J774 cells were infected with *L. panamensis* promastigotes as above. The number of intracellular viable parasites was assessed by incubating infected cells with RPMI-1640 medium containing 0.008% SDS to gently disrupt macrophage plasma membrane, followed by addition of RPMI-1640 culture medium containing 20% FBS to stop further lysis. Samples were then sequentially diluted in 96-well plates containing biphasic Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Plates were incubated at 26°C for 20 days, and examined weekly under an inverted Nikon TS-100 microscope (Nikon, Kanagawa, Japan) to evaluate the presence of viable motile promastigotes. The reciprocal of the highest dilution found positive for parasite growth was considered to be the concentration of parasites.

Determination of nitric oxide (NO) by the nitrite assay

Macrophage-like J774 cells were plated in complete RPMI-1640 culture medium at a concentration of 1×10^6 cells/well in 24-well culture plates (Costar, Cambridge, MA), and let them adhere for 2 h at 37°C in 5% CO₂. Non-adhering cells were removed by gentle washing with complete RPMI-1640 culture medium. Adherent J774 cells were incubated in the absence (negative control), or in the presence of 10 µg/ml lipopolysaccharide (Sigma, St. Louis, MO) (LPS; positive control) or of different concentrations of edelfosine. After 18-h incubation at 37°C in 5% CO₂, supernatants were collected, centrifuged at $500 \times g$ for 10 min, and stored at -80°C until analysis. NO release was indirectly measured using a colorimetric assay based on the Griess reaction. Triplicate 100-µl aliquots of cell culture supernatants were incubated with 50 µl of freshly prepared Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride,

and 2.5% orthophosphoric acid) for 15 min at room temperature, and then absorbance of the azo-chromophore was measured at 550 nm. Nitrite concentration was determined by using sodium nitrite as a standard. All samples were assayed against a blank comprising complete RPMI-1640 culture medium incubated for 18 h on the same plates as the samples, but in the absence of cells. All reagents were purchased from Sigma. Results were expressed in nanomoles of nitrite per 10^6 macrophages.

Evaluation of antileishmanial activity in mouse and hamster models

Six-week-old female BALB/c mice (18–20 g) and four-week-old male Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) (about 120 g) (Charles River Laboratories, Lyon, France), kept in a pathogen-free facility and handled according to institutional guidelines, complying with the Spanish legislation under a 12/12-h light/dark cycle at a temperature of 22°C, received a standard diet and water *ad libitum*. Mice were inoculated *s.c.* into their left hind footpad (in a total volume of 50 μ l PBS) with 2×10^6 infective stationary-phase promastigotes, whereas hamsters, previously anesthetized with inhaled Forane, were inoculated intradermally in the nose with 1×10^6 stationary-phase promastigotes in a volume of 50 μ l PBS. When inflammation was evident (about 1 week in mice, and 6 weeks in hamsters, after inoculation), animals were randomly assigned into cohorts of 7 animals each, receiving a daily oral administration (through a feeding needle) of edelfosine (15 mg/kg for mice, and 26 mg/kg for hamsters, in water), or an equal volume of vehicle (water). In mice, the footpad thickness was measured with calipers every week, and compared with the uninfected right hind footpad to obtain the net increase in footpad swelling. In hamsters, nose swelling was measured with calipers every week, and compared with the nose size before inoculation and treatment. Evolution index of the lesion was calculated as size of the lesion during treatment (mm)/size of the lesion before treatment. Animal body weight and any sign of morbidity were monitored. Drug treatment lasted for 28 days, and animals were killed following institutional guidelines, 24 h after the last drug administration.

After the killing of the animals, the parasite burden in the infected tissues was determined by limiting dilution assays as previously described [48]. Biopsies were washed 3 times with PBS supplemented with 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (GIBCO-BRL), and then incubated overnight (12 h) at 4°C with PBS containing 100 units/ml of penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Following overnight incubation, biopsies were washed 2–3 times with PBS supplemented with the above antibiotics, and then a weighed piece of the infected area was homogenized in 1 ml PBS containing antibiotics using a sterile glass Potter-Elvehjem type tissue grinder. Homogenate was diluted at a final concentration of 0.1 mg/ml in Schneider's culture medium, containing 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin; and then serial dilutions were made in triplicate in 96-well plates containing biphasic Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Plates were incubated at 26°C for 20 days, and examined weekly under an inverted Nikon TS-100 microscope to evaluate the presence of viable promastigotes. The reciprocal of the highest dilution found positive for parasite growth was considered to be the concentration of parasites per mg of tissue. Total parasite load was calculated using the total weight of the respective infected organ.

Induction of *in vitro* resistance to Glucantime in *L. panamensis* promastigotes

Parasites cultured in Schneider's culture medium supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml strepto-

mycin at 26°C for 5 days, were washed twice with PBS, and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at room temperature. Parasites were then resuspended at 2×10^6 promastigotes/ml in Schneider's culture medium, and incubated at 26°C for 5 days with 4 mg/ml Glucantime (Aventis Pharma, Sao Paulo, Brazil), which corresponded to its IC_{50} value, previously assessed by the XTT technique. Drug-containing culture medium was changed every 4–6 days, depending on parasite growth, and parasites were washed with PBS, analyzed by XTT assay, and resuspended again at 2×10^6 parasites/ml. This procedure was repeated until parasite viability in the presence of the drug was over 80%. Then, after achieving this viability rate, this process was repeated three times, with increasing concentrations of SbV, up to reaching a final concentration of 37 mg/ml. The volume of drug solution used in each passage was controlled not to exceed 10% of the total volume of culture medium.

Assessment of *L. panamensis* resistance to SbV in the hamster animal model

The level of SbV resistance was further assessed by infection of golden hamsters with the above *in vitro*-generated SbV-resistant (SbV-R) *L. panamensis* parasites, growing in the presence of 37 mg/ml SbV, as well as with wild-type susceptible *L. panamensis*, followed by treatment with Glucantime. Hamsters were divided into two groups, eight animals infected with the resistant strain and eight animals infected with the susceptible strain. Each group was inoculated intradermally on the nose with 1×10^6 stationary-phase promastigotes in a volume of 50 μ l PBS. These animals were previously anesthetized with ketamine (50 mg/ml) and xylazine (5 mg/kg) intraperitoneally. About six weeks after infection, lesions were evident in both animal groups, and animals were treated daily with 40 mg/kg Glucantime, intramuscularly using a 27-gauge needle, for ten days. Evolution of the lesions and drug efficacy were monitored as above.

Induction of *in vitro* resistance to ALPs in different *Leishmania* species

ALP-resistant *Leishmania* strains were generated as indicated above for SbV-resistant parasites. Drugs were initially incubated at their corresponding IC_{50} values, and then drug concentration was gradually increased. Parasites were considered resistant when they could grow at a drug concentration of 30 μ M.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SD. Between-group statistical differences were assessed using the Mann-Whitney or the Student's *t* test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

ALPs differentially inhibit the proliferation of *Leishmania* spp. promastigotes

We analyzed the antileishmanial potential of the four most clinically relevant ALPs, namely edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine (Figure 1). By using the XTT assay, we found that edelfosine and perifosine were the most active ALPs inhibiting proliferation of distinct *Leishmania* spp. promastigotes with IC_{50} values in the range of low micromolar concentration (~ 2 – 9μ M) in most cases (*L. donovani*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis*) (Table 1). *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes were more resistant to the action of edelfosine, perifosine and miltefosine than the other *Leishmania* species tested

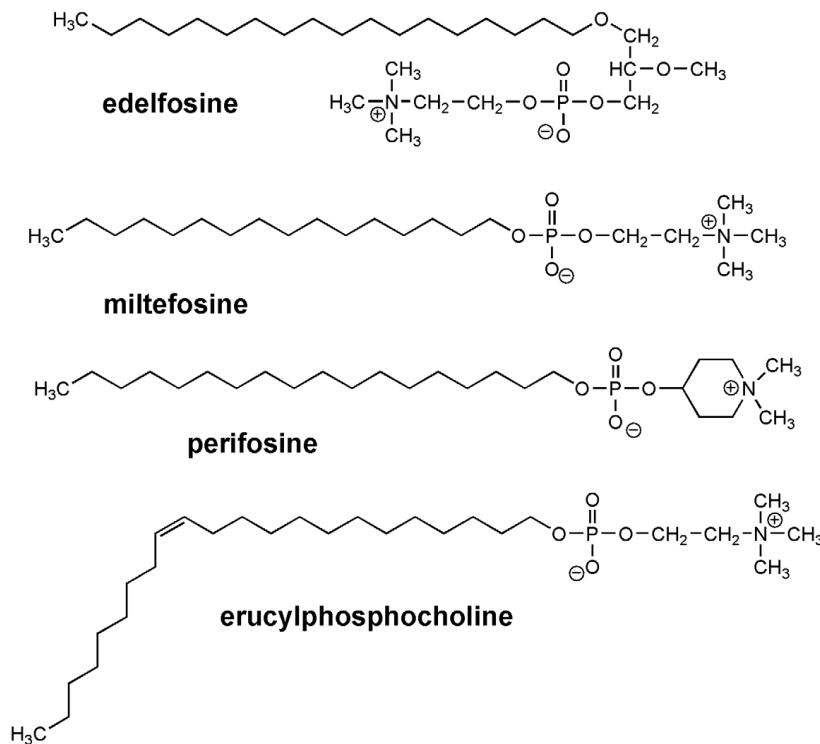


Figure 1. Chemical structures of edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine.
doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g001

(Table 1). Erucylphosphocholine was the least efficient ALP in inhibiting parasite proliferation regarding most *Leishmania spp.* promastigotes, but interestingly it showed the highest antiparasitic activity against *L. infantum* promastigotes (Table 1). In general, the antileishmanial activity of the distinct ALPs ranked edelfosine \geq perifosine $>$ miltefosine $>$ erucylphosphocholine against *Leishmania spp.* promastigotes.

Effect of ALPs in inhibiting proliferation of *Leishmania spp.* axenic amastigotes

Next, we analyzed the antileishmanial activity of the distinct ALPs against distinct axenic *Leishmania* amastigotes. Following an axenic amastigote drug screening, we found that edelfosine and perifosine behaved as the most potent ALPs in the inhibition of proliferation of distinct *Leishmania spp.* amastigotes (Table 1). A wider range of IC₅₀ values was detected for amastigote than for promastigote forms of *Leishmania* (Table 1). The IC₅₀ values for the anti-*Leishmania* amastigote activity of edelfosine and perifosine ranged between \sim 3–12 μ M and \sim 2–15 μ M, respectively. Miltefosine showed a higher degree of variability (IC₅₀, \sim 4–39 μ M), with *L. panamensis* amastigotes being rather resistant (IC₅₀, 39.3 μ M) (Table 1). Erucylphosphocholine showed the highest IC₅₀ values (\sim 28–66 μ M) for the inhibition of cell growth

in all the *Leishmania spp.* amastigotes analyzed (Table 1). Surprisingly, *L. infantum* amastigotes were very sensitive to the action of perifosine, edelfosine and miltefosine, whereas their cognate promastigotes were rather resistant (Table 1), with double digit IC₅₀ figures for promastigotes and low one-digit IC₅₀ values for amastigotes. Interestingly, *L. braziliensis* amastigotes were far more sensitive to edelfosine and miltefosine than their promastigote counterparts (Table 1), whereas perifosine and erucylphosphocholine showed similar IC₅₀ values for both *L. braziliensis* promastigote and amastigote forms with IC₅₀ figures over 14 μ M (Table 1). In general, the antileishmanial activity of the distinct ALPs ranked edelfosine \geq perifosine $>$ miltefosine $>$ erucylphosphocholine against *Leishmania spp.* amastigotes. These results indicate that sensitivity of *Leishmania* parasites to ALPs is highly dependent on each species as well as on their stage form, namely promastigote or amastigote. Interestingly, because we have recently found that the level of edelfosine in plasma, after daily oral administration of 30 mg/kg, was about 10.3–25.2 μ M in both BALB/c and immunodeficient mice [29,30,49], a dose that was effective in inhibiting cancer cell growth *in vivo* [29,30,50], our results indicate that edelfosine was active against all *Leishmania spp.* tested at pharmacologically relevant concentrations (Table 1).

Table 1. Inhibition of proliferation of different *Leishmania* spp. (IC₅₀ values) by ALPs.

IC ₅₀ (μM)				
Parasite stage	Edelfosine	Miltefosine	Perifosine	ErPC
Promastigotes				
<i>L. amazonensis</i>	6.4±0.3	13.0±0.8	9.6±1.8	40.0±3.0
<i>L. braziliensis</i>	18.3±3.7	37.7±3.2	14.3±2.1	21.0±3.5
<i>L. donovani</i>	2.1±0.3	3.1±0.8	2.2±0.4	13.3±1.2
<i>L. infantum</i>	27.7±4.6	47.3±4.1	35.3±2.5	16.7±2.8
<i>L. major</i>	2.0±0.2	6.8±0.3	7.1±0.5	12.7±1.5
<i>L. mexicana</i>	2.4±0.2	2.7±0.7	2.5±0.1	11.1±4.9
<i>L. panamensis</i>	2.3±0.8	6.3±0.6	2.4±0.2	14.1±3.1
	IC ₅₀ (μM)			
Axenic amastigotes	Edelfosine	Miltefosine	Perifosine	ErPC
<i>L. amazonensis</i>	3.1±0.1	5.9±1.2	2.9±0.5	42.9±3.9
<i>L. braziliensis</i>	8.1±0.2	6.5±1.2	15.1±3.0	28.2±0.7
<i>L. donovani</i>	5.3±0.2	14.5±0.5	9.9±0.7	47.7±3.9
<i>L. infantum</i>	4.2±0.6	4.4±1.1	1.7±0.2	37.0±3.1
<i>L. mexicana</i>	5.2±1.4	4.4±0.8	2.5±0.8	37.6±7.8
<i>L. panamensis</i>	12.2±1.2	39.3±3.7	9.3±0.8	65.8±6.7

Leishmania parasites were incubated with edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine (ErPC), and assayed for growth inhibition by XTT assays as described in Materials and Methods. Data are shown as the mean values ± SD of four independent determinations.
doi:10.1371/journal.pntd.0001612.t001

Edelfosine is the most potent ALP in inducing apoptosis-like cell death in *Leishmania* promastigotes

The above results showed that ALPs were able to inhibit *Leishmania* spp. proliferation at distinct rates. We next analyzed whether these agents, used at the pharmacologically relevant concentration of 10 μM, were able to induce an apoptotic-like cell death in *Leishmania* spp. promastigotes by determining DNA fragmentation by flow cytometry. Parasites displaying a sub-G₀/G₁ hypodiploid DNA content represent cells that undergo DNA breakdown and an apoptotic-like cell death [51]. We found that edelfosine was the most active ALP in promoting a potent apoptotic-like response in all *Leishmania* spp. tested (Figure 2A). The well nigh absence of apoptotic response in *L. infantum* promastigotes (Figure 2A) was expected, as ALPs were used at 10 μM, below the IC₅₀ value for the inhibition of *L. infantum* promastigote proliferation measured by XTT assays (Table 1). Interestingly, edelfosine showed a much higher proapoptotic-like activity against *L. donovani* and *L. mexicana* promastigotes than miltefosine and perifosine (Figure 2A), despite the similar IC₅₀ values (~2–3 μM) of the three ALPs, assessed by XTT assays (Table 1). These results suggest that the induction of cell death by edelfosine might differ somewhat from the way by which miltefosine and perifosine promote parasite killing. The ability of the distinct ALPs to induce apoptotic-like cell death in *Leishmania* spp. promastigotes ranked edelfosine > perifosine ≈ miltefosine > erucylphosphocholine. Results shown in Figure 2A also show that the ability of edelfosine to promote an apoptotic-like cell death is highly dependent on the *Leishmania* sub-genus. In this regard, edelfosine inhibited proliferation of *L. amazonensis* (sug-genus *Leishmania*) and *L. braziliensis* (sug-genus *Vivax*) promastigotes with XTT IC₅₀ values of 6.4 and 18.3 μM, respectively (Table 1), but the percentage of parasites with a sub-G₀/G₁ hypodiploid DNA content was higher in *L. braziliensis* than in *L. amazonensis* promastigotes (Figure 2A).

L. infantum promastigotes behaved somewhat different from other *Leishmania* species, with regard to their sensitivity to undergo

apoptosis-like cell death by ALPs, requiring high ALP concentrations. A dose-response analysis of the apoptotic-like response of *L. infantum* promastigotes to the four ALPs tested was in agreement with the above XTT IC₅₀ values of the corresponding drugs (cf. Figure 2B and Table 1), with erucylphosphocholine as the most efficient ALP at 30 μM (Figure 2B). However, at higher concentrations, edelfosine became as efficient as erucylphosphocholine in prompting an apoptotic-like cell death in *L. infantum* promastigotes (Figure 2B).

A comparative dose-response analysis showed that edelfosine was more potent than miltefosine in inducing apoptosis-like cell death in *L. panamensis* promastigotes (Figure 2, C and D), edelfosine being highly effective even at 5 μM. These results agree with our above data on XTT IC₅₀ figures (Table 1). The cell cycle profiles from propidium iodide-stained *L. panamensis* promastigotes showed a high percentage of parasites with apoptosis-like DNA breakdown following edelfosine treatment at either 5 or 10 μM (Figure 2, C and D), whereas miltefosine induced only a significant DNA breakdown response at 10 μM (Figure 2, C and D). Interestingly, edelfosine also induced apoptotic-like cell death in *L. panamensis* axenic amastigotes (25.8±4.6 and 55.4±2.8% sub-G₀/G₁ cells (*n* = 3) after 24 h incubation with 10 and 20 μM edelfosine, respectively).

Edelfosine accumulates in intracellular *Leishmania* parasites

Because *Leishmania* parasites use macrophages as their main host cell in mammalian infection, we next analyzed the localization of edelfosine in *Leishmania*-infected macrophages. To this aim, we used the fluorescent edelfosine analog *all-(E)-1-O-(15'-phenylpentadeca-8',10',12',14'-tetraenyl)-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine* (PTE-ET), which has been previously used as a *bona fide* compound to analyze the subcellular localization of edelfosine in cancer cells [30,34,46,52,53], and it fully mimics the antitumor [30,34,46,52,53] and antileishmanial [54] (data not shown)

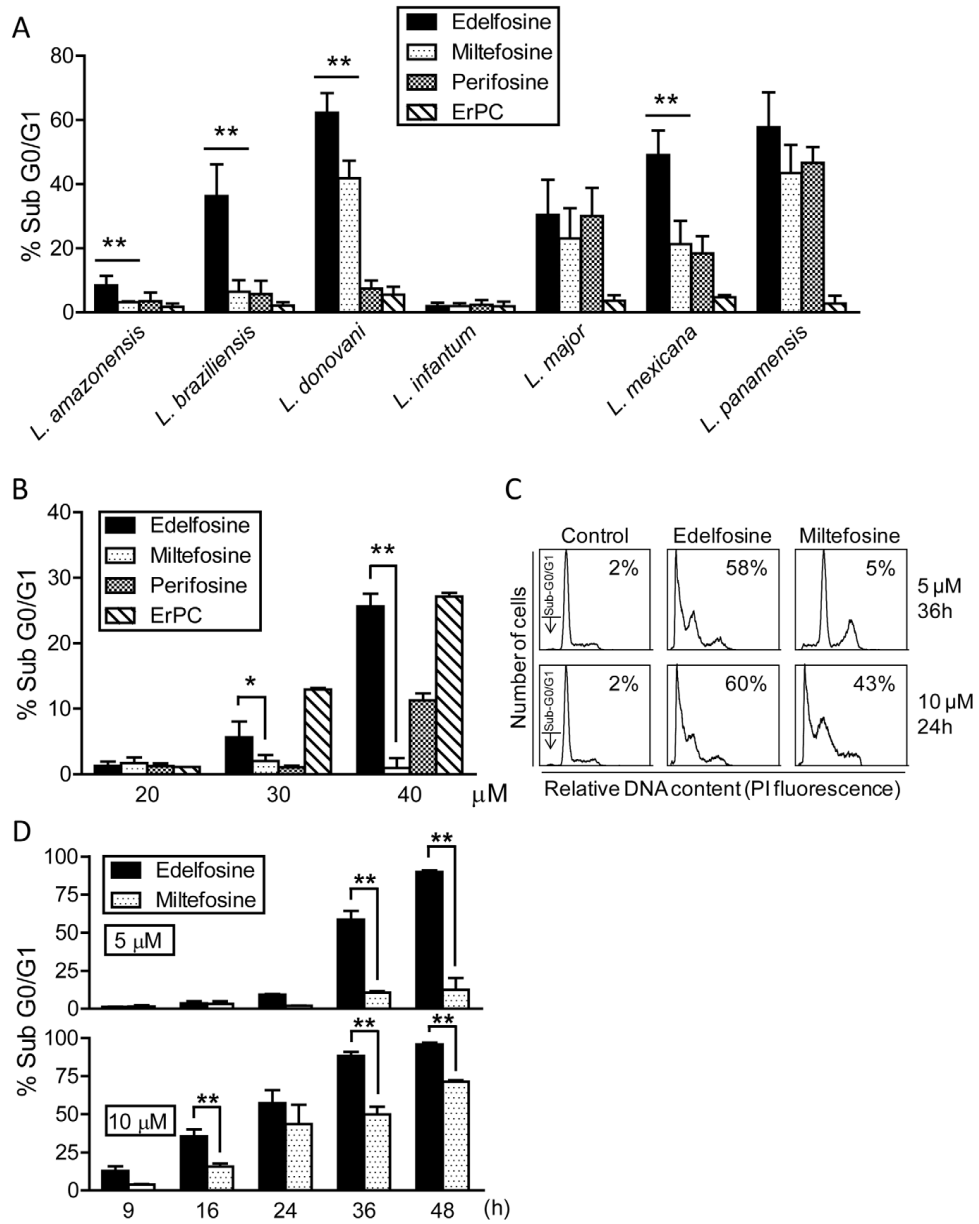


Figure 2. Differential ability of ALPs to induce apoptosis-like cell death in *Leishmania* spp. (A) Promastigotes from different *Leishmania* spp. were treated with 10 μM edelfosine, miltefosine, perifosine or erucylphosphocholine (ErPC) at 26°C for 24 h. Apoptosis-like cell death was then quantitated as percentage of parasites in the sub-G₀/G₁ region by flow cytometry. (B) *L. infantum* promastigotes were incubated with different concentrations of edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine (ErPC) at 26°C for 24 h, and then apoptosis-like cell death was

determined by flow cytometry. (C) Representative histograms of cell cycle analysis of *L. panamensis* promastigotes treated with 5 and 10 μM edelfosine and miltefosine at different incubation times. The position of the sub- G_0/G_1 peak, integrated by parasites undergoing apoptosis-like cell death, is indicated by arrows. Percentages of apoptotic parasites are shown in each histogram. (D) *L. panamensis* promastigotes were treated with 5 and 10 μM edelfosine or miltefosine at different incubation times, and then apoptosis-like cell death was determined by flow cytometry. Untreated *Leishmania* promastigotes were run in parallel, and apoptosis-like cell death was less than 1.5% in untreated parasites in all cases shown in panels A–D. Data are means \pm SD or representative of four independent experiments. Asterisks indicate that the differences between edelfosine- and miltefosine-treated cells are statistically significant. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g002

actions of the parent drug edelfosine. The mouse macrophage-like cell line J774 was rather resistant to undergo apoptosis following treatment with edelfosine ($\text{IC}_{50} = 40.7 \pm 7.1 \mu\text{M}$, assessed by XTT assays), and therefore it was used as a host cell line for *Leishmania* infection. Edelfosine (10 μM) was unable to induce apoptosis in J774 cells following 24 h incubation (<2% apoptosis), and caused less than 15% apoptosis after 48 h incubation. This is in stark contrast to the high sensitivity of other monocyte-like cell lines to edelfosine, such as human U937 cells [28,55,56], which undergo rapid apoptosis and can therefore not be used as host cells to analyze the effect of ALPs on intracellular parasites residing in macrophages. Incubation of J774 macrophages with PTE-ET showed that the fluorescent edelfosine analog was taken up into the cell (Figure 3A). The blue fluorescence of PTE-ET was mainly located around the nucleus (Figure 3A, left panel) that could be related to a predominant accumulation of this ether lipid in the endoplasmic reticulum of J774 cells, as previously reported for solid tumor cells [50,52]. When macrophages were infected with *L. panamensis* parasites, an intense blue fluorescence was detected in the intracellular parasites (Figure 3A, middle panel), indicating that a major location of the PTE-ET fluorescent compound turned out to be in the intracellular parasites inside the macrophage. The PTE-ET location in the parasites residing in the macrophage was clearly detected, irrespective of whether

PTE-ET was incubated with macrophages previously infected with parasites (Figure 3A, middle panel), or with intact macrophages and then subsequently incubated with parasites (Figure 3A, right panel). Macrophages containing a low number of *Leishmania* amastigotes are shown in Figure 3 in order to facilitate visualization of the fluorescent drug location in the parasites (Figure 3A). Similar data were obtained with primary mouse bone marrow-derived macrophages, which were resistant to 10 μM edelfosine, following infection with *L. major* (data not shown). These data suggest that edelfosine accumulates in intracellular *Leishmania* parasites inside macrophages, in a similar way as PTE-ET, to exert its anti-parasite action regardless drug treatment is before or after infection.

Edelfosine induces cell death of *Leishmania* amastigotes inside macrophages

We also found that edelfosine efficiently killed J774 macrophage-residing *L. panamensis* by examining the parasitic burden of macrophages through limiting dilution assays (Figure 3B). The cytotoxic action of edelfosine against intracellular *L. panamensis* amastigotes was further confirmed by a dramatic decrease in the number of intracellular parasites, using J774 macrophages infected with green fluorescent *L. panamensis*, previously transfected with p.6.5-egfp to express green fluorescent protein (GFP) [57] (data not shown).

Some anti-parasite drugs are suggested to promote their action through the generation of nitric oxide (NO) [58], as this molecule exerts an important anti-parasitic effect [59,60]. Miltefosine has been reported to induce NO in U937 cells [61]. However, we were unable to detect NO production following incubation of 10 μM edelfosine with J774 macrophages (<2 nmol nitrites/ 10^6 J774 cells after 18 h incubation), unlike cell incubation with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (100 nmol nitrites/ 10^6 J774 cells after 18 h incubation). Likewise, edelfosine treatment failed to prompt NO synthesis in mouse bone marrow-derived macrophages and rat alveolar macrophages (data not shown). These data suggest that the killing effect of edelfosine on macrophage-residing *Leishmania* parasites does not depend on NO generation.

In vivo antileishmanial activity of edelfosine in a mouse model

We next examined the *in vivo* antileishmanial activity of edelfosine in BALB/c mice infected subcutaneously in the footpad with 2×10^6 infective stationary-phase *L. major* promastigotes. In agreement with previous estimates [29,30,49], we found that a daily oral administration of 15 or 30 mg/kg edelfosine was well tolerated, 45 mg/kg being the maximum tolerated dose, following toxicity analyses, where animals were monitored for body weight loss or any appreciable side-effect, including changes in strength and general condition (data not shown). We found that a daily oral administration dose of 15 mg/kg body weight edelfosine achieved a remarkable inhibition of both footpad inflammation (Figure 4A) and parasitic load (Figure 4B), as assessed by caliper measures of footpad swelling and limiting dilution assays, respectively, at the end of the 28-day treatment period. In comparison experiments, we found that oral treatment of *L. major*-infected BALB/c mice

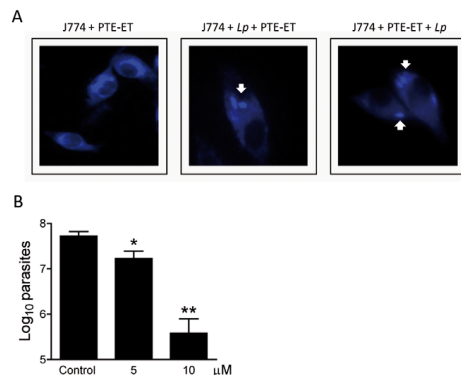


Figure 3. Antileishmanial activity of edelfosine against intracellular *Leishmania* amastigotes within macrophage-like J774 cells. (A) J774 cells, incubated with the blue-emitting fluorescent analog PTE-ET (left panel), or with *L. panamensis* (*Lp*) and then with PTE-ET (middle panel), or with PTE-ET and then with *L. panamensis* (*Lp*) (right panel), were analyzed by fluorescence microscopy to examine drug localization. White arrows point to the intracellular amastigotes. (B) Parasite burden in *L. panamensis*-infected J774 cells untreated (Control) and treated with 5 or 10 μM edelfosine for 24 h. Data are means \pm SD or representative of four independent experiments. Asterisks indicate that the differences between control and edelfosine-treated groups are statistically significant. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g003

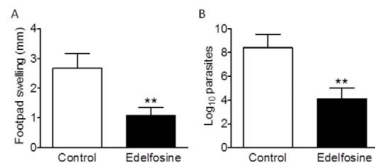


Figure 4. *In vivo* antileishmanial action of edelfosine in *L. major*-infected mice. BALB/c mice were infected with 2×10^6 *L. major* promastigotes in the left hind footpad, and after swelling was perceptible, mice were randomized into drug-treated (15 mg edelfosine/kg of body weight, daily oral administration for 28 days) and control (water vehicle) groups of 7 mice each. After completion of the 4-week treatment, lesions were evaluated by measuring the footpad swelling (A) and determining the parasite load (B), using caliper measurements and limiting dilution assays respectively. Data are means \pm SD ($n=7$). Asterisks indicate that the differences between control and edelfosine-treated groups are statistically significant. (**) $P < 0.01$. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g004

with edelfosine was slightly more effective than with miltefosine, although differences were not statistically significant (data not shown). The dose of edelfosine used in our assays was similar to the dose used for miltefosine in mouse models, ranging from 2.5 to 25 mg/kg of body weight/day given orally, and being 20 mg/kg/day the most widely used dose for *in vivo* murine experiments [35,39,62–65]. In addition, because the molecular masses for edelfosine and miltefosine are 523.7 and 407.6, respectively, the edelfosine dose used in our assays (15 mg/kg, corresponding to 28.6 μ mol/kg) was even lower than the usual miltefosine dose (20 mg/kg, corresponding to 49.1 μ mol/kg) in these *in vivo* murine studies.

In vivo antileishmanial activity of edelfosine in hamster models of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis

Next, we used golden hamsters as an additional experimental animal model of leishmaniasis. Hamsters have been reported to better reproduce the clinicopathological features of human leishmaniasis than mice [66–68]. One million promastigotes of *L. panamensis* and *L. braziliensis* were inoculated in the nose of golden hamsters, as animal models for cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, since the above *Leishmania* species can cause both cutaneous and mucocutaneous disease [69,70]. Then, hamsters were randomized into drug-treated and drug-free control (water vehicle) groups of seven hamsters each, and the animal models for *L. panamensis* (Figure 5, A–C) and *L. braziliensis* (Figure 5, D–F) infections were monitored for the antileishmanial efficacy of edelfosine. Serial caliper measurements during the course of the assays were made to determine the rate of nose swelling (Figure 5, A and D). Progression of the disease led to a dramatic swelling and ulceration of the nose. Oral administration of edelfosine (26 mg/kg body weight) on a daily basis for 4 weeks (28 days) induced a remarkable decrease in both nasal swelling and parasitic load at the site of infection (Figure 5). This dose is lower than the miltefosine dose (40 mg/kg/day) used in a recent study with *L. donovani*-infected hamsters [71]. Here, we found no appreciable adverse effects on the general condition of the animals following a daily oral administration of 26 mg/kg edelfosine. The effect of edelfosine on nose swelling became evident in both *L. panamensis* and *L. braziliensis* infections after two weeks of treatment (Figure 5, A and D). The parasite loads, assessed by limiting dilution assays, were significantly diminished in both animal models following oral treatment with edelfosine

(Figure 5, B and E). Untreated infected animals displayed intense swelling and ulceration in their noses, but edelfosine treatment greatly ameliorated the signs of leishmaniasis (Figure 5, E and F).

Edelfosine shows potent *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity against SbV-resistant *L. panamensis* parasites

Cutaneous leishmaniasis is the most common form of leishmaniasis and is endemic in many tropical and subtropical countries [1,2]. Common therapies for leishmaniasis for more than 60 years include the use of SbV drugs as meglumine antimoniate (Glucantime) or sodium stibogluconate (Pentostam) [2,72]. However, extensive use of these compounds is leading to SbV resistance. Thus, parasites have become resistant to antimony in many parts of the world, and primary resistance to SbV exceeds 60% of cases of leishmaniasis in the state of Bihar in India [73]. Different *Leishmania* species have been shown to display distinct susceptibility to antimonials [74,75]. In addition, susceptibility of *L. donovani* to SbV has been reported to follow stage transformation from promastigotes to axenic amastigotes, while resistance to SbV is acquired when amastigotes differentiate into promastigotes [76]. SbV has also been reported to be active, even though to different degrees, against a number of *Leishmania* spp. promastigotes and amastigotes *in vitro*, including *L. panamensis* [77–81]. On these grounds and because of possible clinical implications, we generated a SbV-resistant *L. panamensis* strain to be tested for the antiparasitic activity of the distinct ALPs. Induction of resistance to SbV in *L. panamensis* promastigotes was achieved by continuous *in vitro* exposure of these parasites to increasing Glucantime concentrations for 1 year. The SbV-resistant *L. panamensis* strain was able to resist concentrations of Glucantime as high as 36 mg/ml, as assessed by XTT assays, a concentration 9-fold higher than the IC₅₀ (4 mg/ml) for wild type *L. panamensis* promastigotes. Because of the different susceptibility to SbV shown by certain *Leishmania* spp., depending on their promastigote or amastigote stage, SbV resistance of *L. panamensis* promastigotes was further evaluated by *in vivo* experiments in a hamster model. Two groups of eight hamsters each were inoculated in the nose with wild type and SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes, and then, after a 6-week post-infection period, when nose swelling was clearly detected, hamsters were injected intramuscularly with 40 mg/kg body weight Glucantime (SbV), on a daily basis for 4 weeks. As shown in Figure 6 (A and B), swelling was decreased in animals infected with wild type *L. panamensis*, but increased in animals infected with SbV-resistant *L. panamensis*. In addition, macrophages infected with *Leishmania* amastigotes were readily observed in smears from the nose of SbV-resistant *L. panamensis*-infected hamsters, but not from wild type *L. panamensis*-infected animals, treated with SbV (Figure 6B). Moreover, the parasitic burden in the nose of the two groups of animals indicated that the amount of viable wild type *L. panamensis* was dramatically diminished following treatment with the pentavalent antimonial drug, but the SbV-resistant *L. panamensis* parasites remained viable in the *in vivo* assay (data not shown). These results indicate that the generated SbV-resistant *L. panamensis* strain was highly resistant to pentavalent antimonial treatment both *in vitro* and *in vivo*.

Next, we tested *in vitro* the activity of the four ALPs edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine against both wild type and SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes by XTT assays. We found that all ALPs were effective in inhibiting proliferation of SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes showing similar IC₅₀ values to those found against wild type *L. panamensis* (Figure 6C).

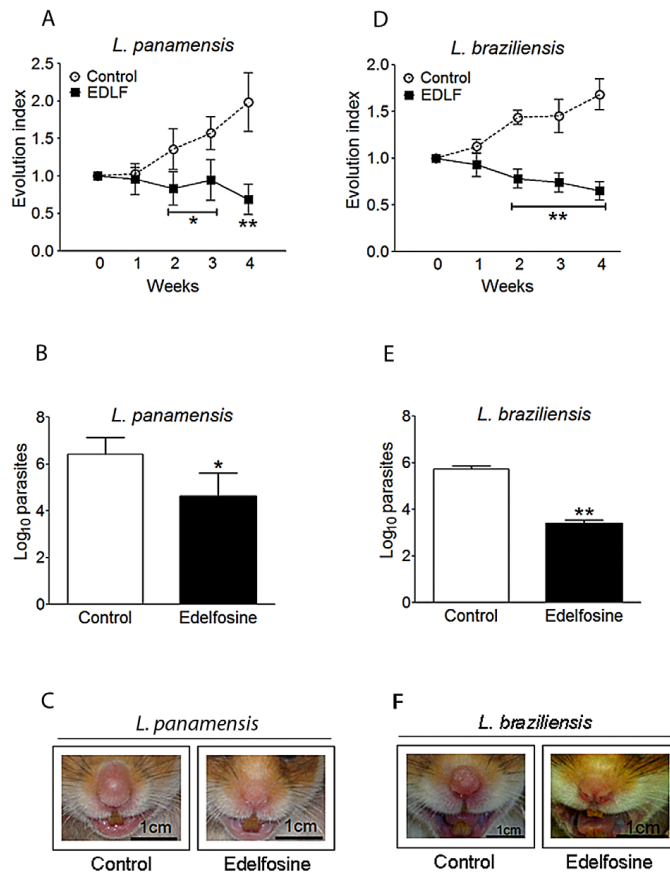


Figure 5. In vivo antileishmanial action of edelfosine in *L. panamensis*- and *L. braziliensis*-infected hamsters. Golden hamsters were infected with 1×10^6 *L. panamensis* or *L. braziliensis* promastigotes in the nose, and after swelling was perceptible, hamsters were randomized into drug-treated (26 mg edelfosine/kg of body weight, daily oral administration for 28 days) and control (water vehicle) groups of 7 hamsters each. (A, D) Lesion development was monitored by measuring nose thickness at regular intervals, and comparison to values obtained before treatment (evolution index). (B, E) Parasite load was determined by limiting dilution assays after completion of the 4-week *in vivo* assays. Data are means \pm SD ($n=7$). Asterisks indicate that the differences between control and edelfosine-treated groups are statistically significant. (*) $P<0.05$. (**) $P<0.01$. (C, F) Edelfosine treatment led to a dramatic decrease and amelioration in parasite-induced nose thickness and damage, as shown by representative photographs from drug-free control and edelfosine-treated hamsters. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g005

Edelfosine was the most effective ALP against SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes and no difference in edelfosine sensitivity was observed between wild type and SbV-resistant strains (Figure 6C).

Infection of hamsters with SbV-resistant *L. panamensis* parasites in the nose, showed that a daily oral treatment with edelfosine (26 mg/kg body weight) for 4 weeks led to a dramatic decrease in the evolution index, parasitic burden and local inflammation (Figure 6, D–F). The first signs of improvement were detected after about two weeks of treatment (Figure 6A). These data indicate that oral treatment with edelfosine was efficient against leishmaniasis caused by SbV-resistant *L. panamensis* parasites.

Differential time requirement for the generation of resistance to edelfosine and miltefosine in *Leishmania* spp. promastigotes

A major concern in anti-parasitic chemotherapy is the generation of drug resistance. Thus, we next analyzed the feasibility to generate drug resistance to miltefosine and edelfosine in different *Leishmania* species, by a gradual increase in drug concentration. We determined the time required to achieve resistance to 30 μ M miltefosine or edelfosine. This drug concentration could be appropriate to distinguish between specific and unspecific effects, and thereby drug resistance was considered

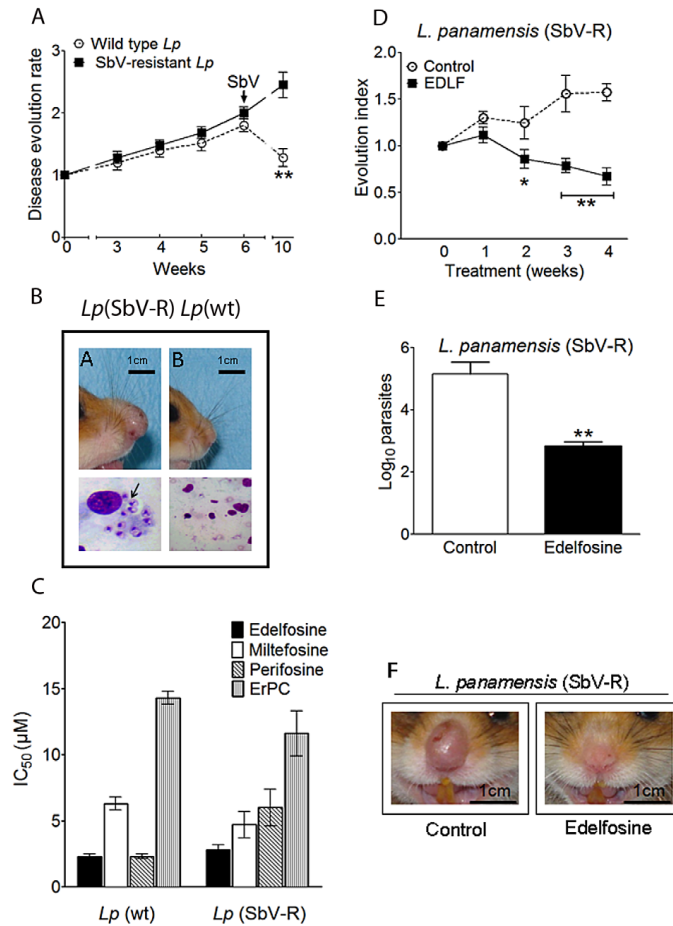


Figure 6. Sensitivity of SbV-resistant *L. panamensis* parasites to edelfosine. (A) Two groups of eight golden hamsters each were infected in the nose with wild type and SbV-resistant *L. panamensis* (*Lp*) promastigotes, and after the sixth week post-infection, they were treated with a daily intramuscular injection of Glucantime (SbV) for 4 weeks. Disease evolution rate was measured along the whole process through determining nose thickness as compared to figures obtained before infection. (B) Golden hamsters inoculated with SbV-resistant (SbV-R) *L. panamensis* (*Lp*) did not respond to treatment with Glucantime (inflamed nose) (upper left panel), and nose smears showed amastigotes within macrophages (arrow) following Giemsa staining (lower left panel). However, hamsters infected with wild type (wt) *L. panamensis* (*Lp*) fully responded to Glucantime treatment, showing uninflamed nose and negative staining for amastigotes in nose smears (upper and lower right panels). (C) IC₅₀ values of edelfosine, miltefosine, perifosine, and erucylphosphocholine (ErPC) for *in vitro* growth inhibition of wild type (wt) and SbV-resistant (SbV-R) *L. panamensis* (*Lp*) promastigotes were determined by XTT assays. (D–F) Golden hamsters were infected with 1×10^6 SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes in the nose, and after nose inflammation was evident, hamsters were randomized into drug-treated (26 mg edelfosine/kg of body weight, daily oral administration for 28 days) and control (water vehicle) groups of 7 hamsters each. (D) Lesion development was monitored by measuring nose thickness at regular intervals and comparison to values obtained before treatment (evolution index). (E) Parasite load was determined by limiting dilution assays after completion of the 4-week *in vivo* assay. (F) Edelfosine treatment led to a dramatic decrease and amelioration in parasite-induced nose thickness and damage, as shown by photographs from drug-free control and edelfosine-treated hamsters. Data are means \pm SD or representative experiments ($n=7$). Asterisks indicate that differences between control and edelfosine-treated groups, or between wild type and SbV-resistant parasites treated with SbV, are statistically significant. (*) $P<0.05$. (**) $P<0.01$. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g006

when parasites became resistant to a final drug concentration of 30 μM . We found that the continuous exposure of *L. donovani*, *L. major* and *L. panamensis* promastigotes to increasing amounts of miltefosine led to a rather rapid advent of drug resistance following 40–64 days of treatment (Table 2). However, relatively more protracted continuous treatments were required to generate edelfosine resistance in *L. major* and *L. panamensis* promastigotes (Table 2). Interestingly, whereas miltefosine treatment led to drug resistance in *L. donovani* after a relatively short period of time (Table 2), no drug resistance was detected after 100-day treatment of *L. donovani* with edelfosine (Table 2).

Discussion

Our results show the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of edelfosine against different *Leishmania* species. The ability of edelfosine to kill distinct *Leishmania* spp. promastigotes and amastigotes is in general higher than other ALPs, and the antileishmanial activity of ALPs ranked edelfosine > perifosine > miltefosine > erucylphosphocholine. Edelfosine also shows a higher capacity to induce an apoptosis-like cell death in *Leishmania* than miltefosine (Impavido), which has been approved as the first oral drug active against visceral leishmaniasis [2]. However, recent studies have challenged the efficacy of miltefosine against some cutaneous leishmaniasis [13–15,17–20], and relapse cases of miltefosine-treated parasites have been reported in visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis [82–84] as well as in HIV-positive patients [85,86].

Here, we have found that edelfosine shows an outstanding activity against a wide number of *Leishmania* spp. causing cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Edelfosine was able to kill parasites in both promastigote and amastigote forms through an apoptosis-like process that involved DNA degradation, as assessed by an increase in the percentage of cells with a hypodiploid DNA content. *Leishmania* parasites infect macrophages wherein they reside and replicate in a fusion competent vacuole (parasitophorous vacuole). Interestingly, edelfosine efficiently killed intracellular parasite amastigotes inside macrophages, without affecting the host cells. This killing activity on intracellular parasites seems to be mainly due to a direct action of the drug on the parasite, as edelfosine was unable to induce NO generation in macrophages, while a fluorescent edelfosine analog accumulated in the intracellular parasites within macrophages.

Table 2. Differential incubation times required for drug resistance generation.

<i>Leishmania</i> species	Time required for drug resistance (days)	
	Edelfosine	Miltefosine
Promastigotes		
<i>L. donovani</i>	NR	40
<i>L. major</i>	88	60
<i>L. panamensis</i>	89	64

Leishmania promastigotes were incubated with increasing concentrations of edelfosine and miltefosine until parasite viability in the presence of 30 μM drug was over 80% (considered as drug resistant). The maximum period of time evaluated for acquisition of the resistant phenotype was 100 days, and no resistance to edelfosine was generated in *L. donovani* promastigotes after this incubation time. NR, no resistance. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.t002

Our data also reveal a remarkable antileishmanial activity of edelfosine in several *in vivo* assays using mouse and hamster animal models infected with *L. major*, *L. panamensis* or *L. braziliensis*. To our knowledge this is the first study using hamsters as animal models for the *in vivo* evaluation of ALPs against cutaneous leishmaniasis. In addition, both *in vitro* and *in vivo* evidence showed that edelfosine was very effective against SbV-resistant *Leishmania* parasites. This is of importance as pentavalent antimonials Glucantime and Pentostam are being used in the treatment of leishmaniasis for over more than six decades, and still they are the first line drugs of choice and the traditional treatment worldwide. However, resistance to pentavalent antimonials is emerging as a result of their widespread use. A stark example of SbV resistance is well documented in Bihar (India), which houses approximately 90% of India's cases of visceral leishmaniasis, representing about 50% of the world's cases, and where resistance ended the usefulness of SbV more than a decade ago [2].

A major potential drawback in the use of miltefosine could be the relatively rapid generation of drug resistance *in vitro*. We have found here that generation of drug resistance required longer incubation times of *Leishmania* spp. with edelfosine than with miltefosine. Furthermore, whereas miltefosine generated drug resistance in *L. donovani* following a 40-day treatment, no resistance to edelfosine was detected after 100-day incubation.

It is worthwhile to note that miltefosine treatment has been reported to be unsatisfactory against infections caused by *L. braziliensis* [13–15,17–20], whereas here we have found a remarkable antiparasitic activity of edelfosine in *L. braziliensis*-infected hamsters. In addition, edelfosine offers a number of additional advantages as compared to miltefosine, such as the fact that edelfosine shows a potent anti-inflammatory action [87], and no apparent toxicity [87]. *Leishmania* parasites enter first neutrophils through the regulation of granule fusion processes that prevents any deleterious action on the parasite [88]. *Leishmania* parasites use polymorphonuclear neutrophils as intermediate hosts before their ultimate delivery to macrophages, following engulfment of parasite-infected neutrophils, and in this way *Leishmania* can escape the host immune system [89]. A significant part of the destruction caused by cutaneous leishmaniasis is due to severe inflammation at the site of infection in the skin, leading to ulceration [90]. Neutrophils are recruited into the site of infection during cutaneous leishmaniasis [91,92], and accumulation of neutrophils have been linked to tissue damage [93]. Edelfosine induces L-selectin (CD62L) shedding, and thus prevents neutrophil extravasation to the inflammation or infection site [87]. On these grounds, leishmaniasis could be ameliorated by oral treatment of edelfosine, which could reduce the parasite burden, by direct parasite killing, as well as the ulcerative process and subsequent scar formation, by a reduction in the recruitment of neutrophils into the site of infection.

A serious drawback of miltefosine is its teratogenic effects [24], however no studies have been conducted so far for a putative teratogenic action of edelfosine.

The studies reported here provide compelling evidence for the potent antileishmanial activity of edelfosine, which together with the low toxicity profile displayed by this ether lipid and its anti-inflammatory activity, warrants further clinical evaluation as a possible alternative treatment against leishmaniasis.

Acknowledgments

We are indebted to P. Kropf and B. G. Sierra for excellent and skillful assistance in the initial stages of this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FM REV JAV-P. Performed the experiments: REV JAV-P EY IM DLM JL-A. Analyzed the data: REV

JAV-P IM MM SMR CEM JL-A AM IDV FM. Contributed reagents/materials/analysis tools: IM IDV FM. Wrote the paper: FM REV JAV-P.

References

- WHO (2010) Control of the leishmaniases. World Health Organ Tech Rep Ser 949: 1–186.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561–1577.
- Hotez TJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, et al. (2004) Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis* 38: 871–878.
- Alvar J, Aparicio P, Asefia A, Den Boer M, Canavate C, et al. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334–359.
- van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, et al. (2010) Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 10: 184–194.
- Mishra J, Saxena A, Singh S (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 14: 1153–1169.
- Sundar S (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6: 849–854.
- Sundar S, Chatterjee M (2006) Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 123: 345–352.
- Palumbo E (2010) Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2: 147–150.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19: 111–126.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vicira RT, et al. (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103: 1–10.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, et al. (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347: 1739–1746.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, et al. (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266–1272.
- Velez I, Lopez L, Sanchez X, Mestra L, Rojas C, et al. (2010) Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83: 351–356.
- Machado PK, Ampuero J, Guimaraes LH, Villasboas L, Rocha AT, et al. (2010) Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania longiciliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e912.
- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, et al. (2011) Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Vannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84: 255–260.
- Soto J, Rea J, Valderrama M, Toledo J, Valda L, et al. (2009) Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 81: 387–389.
- Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea J, et al. (2007) Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis* 44: 350–356.
- Soto J, Berman J (2006) Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S34–40.
- Soto J, Soto P (2006) Oral miltefosine to treat leishmaniasis. *Biomedica* 26 Suppl 1: 207–217.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M (2006) Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S26–33.
- Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, et al. (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 196: 591–598.
- Rahman M, Ahmed BN, Faiz MA, Chowdhury MZ, Islam QT, et al. (2011) Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 85: 66–69.
- Sindermann H, Engel J (2006) Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S17–20.
- Perez-Victoria EJ, Sanchez-Canete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, et al. (2006) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 9: 26–39.
- Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, et al. (2003) Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 22: 380–387.
- Seifert K, Perez-Victoria EJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, et al. (2007) Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* 30: 229–235.
- Mollinedo F, Fernandez-Lana JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, et al. (1997) Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X_L. *Cancer Res* 57: 1320–1328.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estrella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, et al. (2010) *In vitro* and *in vivo* selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res* 16: 2046–2054.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estrella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, et al. (2010) Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 29: 3748–3757.
- Gajate C, Mollinedo F (2002) Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab* 3: 491–525.
- Gajate C, Mollinedo F (2001) The antitumor ether lipid ET-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98: 3960–3963.
- Gajate C, Mollinedo F (2007) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 109: 711–719.
- Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Gejjo E, et al. (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 200: 353–365.
- Croft SL, Snowdon D, Yardley V (1996) The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 38: 1041–1047.
- Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL (2002) Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81: 151–157.
- Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL (2004) Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 54: 704–710.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Pintero JE (2007) *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res* 100: 1155–1157.
- Cabrera-Serra MG, Valladares B, Pintero JE (2008) *In vivo* activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 108: 20–25.
- Verma NK, Dey CS (2004) Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3010–3015.
- Paris C, Loiseau PM, Borjes C, Breard J (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 852–859.
- Taylor VM, Munoz DL, Cedeno DL, Velez ID, Jones MA, et al. (2010) *Leishmania tarentolae*: utility as an *in vitro* model for screening of antileishmanial agents. *Exp Parasitol* 126: 471–475.
- David-Gordonnier MH, Gajate C, Olmea O, Laine W, de la Iglesia-Vicente J, et al. (2005) DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. *Chem Biol* 12: 1201–1210.
- Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, Lazaro M, Hernandez-De Rojas A, et al. (2000) Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH₃-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* 86: 208–218.
- Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, Mollinedo F (2000) Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X_L and cell cycle arrest. *Cancer Res* 60: 2651–2659.
- Quesada E, Delgado J, Gajate C, Mollinedo F, Acuna AU, et al. (2004) Fluorescent phenylpolyene analogues of the ether phospholipid edelfosine for the selective labeling of cancer cells. *J Med Chem* 47: 5333–5335.
- Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, et al. (2011) Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis* 2: e158.
- Henaou HH, Osorio Y, Saravia NG, Gomez A, Travi B (2004) Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application. *Biomedica* 24: 393–402.
- Estrella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F, et al. (2009) Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. *Clin Cancer Res* 15: 858–864.
- Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir E-H, Fonteriz RI, Alvarez, et al. (2012) Antitumor alkyl-lysophospholipid analogue edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* (In press).
- Gajate C, Fonteriz RI, Cabaner C, Alvarez-Noves G, Alvarez-Rodriguez Y, et al. (2000) Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* 85: 674–682.

52. Nieto-Miguel T, Gajate C, Mollinedo F (2006) Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic *versus* solid tumor cells. *J Biol Chem* 281: 14833–14840.
53. Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F (2009) Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS ONE* 4: e5044.
54. Saugar JM, Delgado J, Hornillos V, Laque-Ortega JR, Amat-Guerri F, et al. (2007) Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. *J Med Chem* 50: 5994–6003.
55. Mollinedo F, Martínez-Dalmau R, Modolell M (1993) Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH₃. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 603–609.
56. Alonso MT, Gajate C, Mollinedo F, Modolell M, Alvarez J, et al. (1997) Dissociation of the effects of the antitumour ether lipid ET-18-OCH₃ on cytosolic calcium and on apoptosis. *Br J Pharmacol* 121: 1364–1368.
57. Varela MR, Muñoz DL, Robledo SM, Kollí BK, Dutta S, et al. (2009) *Leishmania (Viannia) panamensis*: an *in vitro* assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp Parasitol* 122: 134–139.
58. Kolodziej H, Kiderlen AF (2005) Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 66: 2056–2071.
59. Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, et al. (2002) Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO. *Int J Mol Med* 9: 131–134.
60. Ascenzi P, Bocedi A, Gradoni L (2003) The anti-parasitic effects of nitric oxide. *IUBMB Life* 55: 573–578.
61. Eae I, Zeisig R, Arndt D (1995) Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 350–356.
62. Kuhlencordt A, Maniera T, Eibl H, Unger C (1992) Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1630–1634.
63. Le Fichoux Y, Rousseau D, Ferrua B, Ruetter S, Lelievre A, et al. (1998) Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 654–658.
64. Murray HW (2000) Suppression of posttreatment recurrence of experimental visceral leishmaniasis in T-cell-deficient mice by oral miltefosine. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3235–3236.
65. Serrano-Martín X, Payares G, De Lucca M, Martínez JC, Mendoza-Leon A, et al. (2009) Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5108–5113.
66. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE (2001) The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166: 1912–1920.
67. Sacks DL, Melby PC (2001) Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr Protoc Immunol* Chapter 19: Unit 19.12.
68. Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G (1995) Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89 Suppl 1: 55–73.
69. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT (1998) Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 59: 49–52.
70. Gonzalez U, Pinar M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, et al. (2009) Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004834.
71. Gupta R, Kushawaha PK, Samant M, Jaiswal AK, Baharia RK, et al. (2012) Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. *J Antimicrob Chemother* 67: 440–443.
72. Sundar S, Rai M (2005) Treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* 6: 2821–2829.
73. Chakravarty J, Sundar S (2010) Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2: 167–176.
74. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, et al. (2006) American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 194: 1168–1175.
75. Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, et al. (2007) Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846–1851.
76. Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D (1999) Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 278–282.
77. Lucumi A, Robledo S, Gama V, Saravia NG (1998) Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1990–1995.
78. Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG (1999) Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol* 85: 360–366.
79. Walker J, Saravia NG (2004) Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *J Parasitol* 90: 1155–1162.
80. Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, Meamar AR, Roy G, et al. (2007) Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmanial drugs. *Parasitol Res* 101: 1319–1322.
81. Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, et al. (2012) The effect of verapamil on *in vitro* susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate. *Parasitol Res* 110: 1113–1117.
82. Pandey BD, Pandey K, Kaneko O, Yanagi T, Hirayama K (2009) Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. *Am J Trop Med Hyg* 80: 580–582.
83. Calvopiña M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y (2006) Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1074–1077.
84. Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, et al. (2007) Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol* 156: 1328–1335.
85. Troya J, Casquero A, Refoyo E, Fernandez-Guerrero ML, Gorgolas M (2008) Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Scand J Infect Dis* 40: 78–80.
86. Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W (2004) Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. *Clin Infect Dis* 39: 1520–1523.
87. Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Janez E, Justies N, et al. (2009) Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 439–449.
88. Mollinedo F, Jansen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J (2010) Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *J Biol Chem* 285: 34528–34536.
89. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, et al. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173: 6521–6525.
90. Tasew G, Nysten S, Lieke T, Lemu B, Meless H, et al. (2010) Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e844.
91. Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarenco J, Barral-Netto M, et al. (2007) Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg* 77: 854–859.
92. Bretana A, Avila JL, Lizardo G, Couvit J, Rondon AJ (1983) *Leishmania* species: comparative ultrastructure of experimental nodules and diffuse human cutaneous lesions in American leishmaniasis. *Exp Parasitol* 55: 377–385.
93. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, et al. (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182: 3039–3046.

ARTÍCULO 5

**Polyphenols as inhibitors of NO
production in
LPS-stimulated rat
macrophages**

O. Nešuta, J. López-Abán,
Edward Yepes, F. Shariati,
A. Navrátilova, K. Šmjkal,
M. Žemlička, Antonio Muro.

*En: Journal of Natural
Pharmaceuticals 2011,
Vol 2 Issue 1*

Polyphenols as inhibitors of NO production in LPS-stimulated rat macrophages

O. Nešuta^{1,2}, J. López-Abán¹, F. Shariati¹, E. Yepes¹, A. Navrátilová², K. Šmejkal², M. Žemlička², A. Muro¹

ABSTRACT

Background: To test the inhibition of nitric oxide (NO) release by polyphenols isolated from *Maclura pomifera*, *Morus alba*, *Paulownia tomentosa* and *Schisandra chinensis*. **Materials and Methods:** Polyphenols were isolated from selected plants and tested for their ability to inhibit release of nitrite oxide (NO) from bacterial lipopolysaccharide prestimulated rat macrophages. **Results:** Among the panel of compounds tested, the prenylated isoflavone pomiferin, the geranylated flavanone 3'-O-methyl-5'-hydroxydiploacene and the dibenzocyclooctadiene lignans, g-schisandrin and schisandrin showed significantly decreased levels of NO at micromolar concentrations. Results show the potential of these compounds as NO-balancing agents in some inflammatory-based diseases. **Conclusion:** The low toxicity proved on native macrophages allows these compounds to be studied more deeply on cytotoxic activity against cancer cells because of the potential selectivity of the toxic effect toward cancer cells.

¹Laboratory of Molecular Immunology and Parasitology, CIETUS, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Avda Licenciado Meléndez Nieto s/n, 37007, Salamanca, Spain, ²Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, Palackého 1-3, 61242, Brno, Czech Republic

Key words: Cytotoxicity, *Maclura pomifera*, nitric oxide, *Paulownia tomentosa*, *Schisandra chinensis*

INTRODUCTION

Nitrite oxide (NO) is a molecule produced by several cells of the human body by an enzyme called NO-synthase (NOS). The different isoforms of NOS that can be distinguished are a constitutive and inducible NOS (iNOS) and then, e.g. endothelial or neural. NO serves as a signal molecule in many physiological processes. In cells involved in the immunity system, as are macrophages, NO can be massively produced by iNOS as a response to the pathological stimulation of these cells. NO is a part of a large group of structurally different compounds generally named reactive oxygen or nitrogen reactive species (ROS/RNS). These reactive species can interact with many biologic systems and can affect different cell functions. NO is considered as an important mediator of inflammation, a relaxing factor of endothelium and also as a source of cytotoxic substances. Its activation could trigger or support an immunity reaction against various agents, such as bacterial or parasitic infections.^[1-3] On the other hand, uncontrolled production of NO can cause a multiple organic injury described, for example, during a septic shock or

endotoxemia.^[4] Therefore, equilibrium in NO production is necessary for maintenance of a healthy organism.

Polyphenols are a heterogenic group of plant secondary metabolites. They possess plenty of known biologic effects, e.g. on the cardiovascular system or antibacterial, antiviral or antitumoral activities.^[5-8] Among these activities, the ROS/RNS scavenging activity is especially well described. The antioxidant effect of polyphenols is sometimes dubious, e.g. epigallocatechin gallate activates endothelial NOS and thereby increases NO production *ex vivo*^[9] but, on the other hand, the same compound inhibits iNOS expression and therefore decreases NO production in the HaCaT cell line.^[10] The antiradical activity of some compounds used in our assay was proved previously: prenylated isoflavone pomiferin (**1**) from *Maclura pomifera* fruits showed a significant protective activity of DNA exposed to oxygen radicals and anti-EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase) activity tested on mouse hepatic microsomes *in vitro*.^[11] Pomiferin (**1**) is a good scavenger of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), which showed an ability to inhibit tyrosine nitration^[12] and lipid



Address for correspondence:
Prof. Karel Šmejkal,
Department of Natural
Drugs, Faculty of
Pharmacy, University
of Veterinary and
Pharmaceutical Sciences
Brno, Palackého 1-3,
61242 Brno, Czech
Republic.
E-mail: karel.mejkal@post.cz

peroxidation of purified sunflower triacylglycerol *in vitro*.^[13] Geranylated flavonoids and extracts from *Paulownia tomentosa* Steud. fruits previously showed some antiradical properties in DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assays.^[14,15] Dibenzoctadiene lignans from *Schisandra chinensis* Turcz. fruits display lots of biological activities, like hepatoprotective, antioxidant and antiviral effects.^[16-18]

Previous studies described that, especially, the *ortho*-dihydroxy structure on the aromatic ring is essential for the radical scavenging properties of polyphenols.^[8,11] This is especially known for direct scavenging of free radicals, as are synthetic DPPH and ABTS, natural hydroxyl radical anion and others. The antiradical activity can also arise from the inhibition of enzymatic systems, which are involved in the production of radicals or from enhancement of systems that combat the free reactive oxygen and nitrogen species. Aside from these facts, this study was carried out with the aim to verify whether the chosen flavonoid and dibenzoctadiene compounds could affect NO production in macrophages. This means whether they help with an immunity response by increasing or whether they protect cells against exaggerated free radical activity by decreasing the NO level. Moreover, the evaluation of cytotoxicity against native macrophage cells was important because of their inevitable role in protection of the organism and possibility of selective toxicity toward cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Samples

Compounds isolated from *S. chinensis* (schisandrin (4), deoxyschisandrin, γ -schisandrin (5), gomisin N, gomisin J), *P. tomentosa* (3'-*O*-methyl-5'-hydroxydiploacene (6), 3'-*O*-methyl-5'-*O*-methyl-diploacene, 3'-*O*-methyl-diploacene, 3'-*O*-methyl-diploacene, mimulone, diploacene (3)), *M. alba* (kuwanone E, 3'-*O*-methylkuwanone E, cudraflavone B) and *M. pomifera* (pomiferin (1), osajin (2)), as previously described [Figure 1],^[11,18,19] in purity >95% (HPLC-verified), were dissolved in 40% DMSO with 10% 0.1 M NaOH and stock solutions of concentrations 0.25, 2.5, 25, 50, 125 and 250 μ M were prepared. In our experiments, the final concentration of DMSO in cell culture never exceeded 0.4%, which did not affect the viability of the cells.

Isolation of Alveolar Macrophages

Cells were obtained by a modified method of bronchoalveolar lavage. Male Wistar rats (250 g, IFFA Credo, Spain) were narcotized i.p. by sodium pentobarbital (100 mg/kg body weight). Softly, 6 mL aliquots of pyrogen-free phosphate buffer (PBS, pH 7.4) were injected into the lungs using a sterile Teflon catheter and the lavage

was performed. Fifty milliliters of the suspension of cells was subsequently centrifuged (1400g, 10 min) and the supernatant was separated. The cells were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Sigma) and cultured at 37°C and 5% CO₂.

Cell Culture Treatment

Alveolar macrophages (10⁶/well) were plated in culture 24-well plates and allowed to adhere for 2 h at 37°C and 5% CO₂. Non-adhered cells were removed by gentle washing with the complete Dulbecco medium and 1 mL of the fresh complete medium was added for future cell culture. The adhered alveolar macrophages were incubated alone (negative control, 0) with 10 μ g of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (positive control, LPS, serotype O55:B5, Sigma), with different concentrations of the compounds tested (ranging from 0.25 to 250 μ M) or with a combination of 10 μ g LPS with a further addition of compounds tested after 1 h of LPS stimulation. After 18 h of incubation at 37°C and 5% CO₂, the supernatant was separated by centrifugation (500g, 10 min) and stored at -80°C until further analysis. Subsequently, the viability of the cells was evaluated by MTT assay using mitochondrial reduction of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thiazolyl Blue, Sigma). Cells were incubated for 1 h at 37°C with 200 μ L of thiazolyl blue, the resulting formazan was diluted with ethanol and the absorbance was measured at 550 nm (620 nm as a reference). The viability was expressed as percentage of the living cells in comparison with the control.

Nitrite Assay

The quantity of nitrites in the supernatant was measured using the colorimetric method based on the Griess reaction. The cell supernatants were collocated in triplicate aliquots of 100 μ L and cultivated with 50 μ L of freshly prepared Griess reagents (1% sulphanilamide

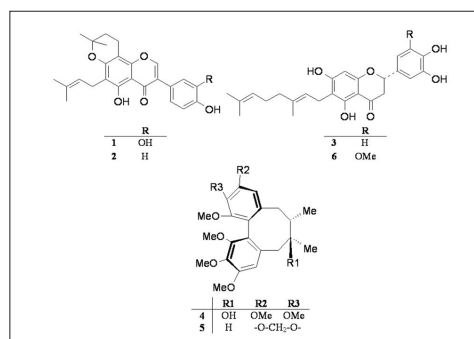


Figure 1: Structures of active compounds

and 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride in 2.5% ortho-phosphoric acid) at room temperature for 15 min. Then, the absorbance was measured at 550 nm (620 nm as a reference). The quantity of NO²⁻ was evaluated according to the calibration curve using sodium nitrite as a standard. All samples were compared with the complete medium cultivated at the same plate without cells as a blank sample. There was no interference between NOS inhibitor and NO²⁻ assay. Results were expressed in nanomols of NO²⁻/10⁶ of macrophages.

Statistical Analysis

All experiments were run in independent triplicates. All data were expressed as means ± standard error of mean (SEM). The overall differences among the groups were compared by analysis of variance (ANOVA) with one coefficient of variation. Differences among the groups were determined by an ANOVA test, and Fishers Protected Least Significant Difference (PLSD) was applied. Statistically significant differences were considered at the $P < 0.05$ level.

RESULTS AND DISCUSSION

In the first part of the experiment, the cytotoxicity of all tested compounds on native rat macrophages was evaluated using the MTT assay to get sufficient data for further testing of compounds on NO production. The cells were incubated with six different concentrations of compounds tested, ranging between 0.25 and 250 μM. The measurement of cell viability has indicated the cytotoxicity of two compounds only. Diplacone (2) testing showed in a concentration of 250 μM, 50.3 ± 9.1% of living cells in comparison with the control; pomiferin (1) 54.9 ± 16.9% in a concentration of 125 μM. In all the remaining cytotoxicity experiments, the viability of the macrophages was more than 90%. These results correspond to no cytotoxicity of osajin (2) and low cytotoxicity of pomiferin (1) on human hepatocytes.^[20] The antiproliferative activity of diplacone (3) is known.^[19,21] This is the first cytotoxicity assay of 1-3 on native non-cancer cells, and the relatively low toxicity of the compounds tested allows these compounds to be tested more deeply to confirm their cytotoxic potential against cancer cells. The potential selectivity of 1-3 toward the cancer cell lines could be beneficial if used in the treatment of a cancer disease.^[14,19]

In the same stage of the experiment, we studied the possible NO production-inducing effect *in vitro* on macrophages without LPS pre-stimulation. None of the compounds tested have shown the activity, using LPS only as a control.

Next, lignans (schisandrin (4), deoxyschisandrin, γ-schisandrin (5) gomisin N, gomisin J) and chosen

flavonoids (pomiferin (1), osajin (2), 3'-O-methyl-5'-hydroxydiploaone (6)) were tested on modulation of NO production using pre-stimulation by LPS. Compounds were tested in concentrations ranging from 0.25 to 250 μM, but only concentrations of 50, 125 and 250 μM were displayed due to the low or no activity at lower concentrations. The results of the experiments are summarized in Figure 2. The most active substance was found to be pomiferin (1), which significantly lowered the production of NO in the macrophages ($P < 0.05$) at a concentration of 50 μM, showing the inhibition of 35.4 ± 6.3%. Some activity was also shown by schisandrin (4, 25.0 ± 9.2%), γ-schisandrin (5, 28.1 ± 11.7%) and 3'-O-methyl-5'-hydroxydiploaone (6, 40.8 ± 0.8%), but, unfortunately, only at concentrations of 250 μM. In the case of pomiferin (1), at concentrations of 125 and 250 μM, there was interference between its activity and cytotoxicity. γ-schisandrin (5) and 3'-O-methyl-5'-hydroxydiploaone (6) have demonstrated a statistically significant inhibition at a concentration of 25 μM, but our data analyses showed no linear concentration-activity relationship (data not shown).

Stimulation of NO production by LPS at the macrophages and decrease of NO production caused by different agents has been described previously. Flavonoids has been described to decrease the NO level after LPS stimulation of murine macrophages at concentrations of tens of micromoles.^[22] A prenylated chalcone decreased the level of NO in the RAW 264.7 cell line after LPS stimulation in a concentration-dependent manner.^[23]

Dibenzocyclooctadiene lignans are well known to possess an antiradical activity. *S. chinensis* lignans (γ-schisandrin (5), gomisin K3) inhibit superoxide anion production in the xanthin/xanthin oxidase system that is comparable or

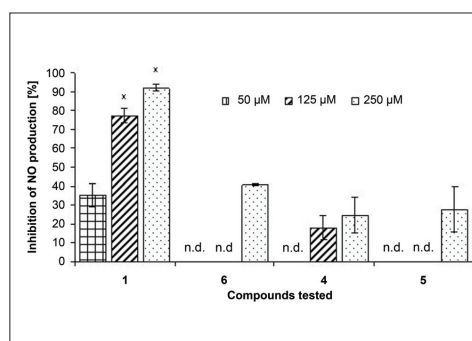


Figure 2: Comparison of active compounds 1, 4, 5 and 6 in assay of NO inhibition production in LPS-stimulated macrophages. Activities are expressed as percentage of inhibition of NO production at concentrations 50, 125 and 250 μM, as a mean ± SEM. Each experiment was run in triplicate * cell viability was less than 90%. N.d. – no inhibition of NO production detected

better than vitamin E, but in millimolar concentrations, which are probably not suitable for practical usage.^[24] The scavenging effects of these compounds on hydroxyl radical and superoxide, which was greater than the effects of vitamin E and C, were shown in different experimental models, but again in millimolar concentrations.^[25] The activity of *S. chinensis* lignans is probably connected with the stimulation of the antiradical defense of organisms. γ -schisandrin (**5**) increases the level and regeneration of cellular glutathione;^[26] deoxyschisandrin, γ -schisandrin (**5**), schisandrin (**4**), gomisin A, gomisin K3 and wuweizisu C inhibit lipoperoxidation.^[27] High levels of free radicals were observed at ischemic and reperfusion damage of the cell tissue. Studies modeling cerebral ischemia and reperfusion *in vitro* show the beneficial effect of gomisin K₃ and γ -schisandrin (**5**), which inhibited oxidative mitochondrial damage, lowered production of malondialdehyde and inhibited decrease of ATPase activity after reperfusion.^[28] Some recent experiments proved that these data showed only the low activity of lignans in assays using synthetic radicals.^[18] Only schisandrin (**4**) and γ -schisandrin (**5**) were active in our study. The ability of schisandrin (**4**) and γ -schisandrin (**5**) to reduce the NO production in the cell tissue after LPS stimulation agrees with a previous report of Opletal and Opletalová, who described that an alcoholic extract from *S. chinensis* fruits containing dibenzocyclooctadiene lignans inhibit the quantity of NO in saliva obtained from sportsmen undergoing physical stress.^[29] They tested the mixture of compounds and our study showed the compounds responsible for this activity.

The activity of the chosen prenylated flavonoids (**1**, **2**, **6**) was also compared. As Van Hoorn *et al.* previously described,^[30] the *ortho*-dihydroxy moiety on the ring B of flavonoid is essential for the direct radical-scavenging properties of many flavonoids. 3'-*O*-methyl-5'-hydroxydiploacene (**6**) and pomiferin (**1**) satisfy this substitution and, therefore, we could expect their effect. The potential to affect NO level can be caused by inhibition of NO production or by direct scavenging of the produced NO. Previously, the presence of the *ortho*-dihydroxy moiety important for peroxynitrite scavenging activity was described for **1**.^[11] The effect of reduction of NO production in murine macrophages caused by inhibition of iNOS gene expression was described for 8-prenylated flavonoids by Paoletti *et al.*^[31] This was also shown by a study of Cheon *et al.*, showing the potential of various prenylated compounds to inhibit NO production by gene expression inhibition of iNOS, but no direct inhibition of this enzyme.^[32] The ability to change the level of NO was discovered also at prenylflavonoids isolated from hops.^[32,33]

Uncontrolled production of NO is observed in the massive inflammation or bacterial infections and those, according

to our results, chosen *S. chinensis* lignans or various prenylated flavonoids can be used as radical-balancing agents in the treatment of diseases connected with radical damage.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by GACR 522/07/0995 and IGA VFU Brno 7/2010/FaF. Thanks are also due to the Erasmus scholarship for O. Nešuta. The authors would also like to thanks the Project CIETUS 2010.

REFERENCES

- Andrade MA, Siles-Lucas M, López-Abán J, Nogal-Ruiz JJ, Pérez-Arellano JL, Martínez-Fernández AR, *et al.* Trichinella: Differing effects of antigens from encapsulated and non-encapsulated species on *in vitro* nitric oxide production. *Vet Parasitol* 2007;143:86-90.
- Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 2001;167:893-901.
- Losada JP. Producción de óxido nítrico en el tracto respiratorio inferior. Doctoral Thesis, Universidad de Salamanca, Facultad de Medicina, Salamanca, Spain; 1997.
- Thiemermann Ch. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 1997;29:159-66.
- Sies H. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:2-5.
- Pan L, Chai H, Kinghorn AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemistry Lett* 2010;3:1-8.
- Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:343-56.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:67-202.
- Kim JA, Formoso G, Li Y, Ponteza MA, Marasciulo KL, Montagnani M, *et al.* Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilatation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem* 2007;282:13736-45.
- Song XZ, Bi ZG, Xu AE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the expression of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide induced by ultraviolet B in HaCat cells. *Chin Med J* 2006;119:282-7.
- Vesela D, Kubinova R, Muselik J, Zemlicka M, Suchy V. Antioxidative and EROD activities of osajin and pomiferin. *Fitoterapia* 2004;75:209-11.
- Diopan V, Babula P, Shestivska V, Adam V, Zemlicka M, Dvorska M, *et al.* Electrochemical and spectrometric study of antioxidant activity of pomiferin, isopomiferin, osajin and catalposide. *J Pharm Biomed Anal* 2008;48:127-33.
- Hamed SF, Hussein AA. Effect of *Maclura pomifera* total acetonetic extract, pomiferin and osajin on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Grasas Y Aceites* 2005;56:21-4.
- Smejkal K, Grycova L, Marek R, Lemiere F, Jankovská D, Forejtníková H, *et al.* C-Geranyl compounds from *Paulownia tomentosa* fruits. *J Nat Prod* 2007;70:1244-8.
- Asai T, Hara N, Kobayashi S, Kohshima S, Fujimoto Y. Geranylated flavanones from the secretion on the surface of the immature fruits of *Paulownia tomentosa*. *Phytochemistry* 2008;69:1234-41.
- Panossian A, Wikman G. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail.: An overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol* 2008;118:183-212.

17. Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia*. 1999;70:451-71.
18. Šmejkal K, Šlapetová T, Krměčik P, Kubínová R, Suchý P, Dall'Acqua S, et al. Evaluation of the Antiradical Activity of Schisandra Chinensis Lignans Using Different Experimental Models. *Molecules* 2010;15:1223-31.
19. Smejkal K, Babula P, Šlapetova T, Brognara E, Dall'Acqua S, Zemlicka M, et al. Cytotoxic activity of C-geranyl compounds from *Paulownia tomentosa* fruits. *Planta Med* 2008;74:1488-91.
20. Son IH, Chung IM, Lee SI, Yang HD, Moon HI. Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of *Maclura pomifera*. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:4753-5.
21. Yoder BJ, Cao S, Norris A, Miller JS, Ratovoson F, Razafitsalama J, et al. Cytotoxic prenylated stilbenes and flavonoids from *Macaranga alnifolia* from the Madagascar rainforest. *J Nat Prod* 2007;70:342-6.
22. Król W, Czuba ZP, Threadgill MD, Cunninghams BD, Pietsz G. Inhibition of nitric oxide (NO[•]) production in murine macrophages by flavones. *Biochem Pharmacol* 1995;7:1031-5.
23. Cheng ZJ, Lin CN, Hwang TL, Teng CM. Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochem Pharmacol* 2001;61:939-46.
24. Hua L, Geng-Tao L. Anti-oxidant activity of dibenzocyclooctene lignans isolated from Schisandraceae. *Planta Med* 1992;58:311-3.
25. Zhao BL, Li XJ, Liu GT, Jia WY, Xin WJ. Scavenging effect of schisandrins on active oxygen radicals. *Cell Biol Int Rep* 1990;14:99-109.
26. Chiu PY, Ko KM. Schisandrin B-induced increase in cellular glutathione level and protection against oxidant injury are mediated by the enhancement of glutathione synthesis and regeneration in AML12 and H9C2 cells. *Biofactors* 2006;26:221-30.
27. Hua L, Geng-Tao L. Effect of dibenzo[a,c]cyclooctadiene lignans isolated from *Fructus schizandrae* on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity. *Chem Biol Interact* 1991;78:77-84.
28. Ji-Yan X, Geng-Tao L, Hua-Lin W, Yan P. Antioxidant acidity of two dibenzocyclooctadiene lignans on the aged and ischemic brain in rats. *Free Rad Biol Med* 1992;12:127-35.
29. Opletal L, Opletalová V. *Pokroky ve farmacii*. Praha: Avicenum; 1990.
30. Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'rabet L, De Bont DB, et al. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol* 2002;451:111-8.
31. Paoletti T, Fallarini S, Gugliesi F, Minassi A, Appendino G, Lombardi G. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. *Eur J Pharmacol* 2009;620:120-30.
32. Cheon BS, Kim YH, Son KS, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7. *Planta Med* 2000;66:596-600.
33. Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Canc Ther* 2002;1:959-69.

Cite this article as: Nešuta O, López-Abán J, Shariati F, Yepes E, Navrátilová A, Šmejkal K, et al. Polyphenols as inhibitors of NO production in LPS-stimulated rat macrophages. *J Nat Pharm* 2011;2:15-9.

Source of Support: GACR 522/07/0995 and IGA VFU Brno 7/2010/FaF.
Conflict of Interest: None declared.

Author Help: Online Submission of the Manuscripts

Articles can be submitted online from <http://www.journalonweb.com>. For online submission articles should be prepared in two files (first page file and article file). Images should be submitted separately.

- 1) **First Page File:**
Prepare the title page, covering letter, acknowledgement, etc., using a word processor program. All information which can reveal your identity should be here. Use text/rtf/doc/pdf files. Do not zip the files.
- 2) **Article file:**
The main text of the article, beginning from Abstract till References (including tables) should be in this file. Do not include any information (such as acknowledgement, your names in page headers, etc.) in this file. Use text/rtf/doc/pdf files. Do not zip the files. Limit the file size to 1 MB. Do not incorporate images in the file. If file size is large, graphs can be submitted as images separately without incorporating them in the article file to reduce the size of the file.
- 3) **Images:**
Submit good quality color images. Each image should be less than **4096 kb (4 MB)** in size. Size of the image can be reduced by decreasing the actual height and width of the images (keep up to about 6 inches and up to about 1200 pixels) or by reducing the quality of image. JPEG is the most suitable file format. The image quality should be good enough to judge the scientific value of the image. Always retain a good quality, high resolution image for print purpose. This high resolution image should be sent to the editorial office at the time of sending a revised article.
- 4) **Legends:**
Legends for the figures/images should be included at the end of the article file.

ARTÍCULO 6

**Geohelmintosis
y nematodosis tisulares**

A. Muro,
J. Dib,
E. Yepes,
y
J.L Pérez-Arellano.

*En: Medicine. 2010, 10(55):
pp 3739-46. Ed. Elsevier España.*



Geohelmintosis y nematodosis tisulares

A. Muro^a, J. Dib^a, E. Yepes^a y J.L. Pérez-Arellano^{b,c}

^aLaboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. CIETUS. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Salamanca. España.

^bDepartamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas. Las Palmas. Gran Canaria. España.

^cUnidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Servicio de Medicina Interna. Hospital Insular de Las Palmas. Las Palmas. Gran Canaria. España.

Introducción

Estructuramos esta actualización en tres grandes apartados. Los dos primeros están dedicados al estudio de las geohelmintosis, la parasitosis más prevalentes en el mundo¹. Adoptan este nombre debido a que sus fases de huevo o larvarias se desarrollan en el suelo antes de ser capaces de infectar al ser humano. Inicialmente se abordará el estudio de la ascariosis, trichuriasis y uncinariosis de forma conjunta, señalando las características comunes y diferentes que existen entre estas entidades. A continuación estudiaremos la estrogiloidosis, una geohelmintosis que presenta importantes diferencias patogénicas, clínicas, diagnósticas y terapéuticas. Por último, describiremos las principales nematodosis tisulares (anisaquiosis, toxocariosis y triquinelosis), finalizando con una breve descripción de otras nematodosis de menor importancia clínica. El estudio de la enterobiosis se incluye en la actualización sobre el manejo general y extrahospitalario del paciente con parasitosis de esta misma unidad temática.

Ascariosis, tricurosis y uncinariosis

Más de un billón de personas están infectadas por una de las cuatro especies de nematodos siguientes: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y uncinarias o *hookworms* (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*), constituyendo un esencial problema de salud pública en todo el mundo².

Biología, estructura y ciclo biológico

Estas geohelmintosis presentan ciclos biológicos similares pero no iguales. Todos los parásitos señalados tienen fases adultas con morfología cilíndrica, sin segmentación corporal,

PUNTOS CLAVE

Epidemiología. Las geohelmintosis son las parasitosis que presentan una mayor prevalencia. Han sido y siguen siendo un importante problema de salud pública en los países tropicales y subtropicales en los que las deficiencias higiénicas y de saneamiento favorecen su transmisión.

Patogenia. La respuesta inmunológica frente a estos parásitos es mediada principalmente por los linfocitos Th2, desarrollando múltiples mecanismos de evasión que permiten su supervivencia en el hospedador durante largos periodos de tiempo (años).

Clínica. El patrón clínico de las geohelmintosis incluye manifestaciones digestivas inespecíficas y datos peculiares asociados a cada parásito específico.

Estrongiloidosis. La administración de glucocorticoides y/o la infección por HTLV-I son factores que favorecen la presencia de hiperinfección por *Strongyloides* spp. El método de elección para el diagnóstico de las geohelmintosis es el estudio coproparasitario y las técnicas especiales para la detección de larvas de *Strongyloides* spp. Los benzimidazoles son los fármacos de elección para el tratamiento de las geohelmintosis, excepto en la estrogiloidosis que es la ivermectina.

Anisaquiosis y triquinelosis. Su adquisición se produce por consumo de pescados y carnes crudas o poco cocinadas.

Toxocariosis. Es más frecuente en niños y cursa habitualmente de forma asintomática, aunque ocasionalmente da lugar a cuadros como el síndrome de larva visceral emigrante o la toxocariosis ocular.

Nematodosis. La serología es la técnica de elección para el diagnóstico de las nematodosis tisulares. Una de las nematodosis tisulares emergentes en viajeros es la gnathostomosis.

con una capa externa denominada cutícula, una capa muscular y una cavidad celómica o pseudocele. Entre la cutícula y la capa muscular se encuentra la hipodermis. Además, hay una lámina basal que separa la hipodermis del pseudocele. La cavidad celómica incluye el tubo digestivo, sistema excretor,

nervioso y reproductor con sexos separados. Las hembras producen huevos que eclosionan dentro del hospedador o en el medio ambiente, de los cuales emerge una larva que pasa por cuatro fases hasta llegar a la fase de adulto.

Ascaris lumbricoides

Es el nematodo intestinal de mayor tamaño (*round worm*). La hembra adulta mide de 20 a 30 cm de longitud y entre 3-6 cm de diámetro; los machos son de menor tamaño. La vida media de los parásitos adultos es hasta de un año y cuando mueren se eliminan espontáneamente. Residen en la luz del intestino delgado (principalmente en el yeyuno) y, aunque no tienen órganos de fijación, se mantienen adheridos a las paredes del intestino evitando ser arrastrados por el peristaltismo intestinal gracias a la capa muscular que tienen debajo de la cutícula. La hembra grávida elimina al exterior los huevos inmaduros. Se calcula que una hembra puede contener 27 millones de huevos, con una oviposición entre 200.000 a 240.000 huevos por día. Los huevos maduran en el medio externo en un periodo de seis semanas y, en condiciones ambientales favorables (temperaturas entre 15 y 30° C), tienen forma oval o redondeada, miden entre 70 x 30 µm y poseen una cubierta mamelonada. El mecanismo de transmisión se debe a la ingestión de los huevos embrionados (fig. 1) que eclosionan en el intestino delgado saliendo una larva de pequeño tamaño (250 µm de diámetro) que penetra por la pared intestinal y migra por el sistema venoso hasta llegar inicialmente al corazón derecho y posteriormente a la circulación pulmonar. Desde los capilares pulmonares, atraviesan la pared accediendo al alveolo en donde permanecen varios días mientras hacen dos mudas y aumentan de tamaño. Posteriormente las larvas inician una migración ascendente por las vías respiratorias pasando por la traquea, la epiglotis y la faringe, siendo deglutidas para llegar de nuevo al intestino delgado en donde continúa su crecimiento hasta su fase adulta. El periodo comprendido desde la ingestión del huevo embrionado hasta que la hembra adulta tiene capacidad de poner huevos dura entre 8 y 12 semanas.

Trichuris trichiura

Es un nematodo intestinal cuyo nombre procede del griego *trichos* que significa pelo. El gusano adulto mide de 3 a 5 cm y

el tercio posterior es más grueso que los dos tercios anteriores, simulando forma de látigo (*whipworm*). Se localizan en el intestino grueso, específicamente en túneles dentro del epitelio del colon. El ciclo biológico es directo, desarrollándose en el tubo digestivo del hospedador definitivo y en el medio externo. La hembra produce entre 7.000 y 20.000 huevos al día, los cuales son muy característicos y fáciles de identificar. Miden aproximadamente 25 µm de ancho x 50 µm de largo, son de color café y tienen tapones en los dos extremos. Salen al exterior con las heces sin tener aún capacidad para infectar. Cuando se depositan en tierra húmeda y en condiciones adecuadas de temperatura (entre 14 y 30 C°), a las dos semanas adquieren la capacidad de infección, pudiendo permanecer activos en el suelo durante varios meses o años. La infección se produce al ingerir huevos embrionados en el agua o con alimentos contaminados (fig. 1). Estos una vez en el intestino delgado liberan larvas que tienen un corto periodo de desarrollo y luego pasan al colon en donde maduran y se enclavan por su parte delgada a la mucosa intestinal. El tiempo transcurrido entre la infección y la formación de parásitos adultos con capacidad de producir huevos puede ser de tres meses.

Uncinarias

Existen más de 18 géneros de uncinarias (*hook worm*) que parasitan un amplio rango de mamíferos, aunque las dos principales que infectan a las personas son *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*. Pertenecen a la familia *Ancylostomidae* y poseen una cápsula bucal con órganos cortantes. Son gusanos cilíndricos de 10 mm de longitud. Los dientes o las placas cortantes les sirven como órganos de fijación que dañan la mucosa intestinal y producen hemorragia. Las diferentes especies pueden distinguirse en su etapa adulta por su tamaño y morfología; sin embargo, los huevos de las uncinarias no pueden diferenciarse entre sí. Los gusanos adultos viven fijados a la mucosa del duodeno y del yeyuno principalmente, pero en ocasiones se sueltan para cambiar de sitio o aparearse. Las diferencias más llamativas entre las fases adultas de las dos especies son las siguientes. *N. americanus* es más pequeño que *A. duodenale*, vive más tiempo (entre 4 y 20 años para *N. americanus* y entre 5 y 7 años para *A. duodenale*), produce menos huevos (10.000 huevos al día para *N. americanus* y hasta 25.000 huevos al día para *A. duodenale*) y succiona menos sangre (0,03 ml/día para *N. americanus* y hasta 0,20 ml/día para *A. duodenale*). Tras la cópula, las hembras grávidas depositan sus huevos en la luz del intestino. Cuando alcanzan el suelo y en condiciones óptimas de humedad y temperatura, los huevos se desarrollan liberando la larva de primer estadio o larva rhabditiforme (250-300 µm) entre las 24 y 48 horas. Esta larva se alimenta de bacterias y desechos orgánicos hasta sufrir dos mudas, transformándose en larva de tercer estadio o larva filariforme (600 µm), la cual infecta al ser humano (fig. 1). Las larvas de *N. americanus* penetran por la piel exclusivamente mientras que las de *A. duodenale* además de penetrar por la piel también pueden infectar por vía oral, en cuyo caso no hacen el ciclo pulmonar y se localizan directamente en el intestino. En algunas ocasiones, las larvas de *Ancylostoma* acceden al tejido muscular o intestinal, donde permanecen en periodo latente reactivándose cuando encuentran condiciones favorables. Este fenómeno es conocido como hipobiosis. Las larvas filariforme

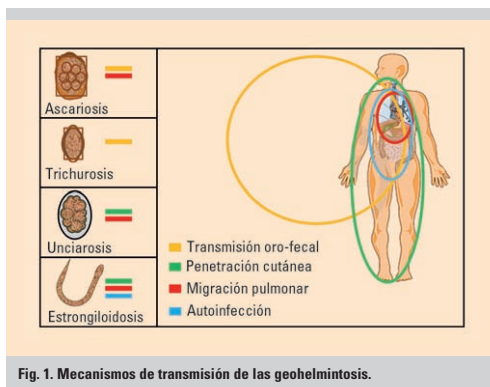


Fig. 1. Mecanismos de transmisión de las geohelminthiasis.

mes presentan tigmotropismo, termotropismo y geotropismo negativo, por esta razón se adhieren a la piel cuando tienen oportunidad, para posteriormente penetrar en el tejido subcutáneo y finalmente entrar en las vénulas superficiales desde donde son transportadas al corazón derecho y desde éste a los pulmones. Posteriormente ascienden por el árbol bronquial, tráquea, laringe y finalmente son deglutidas. Cuando llegan al intestino se transforman en L4 desarrollando una cápsula bucal temporal que les permite fijarse a la mucosa intestinal, aumentar de tamaño y alcanzar la diferenciación sexual. Posteriormente desarrollan la cápsula bucal definitiva. El período comprendido desde la infección hasta la oviposición de los gusanos adultos dura aproximadamente entre cinco y siete semanas.

Epidemiología

Estas geohelmintosis presentan características epidemiológicas comunes, aunque con diferencias importantes. Los aspectos esenciales se resumen a continuación. Son enfermedades que afectan a personas pobres de países pobres³. Con respecto a la distribución geográfica, podemos afirmar que son parasitosis de distribución mundial con mayor prevalencia en áreas tropicales y subtropicales. La más prevalente es la ascariosis (se estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada con *Ascaris lumbricoides*), seguida de las uncinariosis (más prevalentes las infecciones producidas por *N. americanus* que las de *A. duodenale*) y finalmente la trichurosis con una estimación de 800 millones de personas infectadas. El suelo tiene importancia en su transmisión (por eso el nombre de geohelmintosis). Las condiciones de humedad, temperatura y nutrientes son esenciales para el desarrollo de la infección. Un ejemplo lo constituyen los huevos de *Ascaris*, los cuales son muy resistentes a la temperatura y a la desecación, sobreviviendo temporalmente en anaerobiosis. Existe agregación individual. En áreas endémicas la mayor carga parasitaria se concentra en algunos individuos dependiendo de factores genéticos e inmunológicos. Tienen diferente perfil atendiendo a la edad. Así, los niños son la población más afectada en la infección por *Ascaris* y *Trichuris* con un pico máximo de infección a los 7 años. Sin embargo, las uncinariosis presentan una curva ascendente de infección desde los 0 hasta los 25 años, estabilizándose a partir de esa edad⁴.

Patogenia

Los mecanismos de agresión producidos por estos helmintos producen lesiones debidas a fenómenos mecánicos e inmunológicos desencadenados en su migración, así como lesiones traumáticas que pueden ocasionar los gusanos adultos cuando se localizan en el aparato digestivo (por ejemplo, obstrucción intestinal). La respuesta inmunológica desencadenada frente a estos parásitos es prioritariamente dirigida por los linfocitos Th2 con producción de citocinas como IL-4 e IL-5, anticuerpos como IgE y células efectoras como eosinófilos o basófilos. Además, estos helmintos desarrollan múltiples mecanismos de evasión que les permiten vivir en el hospedador durante largos periodos de tiempo. Entre ellos podemos señalar su

capacidad para modificar el procesamiento y la presentación antigénica. Para realizar esta función las células presentadoras de antígeno deben fragmentar los antígenos mediante cisteinil y aspartil proteasas y posteriormente expresarlos en la membrana, asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. *Ascaris* produce un inhibidor de la aspartil proteasa, consiguiendo así la evasión de la respuesta inmunológica⁵. Otro mecanismo al alcance de las uncinarias es poder producir proteasas y otras moléculas que son capaces de fragmentar las inmunoglobulinas, romper quimiocinas reclutantes de eosinófilos e inducir la liberación de interferón gamma (IFN- γ) desde las células *natural killer*⁶.

Manifestaciones clínicas y exámenes complementarios

Podemos clasificar las manifestaciones clínicas de estas parasitosis en dos tipos: clásicas y frecuentes.

Patrón clásico

Se caracteriza por presentar una clínica digestiva inespecífica asociada con manifestaciones características de cada enfermedad.

Ascariosis. En la ascariosis se presentan tres manifestaciones clásicas principales:

1. Síndrome de Löffler debido al paso de las larvas por el pulmón, desencadenando fenómenos de hipersensibilidad y produciendo neumonía con fiebre, tos no productiva, disnea, eosinofilia e infiltrados pulmonares transitorios.

2. Emisión de gusanos. Estos pueden aparecer por la boca o eliminarse por las heces (figs. 2 A y B).

3. Manifestaciones obstructivas. En áreas endémicas hasta el 85% de las obstrucciones intestinales en niños de edades comprendidas entre 1-5 años se deben a esta helmintosis. Además se puede producir pancreatitis, colangitis, colecistitis y abscesos hepáticos.

Trichurosis. La trichurosis se caracteriza por presentar colitis hemorrágica con dolor abdominal, diarrea, anemia ferropénica y retraso estaturacional. Se puede producir prolapso rectal, en el que se observan los vermes adultos en la mucosa prolapsada.

Uncinariosis. Se pueden apreciar cuatro patrones clínicos⁴:

1. Lesiones cutáneas. *N. americanus* y *A. duodenale* presentan lesiones sistémicas mientras que *A. caninum* y *A. braziliensis* producen larva cutánea *migrans* (figs. 2 C y D).

2. Pseudo-Löffler. La migración de las larvas a través del pulmón origina una neumonitis transitoria, similar pero más leve que la causada por *Ascaris* en su migración pulmonar.

3. Cuando la ruta de infección es por vía oral se produce un cuadro caracterizado por náuseas, vómitos, irritación faríngea, tos, disnea y ronquera, debido a la migración temprana de las larvas filariformes, que se denomina síndrome de Wakana.

4. Las manifestaciones más importantes en la uncinariosis son la anemia ferropénica y la malnutrición, consecuencia de las pérdidas sanguíneas. Los parásitos producen daño mecánico al succionar la mucosa intestinal mediante su cápsula



Fig. 2. Cuadros clínicos en geohelmintosis.

bucal. Además segregan enzimas como la tripsina que inhibe la agregación plaquetaria, la quimi tripsina que actúa inhibiendo el factor X activado o la elastasa que actúa inhibiendo el complejo factor VIIa/FT.

Patrón frecuente

El patrón clínico habitual es la ausencia de sintomatología y la detección de huevos de los parásitos en el estudio coproparasitario. Sin embargo, la eosinofilia es una alteración analítica frecuente que ocurre tanto en las formas aisladas como en las formas combinadas con otras helmintosis.

Diagnóstico etiológico

El principal método es el diagnóstico parasitológico mediante análisis coprológico. Se utilizan dos técnicas: Kato Katz (consultar actualización dedicada al estudio de las trematodos) o Ritchie (sedimentación en la que se emplea formol, alcohol tamponado y éter etílico). En un estudio realizado en inmigrantes se comprobó que la técnica de Kato Katz es más sensible para el diagnóstico de ascariosis y trichuriasis, mientras que la de Ritchie es mejor para el diagnóstico de uncinarias⁷. Aunque existen datos contradictorios^{8,9}, nuestra experiencia indica que el análisis coprológico de tres muestras aumenta la rentabilidad diagnóstica frente al análisis de una o dos muestras de heces. Por último, los datos característicos de la fase de huevo de los diferentes geohelminthos estudiados en esta actualización se describen en apartados anteriores. Además, como se ha señalado previamente, no es posible diferenciar morfológicamente las dos especies más importantes de uncinarias. Esto no tiene trascendencia desde el punto de vista práctico, dado que ambas especies se tratan de forma similar.

Tratamiento y control

Las pautas de tratamiento individual actual¹⁰ se detallan en la tabla 1. Algunos autores proponen la utilización de nitazoxanida y oxabendazol como tratamiento individual futuro³.

TABLA 1

Tratamiento en geohelmintosis

	Elección	Alternativas
Ascariosis	Albendazol 400 mg en dosis única	Mebendazol 500 mg en dosis única o 100 mg/12 h × 3 días (niños)
Trichuriasis	Mebendazol 500 mg en dosis única	Albendazol (400 mg) en dosis única
Uncinariosis	Albendazol 400 mg en dosis única	Mebendazol 500 mg en dosis única o 100 mg/12 h × 3 días (niños)
Estrongiloidosis	Ivermectina 200 µg/kg/día durante 2 días consecutivos	Abendazol 400 mg/12 h durante dos días consecutivos

El control de estas enfermedades se basa en la aplicación de una serie de medidas específicas: mejoría de las condiciones higiénicas, uso de agua potable y lavado de manos, preferentemente antes de las comidas. Si la prevalencia es mayor del 50% se recomienda quimioterapia en masa. Para ello se utiliza mebendazol, albendazol, pirantel o levamisol principalmente en áreas de elevada prevalencia de *Ascaris*. Se administra en niños en monodosis y durante dos o tres veces al año. Los problemas que plantea son la eficacia variable de los fármacos, la reinfección y la selección de resistencias. La alternativa es el uso de vacunas. Recientemente se ha desarrollado una vacuna bivalente contra *N. americanus* compuesta por hemoglobinas procedente del verme adulto y una proteasa secretada tipo 2 denominada NA-ASP-2^{11,12}. Actúa mediante la producción de anticuerpos neutralizantes y desencadena citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Inhibe la degradación de la hemoglobina y la migración del parásito, disminuyendo la fecundidad y la carga parasitaria. Como consecuencia final existe una disminución de la enfermedad.

Estrongiloidosis

Es una geohelmintosis tanto importada como autóctona, ya que se han registrado casos en nuestro país, concretamente en el litoral mediterráneo. Es causada principalmente por *Strongyloides stercoralis*, aunque se han descrito infecciones por *S. fuelleborni fuelleborni* en África y *S. fuelleborni kellyi* en Papua Nueva Guinea¹³.

Ciclo biológico

La estrongiloidosis¹⁴ es una helmintosis que tiene un ciclo biológico muy peculiar, ya que presenta dos formas de transmisión: heteroinfección y autoinfección.

Heteroinfección

El mecanismo de transmisión entre seres humanos se produce de forma similar al de *A. duodenale*, mediante la penetración transcutánea de larvas filariformes (550 µm). En algunas ocasiones puede ocurrir la transmisión mediante ingestión de larvas filariformes. Estas larvas atraviesan el tejido celular subcutáneo accediendo a la circulación sanguínea, llegando al corazón derecho y pasando por el pulmón donde atraviesan capilares y alveolos para ascender por el árbol bronquial hasta llegar a la tráquea, la laringe y la faringe, donde son

deglutidas. A continuación llegan al intestino delgado donde alcanzan su madurez sexual. Un dato característico en la biología de *Strongyloides* es la presencia única de hembras (2,2 mm) en el intestino, que se reproducen mediante partenogénesis. De esta manera ponen sus huevos en la mucosa intestinal, eclosionan y liberan larvas rhabditiformes (250-300 µm). En el medio ambiente (suelo) las larvas rhabditiformes pueden tomar dos caminos. Uno de ellos es la transformación en un máximo de dos semanas en larvas filariformes, preparadas para penetrar en un nuevo hospedador. El otro, es poder transformarse en adultos de vida libre, con posterior cópula, producción de huevos, eclosión y muda primero a larvas rhabditiformes y posteriormente a filariformes que también estarán preparadas para introducirse en un nuevo hospedador.

Autoinfección

Una característica biológica exclusiva de *Strongyloides* es la posibilidad de transformación en el intestino grueso del hospedador de larvas rhabditiformes en larvas filariformes. De esta manera las larvas filariformes no tienen que salir al medio externo y pueden volver a penetrar a través de la mucosa intestinal y/o de la piel perianal, produciendo autoinfección. En este proceso pueden intervenir factores locales como estreñimiento, divertículos o disminución de la motilidad intestinal o factores sistémicos como la administración de glucocorticoides o la infección por HTLV-1. No son factores sistémicos influyentes la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ni la administración de ciclosporina. Por último, debido a la autoinfección se produce una reactivación del ciclo que puede dar lugar a una persistencia de la infección u originar un cuadro de hiperinfección con consecuencias fatales¹⁵.

Epidemiología

Se estima una prevalencia global para la estrogiloidosis de hasta 100 millones de personas infectadas, aunque algunos autores indican menores cifras de parasitación. Su distribución es cosmopolita, fundamentalmente en áreas tropicales y subtropicales del planeta. Sin embargo, es endémica en algunas regiones europeas como Rumanía (estimaciones del 6,9%), norte de Italia (3%) y este de España, específicamente las comunidades autónomas de Murcia y Valencia (12,4%)¹⁶.

Patogenia

La respuesta inmunológica predominante en la infección por *Strongyloides* es la generada por linfocitos Th2 con altos niveles de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, así como aumento de anticuerpos del isotipo IgE y predominio de eosinófilos. Se ha demostrado que pacientes coinfectados con HTLV-1 presentan respuestas Th1¹⁷, con disminución de Th2, lo que favorece el desarrollo de hiperinfección. Estudios realizados en nuestro laboratorio con *S. venezuelensis* demostraron la activación del óxido nítrico y el aumento de expresión de factores angiogénicos en macrófagos estimulados con diferentes antígenos del parásito¹⁸.

Manifestaciones clínicas y exámenes complementarios

Las manifestaciones clínicas en la estrogiloidosis difieren en el individuo inmunocompetente y en el inmunodeprimido. En las personas inmunocompetentes la mitad de los sujetos infectados están asintomáticos. Cuando existen síntomas estos se manifiestan mediante:

1. Manifestaciones cutáneas: la más característica es la larva *currens* que se presenta como una lesión cutánea serpigínea de varios centímetros de tamaño que se mueve a la velocidad de 10 cm por hora y suele desaparecer en uno o dos días. También es frecuente un exantema urticariforme inespecífico.

2. Manifestaciones digestivas: como dolor epigástrico, diarrea intermitente o pérdida de peso.

3. Presencia de eosinofilia que en algunas ocasiones se asocia con sintomatología pulmonar debido al paso de la larva por los pulmones.

En pacientes inmunodeprimidos¹⁹ se produce una diseminación de las larvas de *Strongyloides* tanto al aparato respiratorio y digestivo como a otros órganos, entre los que se encuentra el sistema nervioso central y la piel. En estos casos desaparece la eosinofilia y aumenta el riesgo de infección por bacterias gramnegativas, incrementándose la posibilidad de sepsis bacteriana y de un posterior fracaso multiorgánico. Por tanto, es imprescindible la prevención para evitar estas complicaciones fatales.

Diagnóstico

Los métodos utilizados para el diagnóstico etiológico de la estrogiloidosis son de dos tipos: directos (parasitológicos y moleculares) e indirectos (inmunológicos)²⁰.

Técnicas directas

El diagnóstico parasitológico se establece al detectar larvas de *Strongyloides* en heces y/o fluido duodenal. En pacientes con hiperinfección también se puede aislar en el lavado broncoalveolar y el líquido pleural. Las técnicas más utilizadas son las de concentración en formalina-éter y las de migración larvaria en medio líquido (técnica de Baermann, técnica de Harada-Mori) o sólido (cultivo en placas de agar enriquecido)²¹. Recientemente se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real para detectar *Strongyloides* en muestras de heces²².

Técnicas indirectas

Aunque se han utilizado test cutáneos, la mayoría de los métodos inmunológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos contra *Strongyloides*. Para ello se ha empleado la técnica ELISA usando extractos crudos procedentes de larvas filariformes. Esta prueba presenta una elevada sensibilidad pero presenta reactividad cruzada con otras infecciones producidas por helmintos (principalmente filarias, esquistosomas y otros geohelmintos). Recientemente se ha desarrollado un sistema de inmunoprecipitación con luciferasa para la detección de IgG contra dos antígenos, uno recombinante denominado NIE y otro inmunorreactivo llamado SsIR, con especificidad del 100%²³.

Tratamiento

La ivermectina es el fármaco de elección para el tratamiento de la estrongiloidosis. Las pautas de administración, así como los fármacos alternativos, se describen en la tabla 1.

Nematodosis tisulares

Anisaquiosis

Nematodosis tisular producida por ascáridos pertenecientes al género *Anisakis*, cuya especie principal es *Anisakis simplex*²⁴. El ciclo biológico tiene diferentes hospedadores. Los vermes adultos se encuentran en el aparato digestivo de una gran variedad de mamíferos marinos (hospedadores definitivos) que incluyen cetáceos y en menor medida pinnípedos. Los huevos sin embrionar son expulsados con las heces de los mamíferos al medio marino. Una vez embrionados se produce la eclosión, liberándose larvas de tercer estadio de vida libre (1-5 cm de longitud). Estas son ingeridas por crustáceos que posteriormente son comidos por peces y calamares. El mecanismo de transmisión en las personas se produce al consumir pescados o calamares crudos o poco cocinados. Por último, la ingestión de crustáceos, peces y calamares por parte de los mamíferos marinos cierra el ciclo biológico de la anisaquiosis.

Epidemiología

Desde el punto de vista epidemiológico, la anisaquiosis es una enfermedad muy relacionada con determinadas costumbres culinarias como el consumo de sushi y sashimi japonés, arenques holandeses, gravlax nórdico, lomi-lomi hawaiano, cebiche sudamericano o boquerones en vinagre españoles. Su prevalencia es más alta en Japón y cada vez más frecuente en otros países del mundo. En España se puede considerar una parasitosis emergente⁵.

Clínica

Las lesiones producidas por *Anisakis* son consecuencia tanto de la acción mecánica de la larva y de las moléculas que libera como de las reacciones de hipersensibilidad que se producen frente a los antígenos del parásito²⁶. Desde el punto de vista clínico se consideran cuatro tipos de manifestaciones:

1. Gástricas. Cursan con dolor epigástrico y aparece en las primeras 12 horas tras la ingesta de pescado contaminado. Suele asociarse con náuseas y/o vómitos. Aunque con menor frecuencia puede aparecer diarrea, anorexia, febrícula, hematemesis, pirosis, escalofríos, dolor torácico y distensión abdominal. Los datos analíticos revelan leucocitosis y, en pocos casos, eosinofilia.

2. Intestinales. Cursan con dolor abdominal en cuadrante inferior derecho que aparece en las primeras 48 horas después de ingerir la larva. Pueden aparecer signos de apendicitis. Si hay fiebre se debe sospechar la presencia de una peritonitis bacteriana asociada. Las pruebas de imagen revelan un engrosamiento en la pared intestinal. Los datos analíticos son similares a los descritos en las manifestaciones gástricas.

3. Alérgicas. Se presentan como una urticaria o un angioedema.

4. Anisaquiosis ectópica. Con diferente sintomatología dependiendo de la localización de la larva.

Diagnóstico

En el diagnóstico etiológico hay que considerar los siguientes aspectos. Los análisis coprológicos no sirven para su diagnóstico, ya que las personas no liberan ni huevos ni larvas del parásito. Las técnicas de imagen son muy utilizadas. La endoscopia es la técnica de elección, ya que permite visualizar y extraer las larvas en un mismo proceso. También es útil la radiología, especialmente en la anisaquiosis intestinal. Las pruebas serológicas también son de gran utilidad y se basan en la detección de anticuerpos específicos del isotipo IgE. Se usan pruebas cutáneas (*prick test*), CAP o ELISA de captura utilizando un anticuerpo monoclonal denominado UA3.

Tratamiento

En general consiste en la extirpación de las larvas mediante endoscopia o cirugía y el tratamiento sintomático de las manifestaciones de hipersensibilidad. En algunos casos el empleo de albendazol ha resultado de gran utilidad²⁷.

Prevención

Hay que tener en cuenta que las larvas del parásito son destruidas por congelación o por calentamiento por encima de 60° C. Por el contrario son resistentes a la elaboración de marinados y semiconservas.

Toxocariosis

Es una enfermedad producida por ascáridos pertenecientes al género *Toxocara* cuya especie principal es *Toxocara canis*²⁴. En el ciclo biológico de *T. canis* los hospedadores definitivos son los perros u otros cánidos. Estos animales albergan las fases adultas (vermes redondos de 5 a 18 cm de tamaño con dos expansiones laterales denominadas alas cefálicas) en su intestino que, tras la cópula, pondrán huevos que serán eliminados al exterior. La infección en el ser humano (hospedador paraténico o accidental) se origina mediante la ingestión de huevos embrionados del parásito (75-90 µm) que tras eclosionar en el aparato digestivo liberan larvas que penetran por las criptas de Lieberkühn y acceden al hígado por vía portal. A continuación alcanzan los pulmones y mediante la circulación sistémica acceden a diferentes lugares del organismo (por ejemplo, sistema nervioso central y músculo estriado) originando el síndrome de larva visceral emigrante. Algunas larvas llegan a lugares menos accesibles como por ejemplo el ojo, produciendo la toxocariosis ocular.

Epidemiología

Consideramos que la toxocariosis humana es una parasitosis de distribución mundial en la que se desconoce la prevalencia real. Los datos existentes en España muestran una prevalencia muy variable entre las diferentes comunidades autónomas, con predominio en población infantil²⁸. El factor epidemiológico más importante en la transmisión es la contaminación de suelos de parques públicos con huevos eliminados por perros parasitados. En diversos estudios realizados en parques de nuestro país se ha observado una prevalencia que oscila entre 9-37%.

Patogenia

La patogenia de la toxocariosis se debe al asentamiento de las larvas en los tejidos, a la liberación de antígenos metabólicos y a la respuesta inmunológica desencadenada frente a estos

estímulos, predominantemente tipo Th2. Se ha comprobado que antígenos de *T. canis* son capaces de estimular la producción de óxido nítrico y prostaglandina E2 por macrófagos alveolares. Estos mediadores inflamatorios pueden desencadenar fenómenos de vasodilatación y por tanto facilitar los procesos de migración del parásito en el organismo²⁹.

Clínica

Desde el punto de vista clínico, la toxocariosis³⁰ suele cursar de forma asintomática o bien presentarse con un cuadro clínico indefinido denominado toxocariosis encubierta. No obstante, existen dos procesos bien caracterizados:

1. Síndrome de larva visceral emigrante. Cuadro que aparece con más frecuencia en niños en contacto con tierra contaminada o con perros infectados. Sus manifestaciones son extremadamente variables, desde formas asintomáticas hasta infecciones fulminantes. Los órganos más frecuentemente afectados son el hígado y el pulmón. La hepatomegalia es el signo más frecuente. La afectación pulmonar se manifiesta con disnea, tos seca, sibilancias en la exploración física e infiltrados pulmonares difusos en la radiografía de tórax. La eosinofilia y la leucocitosis son los datos analíticos más frecuentes. En algunas ocasiones se han observado manifestaciones reumatológicas, lesiones cutáneas y afectación neurológica.

2. Toxocariosis ocular. Se presenta de forma unilateral con pérdida de visión y dolor ocular. En el fondo de ojo se ven granulomas retinianos posteriores, granulomas periféricos y endoftalmitis crónica. No cursa con manifestaciones sistémicas y no aparece eosinofilia ni leucocitosis.

Diagnóstico etiológico

En el diagnóstico etiológico hay que considerar dos aspectos esenciales: a) como en la anisakirosis las técnicas coprológicas no tienen utilidad, y b) los métodos serológicos son los utilizados habitualmente. En la toxocariosis sistémica la detección de anticuerpos específicos mediante ELISA utilizando antígenos metabólicos de *T. canis* presenta una alta sensibilidad y una baja especificidad, dando reactividad cruzada con otros helmintos. Esta técnica no sirve para el diagnóstico de la toxocariosis ocular, ya que no detecta anticuerpos sistémicos. En este caso la exploración oftalmológica sigue siendo la mejor alternativa.

Tratamiento

El tratamiento de elección¹⁰ en niños se basa en el empleo de albendazol (200 mg cada 12 horas durante 5-20 días). Como fármaco alternativo se utiliza mebendazol con la misma pauta de tratamiento. En adultos hay que duplicar la dosis (400 mg). Se puede asociar a corticosteroides y en el caso de la toxocariosis ocular es preciso el tratamiento quirúrgico.

Triquinelosis

La triquinelosis es una nematodosis producida por especies del género *Trichinella* que afecta tanto a seres humanos como a animales carnívoros y omnívoros³⁴. Existen 11 especies conocidas divididas en dos grandes grupos atendiendo a la presencia o no de cápsula. *Trichinella spiralis* es la especie de mayor importancia. Desde el punto de vista biológico *Trichinella* tiene algunas caracte-

terísticas peculiares. Su ciclo es autoheteroxeno, ya que necesita de más de un hospedador (por ejemplo, cerdo, jabalí, caballo, roedores, humanos) para completar su desarrollo, aunque en todos ellos se repiten todas las fases del ciclo biológico. En la fase intestinal la infección se produce principalmente por el consumo de carne cruda o poco cocinada, parasitada con larvas de primer estadio (1 mm de tamaño). En el intestino se realizan cuatro mudas en menos de 28 horas hasta desarrollarse a vermes adultos (machos y hembras). En la fase muscular los adultos se aparean en la mucosa intestinal, eclosionando los huevos en el interior del útero de la hembra adulta y liberando larvas de primer estadio que se dirigen hacia los vasos linfáticos o se introducen en la circulación sistémica para parasitar las células del músculo estriado, en el cual muda a larva de tercer estadio en 15 días, pudiendo permanecer viables durante meses o años.

Epidemiología

Desde el punto de vista epidemiológico, es una enfermedad de distribución cosmopolita con más de 11 millones de personas infectadas. Está asociada al consumo de carne de cerdo, principalmente embutidos. También se relaciona con el consumo de carne de caballo y de animales salvajes³¹.

Patogenia

Está íntimamente ligada al proceso de invasión de las células musculares en el que se producen cambios tanto a nivel parasitario como en la célula infectada. Excepto en las especies no encapsuladas, se forma una cápsula de colágeno en torno a la larva creándose nuevos vasos alrededor de la célula infectada con activación en la expresión de factores angiogénicos³².

Clínica

Las manifestaciones clínicas de la triquinelosis son las siguientes. En general, la fase intestinal es asintomática, en ocasiones aparece diarrea acompañada de náuseas y vómitos. Son frecuentes los síntomas musculares asociados con fiebre. El dolor muscular aparece dos semanas después de la infección, localizado en el hemicuerpo superior, de intensidad variable que se incrementa con la presión. Un dato muy característico y precoz es el edema palpebral. Puede acompañarse de dolor ocular, fotofobia, congestión y hemorragias conjuntivales. También son frecuentes las hemorragias subungueales en astilla y la presencia de un exantema en tronco y extremidades. Los datos analíticos más llamativos son: eosinofilia elevada, aumento de IgE total, incremento de creatinfosfocinasa (CPK), lacticodehidrogenasa (LDH) e hipoalbuminemia.

Diagnóstico

La serología es el método más utilizado para el diagnóstico de la triquinelosis. Se utiliza ELISA para la detección de anticuerpos específicos usando antígenos metabólicos larvarios o glicoproteínas purificadas como tivelosa. Presenta el inconveniente de no servir para la detección de anticuerpos en la fase intestinal de la infección. Por otro lado, no se utiliza la biopsia muscular, ya que es una prueba agresiva y de baja sensibilidad.

Tratamiento

El tratamiento de la triquinelosis depende de la presencia o no de sintomatología¹⁰. En presencia de clínica debe ser pre-

TABLA 2

Nematodosis tisulares de menor importancia

Enfermedad	Distribución geográfica	Mecanismo de transmisión	Diagnóstico	Tratamiento
Angiostrongilosis	Sudeste Asiático, Pacífico Sur (<i>A. cantonensis</i>) América Central, Brasil (<i>A. costaricensis</i>)	Ingestión de caracoles, cangrejos, camarones, peces y verduras	Meningoencefalitis eosinofílica (<i>A. cantonensis</i>) Pseudotumor intestinal (<i>A. costaricensis</i>)	Albendazol (15 mg/kg/día durante dos semanas)
Esofagostomosis	Togo, Ghana (<i>O. bifurcum</i>) Guyanas, Brasil, Nigeria (<i>O. apistomum</i>)	Ingestión oral	Helmin-tona (<i>O. bifurcum</i>) Granuloma intestinal Microabscesos (<i>O. apistomum</i>)	Albendazol 400 mg/día durante 3 días
Gnathostomosis	Sudeste Asiático, Japón, China	Ingestión de carne cruda de serpiente, anfibios, peces, patos y pollos	Edema eritematoso y pruriginoso Afectación del SNC Eosinofilia	Albendazol (E) 400 mg/12 h durante 21 días Ivermectina (A) 200 µg/kg/día durante 1-2 días

SNC: sistema nervioso central.

coz, ya que si el parásito se encapsula los antihelmínticos pierden eficacia. El fármaco de elección es mebendazol (200 mg cada 8 horas durante 3 días y 400 mg cada 8 horas diez días más). Se utiliza albendazol como tratamiento alternativo (400 mg cada 12 horas durante 8-14 días). Las medidas preventivas se dirigen principalmente al control de la carne y de sus productos destinados al consumo humano, con especial atención a los procedentes de la caza y explotaciones extensivas.

Otras nematodosis de menor importancia

Las principales características de angiostrongilosis³³, esofagostomosis y gnathostomosis³⁴ se recogen en la tabla 2.

Bibliografía

● Importante ●● Muy importante

✓ Metaanálisis ✓ Artículo de revisión
 ✓ Ensayo clínico controlado ✓ Guía de práctica clínica
 ✓ Epidemiología

1. Watkins BM. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. *Trends Parasitol.* 2003;19:477-8.
2. ●● Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis and hookworm. *Lancet.* 2006;367:1521-32.
3. Horton J. Human gastrointestinal helminth infections: are they now neglected diseases? *Trends Parasitol.* 2003;19:527-31.
4. ●● Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworm Infection. *N Engl J Med* 2004, 351: 799-807.
5. Pérez-Arellano JL, Espinoza EY, Sánchez MM, Muro A. Evasion mechanisms of parasites. *Res Rev Parasitol.* 2001;61:4-16.
6. Johnston MJG, MacDonald JA, McKay DM. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitology.* 2009;136:125-47.
7. Martín AM, Hernández A, González M, Alfonso O, Hernández M, Pérez-Arellano JL. Parasitosis intestinales en población inmigrante subsahariana asintomática. *Gran Canaria 2000. Rev Clin Esp.* 2004;204:14-17.
8. Branda JA, Tai-Yuan DL, Rosenberg ES, Halpern EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. *Clin Infect Dis.* 2006;42:972-8.
9. Rosenblatt JE. Clinical importance of adequately performed stool ova and parasite examinations. *Clin Infect Dis.* 2006;42:979-80.
10. ● Pérez-Arellano JL, Hernández M, Pisos E, Carranza C. Tratamiento de las enfermedades parasitarias: helmintosis y ectoparasitosis. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 2007;31:55-64.
11. ●● Loukas A, Bethony J, Brooker S, Hotez P. Hookworm vaccines: past, present and future. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:733-41.
12. Diemert DJ, Bethony JM, Hotez P. Hookworm vaccines. *Clin Infect Dis.* 2008;15:282-8.
13. King SE, Mascie-Taylor CG. *Strongyloides fuelleborni kellyi* and other intestinal helminths in children from Papua New Guinea: associations with nutritional status and socioeconomic factors. *PNG Med J.* 2004;47:181-91.

14. Ruano AL, Martín T, Pardo J, López J, Muro A. Avances en el estudio de la estrogiloidosis. *Enf Emerg.* 2005;7:102-9.
15. Vilela EG, Clemente WT, Mira RR, Torres HO, Veloso LF, Fonseca LP, et al. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome after liver transplantation: case report and literature review. *Transp Infect Dis.* 2009;11:132-6.
16. Román P, Pastor A, Moreno S, Igual R, Suárez S, Tornero C. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the Mediterranean coast of Spain; analysis of the predictive factors of infection in developed countries. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:336-40.
17. Porto AF, Neva FA, Bittencourt H. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol.* 2001;23:503-7.
18. Shariati F, Pérez-Arellano JL, López J, El Behary M, Muro A. Role of angiogenic factors in acute experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. *Parasite Immunol.* En prensa 2010.
19. ● Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:208-17.
20. Siddiqui AS, Berl SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1040-47.
21. Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, et al. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examination using the agar plate method. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:683-4.
22. Verweij JJ, Canales M, Polman K. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:342-6.
23. Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, Nutman TB, et al. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Infect Dis.* 2008;198:444-51.
24. ●● Muro A, Martínez-Ubeira F, Rodríguez E. Otras trematodosis tisulares de origen zoonótico. En: Ausina V, Moreno S, editores. *Tratado de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 1145-53.*
25. Navarro E, Carro B, Castillo C, Fernández JA. Diagnosis of *Anisakis* infestation: experience in our environment. *Allergol Immunopathol.* 2005;33:27-30.
26. ● Audicana MT, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:360-79.
27. Moore DA, Girdwood RW, Chiodini PL. Treatment of anisakiasis with albendazole. *Lancet.* 2002;360: 54.
28. ● Espinoza E, Pérez-Arellano JL, Sánchez MM, Muro A. Parasitosis de interés en nuestro medio: aspectos actuales de la toxocariosis humana. *Med Integ.* 2000;36:387-95.
29. Espinoza E, Muro A, Sánchez MM, Casanueva P, Pérez-Arellano JL. *Taxicaria canis* antigens stimulate the production of nitric oxide and prostaglandin E2 by rat alveolar macrophages. *Parasite Immunol.* 2002, 24: 311-9.
30. ●● Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol.* 2009;25:182-8.
31. ● Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22:127-45.
32. Shariati F, Pérez-Arellano JL, López J, Arefi M, Martínez AR, Muro A. *Trichinella*: differential expression of angiogenic factors in macrophages stimulated with antigens from encapsulated and non-encapsulated species. *Exp Parasitol.* 2009;123:347-53.
33. ● Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongylosis. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:621-30.
34. ● Hermann JS, Chiodini PL. Gnathostomiasis, another emerging imported disease. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:484-92.

Páginas web

www.cdc.gov
 www.who.int/

ANEXO

ANEXO METODOLÓGICO

En este apartado se describen
con más detalles algunos de los
materiales
y métodos utilizado
en la mayoría de los experimentos de
esta tesis, con el propósito de amplia
la información que se encuentra en
los manuscritos ya publicados.

6. Anexo metodológico

MATERIAL PARASITARIO Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

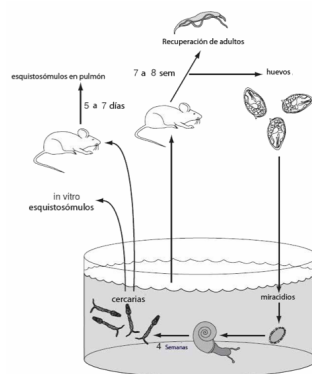


Figura 1: Ciclo biológico de *S. mansoni* en el laboratorio. En esta figura se observa de forma esquemática, las diferentes fases del parásito y los tiempos aproximados de referencia para su obtención en el laboratorio, en las dos clases de hospedador. En nuestro caso utilizamos caracoles de la especie *B. glabrata* como hospedador intermediario y ratones de la línea CD1 como hospedador definitivo.

6.1 Obtención de cercarias a partir de caracoles infectados

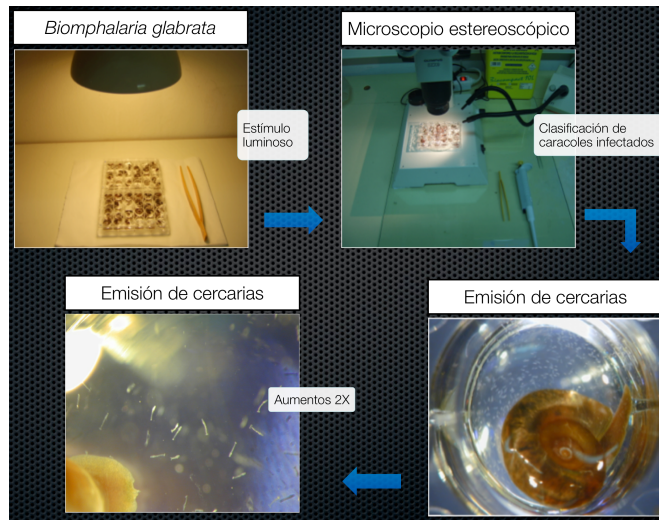


Figura 2: Infección de caracoles.

Antes de la infección de los ratones se debe obtener las cercarias suficientes a partir del hospedador intermediario, *B. glabrata*, que las libera por la acción de un foco de luz intensa (figura 2).

Se debe extremar las precauciones y tener la correspondientes consideraciones de riesgo biológico en esta fase infectiva del ciclo, dado que las cercarias pueden penetrar la piel intacta dentro de 1 a 2 minutos de exposición, por lo tanto es importante evitar que el investigador entre en contacto directo con agua contaminada de cercarias. Los investigadores

deben usar guantes de látex para su protección, al manipular los caracoles expuestos a cercarias. Como regla general, se deben manipular todos los caracoles como si estuvieran emitiendo cercarias. Es una buena práctica para adoptar en todos los laboratorio donde se trabaje con este tipo de parásito.

Las cercarias se pueden matar al contacto con alcohol al 70%, por tanto se recomienda la colocación de botellas atomizadoras con alcohol en todo el laboratorio y es una buena medida de precaución. Los contenedores de cloro también se pueden mantener en los lugares estratégicos del laboratorio, con el fin de descartar cercarias y materiales contaminados. El agua caliente (≥ 50 °C) mata las cercarias en pocos segundos.

Materiales:

- Caracoles *B. glabrata* infectados.
- Agua mineral.
- Placa de Petri.
- Estereoscopio de disección.

Procedimiento (figura 2):

1. Para recoger las cercarias para fines experimentales, colocar los caracoles que las emiten en un volumen de agua correspondiente a 2 mL caracol.
2. Colocar el recipiente con los caracoles infectados bajo una fuente intensa de luz durante 1-2 h. Mantener la temperatura del agua a 30 °C.

6. Anexo metodológico

3. Con unas pinzas y de forma cuidadosa se retiran los caracoles del vaso de precipitado y se colocan en su acuario.
4. Hacer pasar el contenido del vaso a través de un filtro de $100\ \mu m$, ello permite el paso de las cercarias y limpiar la suspensión de cercarias de las heces de los caracoles.
5. Colocar 1 mL de la suspensión de cercarias repartidas en alicuotas sobre la placa de Petri y contar las cercarias intactas con ayuda de un microscopio de disección. Se deben realizar al menos tres recuentos.
6. Utilizar las cercarias para infectar los animales de laboratorio

6.2 Infección del hospedador definitivo



Figura 3: Infección de ratones.

La infección en todos los experimentos se realizará mediante exposición percutánea abdominal (figura 3). El uso de este método de infección posee claras ventajas sobre otros métodos como el baño en agua con cercarias en suspensión o la infección por vía subcutánea. En primer lugar, al pipetear el mismo volumen de la suspensión de cercarias, homogéneamente disueltas, se controla que cada animal reciba el mismo número. En segundo lugar, se delimita una superficie de contacto. Por último, nos aseguramos que cada cercaria tenga una gran probabilidad de penetrar en la piel, puesto que por la influencia de la gravedad se facilita que cada cercaria se deposite y penetre a través de la piel.

Materiales:

- Anestésico disociativo: constituido por Ketamina (Imalgene[®] 1.000, 100 mg/mL), Diazepam (Valium[®] 10, ampollas de 10 mg/2 mL) y Atropina (Atropina Braun ampollas 1mg/mL). La dosis utilizada fue de 50/5/1 mg/mL para cada ratón.
- Anillos de un diámetro de 1,5 cm.

Procedimiento:

1. Afeitar a los animales en la parte baja del abdomen.
2. Inducir una correcta y profunda anestesia.
3. Colocar al animal en posición de decúbito supino y fijarlo a una superficie sólida.
4. Humedecer el abdomen con una gasa.

6. Anexo metodológico

5. Fijar al animal firmemente y colocar un anillo sobre su abdomen.
6. Pipetear dentro del anillo un volumen de agua que contenga el número de cercarias requerido, (según nuestro diseño experimental 150 cercarias).

6.3 Recogida de sangre periférica y suero en el animal de experimentación

Esta técnica debe ser llevada a cabo únicamente cuando no exista método alternativo, y siempre por personal cualificado debido al elevado riesgo de afectar estructuras adyacentes al globo ocular, lo que puede originar infecciones graves, ceguera, etc.

Materiales:

- Capilares tratados con anticoagulante (EDTA) para la obtención de sangre total o sin anticoagulante para la generación de suero.
- Anestesia: isofluorano 5 % (Forane®). Pomada oftálmica (Lubrifiilm®).
- Tubos Eppendorf (1,5 mL).
- Tubos Vacutainer® (Cat. 367841) con anticoagulante.

Procedimiento:

1. Una vez anestesiado el ratón y comprobado que se ha alcanzado el plano quirúrgico, sujetar al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración.

-
2. Insertar el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aprox.) y girar suavemente hasta que la sangre fluya por ella misma.
 3. Recoger la muestra y retirar el capilar.
 4. Oprimir ligeramente la zona de punción con una gasa o papel para detener la hemorragia.
 5. Aplicar pomada oftálmica (Lubrifilm®) al ojo.
 6. Comprobar que la recuperación de la anestesia se produce adecuadamente aportando las medidas que se consideren necesarias para ello (p.e. aporte de calor).
 7. Observar al animal los días posteriores al sangrado para detectar la aparición de posibles complicaciones: protrusión de tejido adyacente al ojo, infecciones, hemorragias, etc.
 8. Extraer el suero a partir del tubo sin anticoagulante, dejando la sangre a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente centrifugando a 3.000 r.p.m. durante 20 min. Almacenar a -80 °C hasta el momento de su uso.

6.4 Necropsia, recuperación de formas adultas y contaje de huevos

6. Anexo metodológico

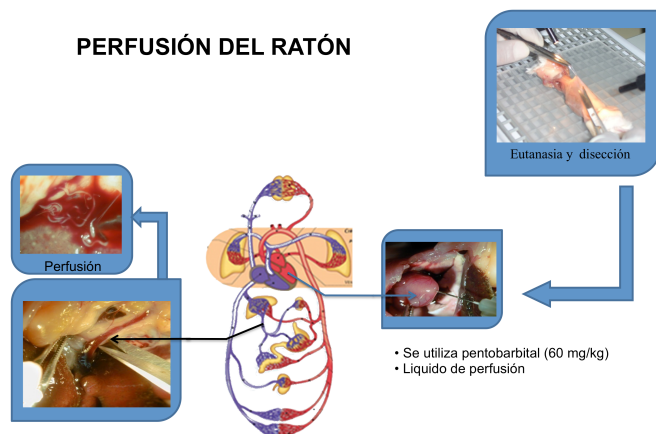


Figura 4: Obtención de vermes adultos de *S. mansoni*.

Las formas adultas del parásito fueron recuperadas de la vena porta de cada ratón mediante perfusión después de ocho semanas post-infección.

Materiales:

- Ratones CD1 infectados por *S. mansoni*.
- Pentobarbital sódico (P3761, Sigma).
- Solución salina con heparina (1.000 U.I.).
- Jeringuilla de 20 mL.
- Microscopio de disección.
- Placa de Petri.
- Material quirúrgico.

Procedimiento:

1. Anestesiarse los animales con pentobarbital inyectado de forma intraperitoneal. Dosis: 30 mg/kg.
2. Verificar que el animal esté profundamente anestesiado.
3. Abrir el abdomen y la caja torácica dejando accesible tanto el corazón como la vena porta como se observa en la figura 4.
4. Antes de iniciar la perfusión se procede a fotografiar la superficie hepática.
5. Se toman fotografías de tres partes diferentes del hígado de ratón, con el objetivo de valorar el grado de fibrosis hepática.
6. Se procede a perforar la vena porta, se introduce la aguja de una jeringuilla en el ventrículo derecho del corazón y se inyecta cuidadosamente, pero de forma constante, solución salina heparinizada (0,85 % NaCl, 1.000 U.I. de heparina).
7. La perfusión dura alrededor de 5 minutos por ratón y si se ha llevado a cabo correctamente, se puede observar cómo todos los órganos del ratón toman un color pálido.
8. Recuperar y pesar hígado, bazo e intestino.
9. Realizar una digestión con KOH 5 % durante 16-24h.
10. Contaje de huevos procedentes de los tejidos digeridos con ayuda de una cámara McMaster.
11. Presentar los resultados como huevos por gramo de tejido (h.p.g).

6.5 Transformación *in vitro* de cercarias de *S. mansoni* a esquistosómulas de forma mecánica mediante pases entre aguja y jeringa

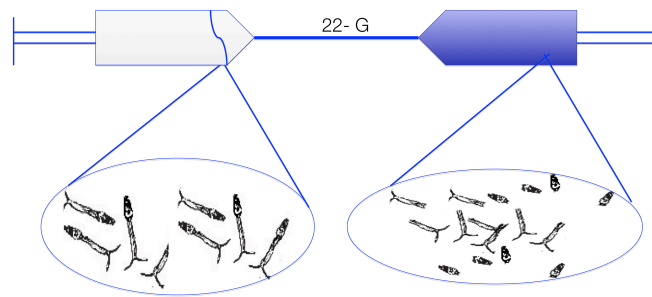


Figura 5: Transformación de cercarias de *S. mansoni* a esquistosómulas.

La separación de las colas de los cuerpos de las cercarias, utilizando una aguja y una jeringa, es una alternativa a la agitación en vórtex o a la obtención directa del tejido pulmonar del ratón, y es un método igualmente válido para la fase inicial de la preparación de las esquistosómulas. Una vez que esta fase se ha completado, las esquistosómulas se pueden colocar en el gradiente de Percoll, para separarlas de residuos como las colas y demás artefactos.

Materiales:

- Suspensión de cercarias de *S. mansoni* (~1.000 cercarias /mL)
- Medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM; Life Technologies), 4 °C
- Tubos de centrifuga de plástico de 50 mL.
- Jeringas de plástico de 10 mL con agujas hipodérmicas desechables con un calibre de 22-G.
- Medio modificado de Basch
- Suspensión de gradiente de Percoll.

Procedimiento:

1. Coloque ~10 mL de la suspensión de cercarias, a una concentración de aproximadamente 1.000 cercarias/mL, en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL.
2. Usando una jeringa de 10 mL con una aguja 22-G, llenar la jeringa con la suspensión y repetidamente pasar a través de la aguja (figura 5). Realizar entre 10 a 15 pases.
3. Añadir medio DMEM al sedimento resultante. Volver a suspender para luego ser purificado mediante la separación por gradiente de Percoll, antes de cultivar.

Purifica esquistosómulas con gradiente de Percoll:

4. Colocar 40 mL a 4 °C de la suspensión del gradiente de Percoll en un tubo de centrifuga de 50 mL. Con una pipeta Pasteur, depositar

6. Anexo metodológico

la capa suavemente con 10 mL de la suspensión de cercarias hasta completar los 50 mL en la parte superior de la suspensión gradiente de Percoll.

5. Centrifugar 15 minutos a 500 x g, a 4 °C.
6. Retirar y desechar todo lo que esté por encima de la columna formada por los cuerpos de las cercarias.
7. Resuspender el precipitado en la solución residual y añadir DMEM a 50 mL de volumen final.
8. Lavar el sedimento final dos veces, cada vez por resuspensión con 50 mL a 4 °C de DMEM, centrifugar durante 5 min a 100 x g, 4 °C, a continuación eliminar el sobrenadante.
9. Colocar los organismos resultantes en recipientes de cultivo de tejidos de 250 mL en 100 mL de DMEM a una densidad de <500 organismos/mL, e incubar a 37 °C y CO₂. Se agregarán antibióticos si la incubación es por un periodo mayor de 8 a 12 h.

6.6 Técnicas hematológicas (Hemavet®)

Breve descripción del equipo: El equipo Hemavet® HV950FS (Drew Scientific Co. Limited, Barrow in Furness; England) es un hemocitómetro que nos proporciona magnitudes sanguíneas de la serie roja, blanca, y plaquetaria a partir de volúmenes pequeños de sangre periférica.

Especificaciones del sistema:

-
- Kit de reactivos: FS-PAKTM. Multispecies Reagent Kit. Contains MULTI- CELL³ TM., DILUENT, CELLYSE XI³TM., CELLYSE XII³TM. and CD CleanTM.
 - Volumen de muestra requerido: mínimo 20 μ L.
 - Tiempo que necesita para realizar el “START-UP” = 5 minutos. Tiempo del ciclo corto de limpieza: 15 minutos.
 - Tiempo del ciclo largo de limpieza: 30 minutos. Tiempo del análisis por muestra: 2 minutos.

Operaciones previas al análisis:

- Se toma al menos 20 μ L de sangre total.
- Utilizar tubos con EDTA-K3 como anticoagulante.
- Colocarlos en Speci-Mix blood rocker, mínimo durante 10 min.
- Sacar los tubos y realizar un movimiento de inversión manual mínimo 3 veces.
- Observar cuidadosamente las muestras, en caso de existir coágulos desechar la muestra.

Procedimiento:

1. Realizar un ciclo largo de limpieza: 30 minutos.
2. Homogenizar la muestra en los tubos con anticoagulante.
3. Transvasar 20 μ L a un tubo de 1,5 mL (Eppendorf[®]).

Materiales:

- Inhibidores de proteasas: EDTA (E6758, Sigma), PMSF (P7626, Sigma), Pepstatin A (P5318, Sigma), TPCK (T4376, Sigma).
- PBS estéril.
- Material biológico del parásito.
- Sonicador.
- Kit BCA (23235, Pierce) para medir la concentración de proteínas.

Procedimiento (figura 6):

1. Se parte de la cantidad de antígeno procedente de 20 parejas de parásito/mL; trabajar siempre sobre hielo.
2. Lavar los vermes 3-4 veces en PBS pH 7,2 estéril.
3. Incorporar los siguientes inhibidores de proteasas a las concentraciones indicadas en la tabla.
4. Macerar con una varilla estéril.
5. Someter al homogenizado a tres ciclos de congelación/descongelación.
6. Centrifugar a 30.000 g durante 30 min. Recoger el sobrenadante.
7. Realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida.
8. Determinar la concentración de proteína mediante el kit BCA: Se basa en el método de Bradford, la concentración proteica se calcula por colorimetría en un espectrofotómetro.

6.8 Valoración de la respuesta inmune:

6.8.1 Técnica inmunológica, respuesta inmune humoral: ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra *S. mansoni*

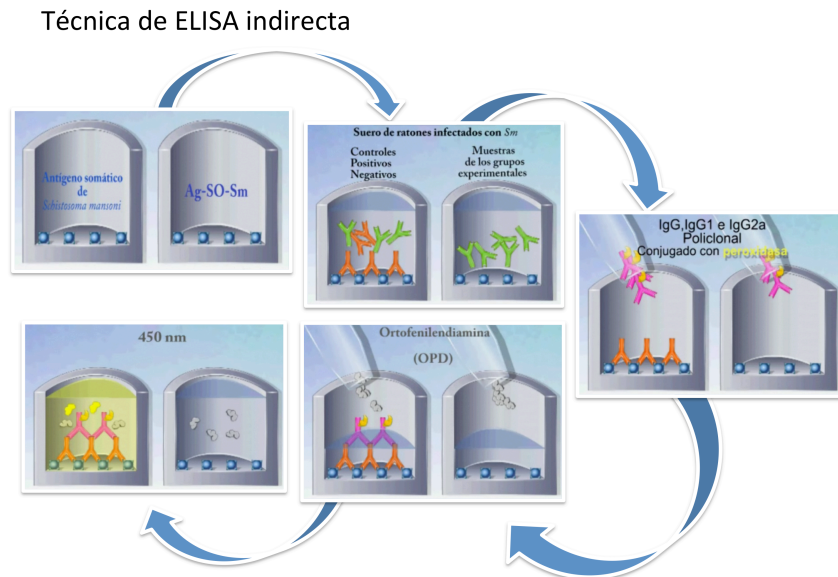


Figura 7: Técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos frente a *S. mansoni*.

Materiales:

- Placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (COSTAR 3369).
Tampón carbonato, pH 9.6.
- Tampón citrato, pH 5.

-
- PBS-tween-20 0,005 % (PBST). BSA 2 % (A2153, Sigma).
 - OPD (o-Phenylenediamine P1526, Sigma). H₂O₂ (141076, Panreac).
 - H₂SO₄ 2N.
 - Anti-IgG total (A-5906, Sigma), anti-IgG1 (5037, Nordic Immunology) y anti-IgG2a (5018, Nordic Immunology).

Procedimiento (figura 7):

1. Tapizar cada pocillo de una placa de poliestireno de fondo plano con 100 mL del antígeno somático (AgSo) de *S. mansoni* en tampón carbonato, pH 9.6, con una concentración de 5 mg/mL.
2. Incubar durante 24 horas a 4 °C.
3. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150 µL PBST durante 4 min.
4. Se incorpora 100 µL por pocillo de una solución BSA 2 %. Cubrir la placa con papel aluminio e incubar 60 min. a 37 °C.
5. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150 µL PBST durante 4 min.
6. Diluir los sueros a 1/100 en PBST y dispensarlos por duplicado (100 mL/pocillo). Cubrir la placa con papel aluminio e incubar 60 min., T^a 37 °C.
7. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150 µL PBS-tween-20 0,005 % durante 4 min.

6. Anexo metodológico

8. Añadir 100 mL en cada pocillo de la anti-inmunoglobulina a una dilución adecuada en PBST. Cubrir la placa con papel aluminio e incubar (60 min., T^a 37 °C).
9. Descartar el líquido de la placa y hacer tres lavados con 150 µL PBST durante 4 min.
10. Añadir 100 mL de solución de revelado que consta de 10 mL de tampón citrato pH 5,4 µL de H₂O₂ y 0,028 mg de OPD.
11. Incubar en oscuridad durante 10 min.
12. Parar la reacción con 50 mL por pocillo de solución de H₂SO₄ 2N y leer la placa en un lector de ELISA a 450 nm (Anthos 2020, instrumentos de Labtec Anthos, Wals, Austria).

6.8.2 Técnica inmunológica, respuesta inmune celular: Citometría de flujo para cuantificar citocinas

Las cantidades relativas de IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α fueron cuantificadas en suero de ratones infectados con *S. mansoni* y tratados con PZQ, EDLF y la combinación PZQ+EDLF por citometría de flujo. Se disponía de unas esferas tapizadas con anticuerpos específicos contra cada citocina que fue cuantificada. Las esferas fueron diferenciadas en un citómetro de flujo al tener dos tamaños diferentes, 4 y 5 µm, respectivamente, y emitir diferentes intensidades de fluorescencia. De esta forma, se pudieron distinguir 10 subpoblaciones de esferas diferentes, cada una correspondiente con la citocina a cuantificar.

Después, se añadió una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con biotina, los cuales se unen a las citocinas que previamente se habían unido a las esferas marcadas con anticuerpo primario. Finalmente, el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina fue añadido y se unió al anticuerpo secundario conjugado con biotina, emitiendo señales fluorescentes que fueron detectadas en el citómetro de flujo Becton Dickinson FACS® calibre del Servicio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca -CIC- y posteriormente analizadas con el software FlowCytomix Pro de Bender MedSystems y la concentración de cada citocina fue determinada a partir de curvas de calibración usando citocinas recombinantes de ratón a una concentración conocida.

APÉNDICE A.

PREMIO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

III CERTAMEN DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA 2013
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA 2014

El Vicerrectorado de Atención al Estudiante y Extensión Universitaria
de la Universidad de Salamanca
concede una mención honorífica a

Edward Yepes Victoria

por el trabajo titulado “Actividad anti-esquistosoma *in vitro*
e *in vivo* de la edelfosina, un análogo alquilfosfolípido

En Salamanca a 20 de mayo de 2014



Cristina Pita Yáñez

Vicerrectora de Atención al Estudiante y Extensión Universitaria



APÉNDICE B.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA EN CONGRESOS



**El XX Congreso Federación Latinoamericana de Parasitología y
XV Congreso Asociación Colombiana de Parasitología y Medicina
Tropical**

Certifica que:

Edward Yepes Victoria

**Participó como *expositor* en el Congreso realizado entre el 27
de Septiembre y el 1 de Octubre de 2011 en la Universidad de
los Andes Bogotá, Colombia.**

Felipe Guhl
Presidente de la XX FLAP

Iván Darío Vélez
Presidente de la ACPMT

Póster:

- **Edward Yepes**, Rubén E. Varela, Julio López-Abán, José Rojas-Caraballo, Faustino Mollinedo, Antonio Muro. Efecto de la edelfosina durante la fase profiáctica de la infección con *Schistosoma mansoni*. *Biomédica* 2011; 31(sup.3):23-205. ISSN 01120-4157.
- Rubén E. Varela, Janny A. Villa-Pulgarín, **Edward Yepes**, Ingrid Müller, Manuel Modolell, Diana L. Muñoz, Sara M. Robledo, Carlos Muskus, Julio López-Abán, Antonio Muro, Iván D. Vélez, Faustino Mollinedo. Eficacia in vitro e in vivo del alquil-lisofosfolípido de edelfosina contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. y en *Leishmania panamensis* resistente al antimonio pentavalente. *Biomédica* 2011; 31(sup.3):23-205. ISSN 01120-4157
- Ondra Nesuta,; Eduardo Varela, Rubén; López Abán, Julio; Fari Shariati,; **Edward Yepes Victoria**; Kramárová A,. Modulación de la producción de Óxido Nítrico en macrófagos alveolares por moléculas extraídas de *Schisandria*, *Paulownia*, *Morus* y *Maclura*. *Enf. Emerg, España* 2010; Vol. 12, n. 1, p. 73-74 ISSN 1575-4723.
- F. Shariati Sharifi, J. López-Abán, A. Paramá, L. Pérez del Villar, **E. Yepes**, A. Esteban, B. Vicente, JL. Pérez-Arellano, Andrade A, A. Muro. Evaluación de la expresión de VEGF y FGF2 en macrófagos alveolares de rata estimulados con antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. *Enf. Emerg, España* 2008; Vol.10, n. 1, p. 57-58. ISSN 1575-4723.

APÉNDICE C.

TRATAMIENTOS RECOMENDADOS PARA LAS
PRINCIPALES ENFERMEDADES TROPICALES

DESATENDIDAS.

Enfermedades Tropicales Desatendidas	
	Fármaco y dosis
Infecciones causadas por parásitos	
Enfermedad de Chagas	Nifurtimox 8-10 mg/kg x 30-60-(90) d o Benznidazol 5-7.5 mg/kg x 30-60-(90) d
Tripanosomosis africana	Pentamidina 4 mg/kg i.m. or i.v. (max. 200 mg/d) x 7 d Nifurtimox (oral 15 mg/kg/ día (en 3 dosis) x 10 d + eflornitina i.v. 400 mg/kg/day (en 2 dosis) x 7 d Suramina 20 mg/kg i.v. (max. 1 g/d) a los días 1, 3, 7, 14 y 21 Melarsoprol 2.2 mg/kg i.v. x 10 d
Leishmaniosis	Amfotericina Liposomal B 3 mg/kg i.v. días 1-5, 14 y 21 Varios fármacos y regímenes y vía de aplicación, de acuerdo con las especies y manifestación clínica. Tópico: 15% paromomicina / 12% pomada metilbencetonio-cloruro, calor local. / crioterapia, pentavalente antimoniales intralesional Sistémico: Antimonio pentavalente, Miltefosina, Amfotericina Liposomal B, Ketoconazol
Helmintos	
Teniosis/cisticercosis ^a	Niclosamida (humanos) 0,5- 2 g PZQ (humanos) 5-10 mg/kg OD / 15 días of PZQ (50 mg/kg diaria) ^a OFZ (cerdos) 30 mg/kg
Dracunculosis	Ningún fármaco preventivo o fármacos para el tratamiento masivo.
Hidatidosis	ABZ 10 mg/kg BID MBZ 40-50 mg/kg TID x 3 d
Trematodos transmitidas por los alimentos	
Paragonimosis	PZQ 25 mg/kg TID x 3 d TBZ 10 mg/kg OD x 1-2 d
Clonorquiosis	PZQ 25 mg/kg TID x 1 d
Opistorquiosis	PZQ 25 mg/kg TID x 1 d
Fasciolosis	TBZ 10 mg/kg OD x 2 d
Filarias linfáticas	Doxiciclina 100 mg BID x 4 semana + ivermectina 200 µg/kg dosis única ± ABZ 400 mg dosis única alternativa: dosis única de DEC 6 mg/kg + ABZ 400 mg durante 3-6 meses
Oncocercosis	Doxiciclina 100 mg BID x 4 semanas + ivermectina* 200 µg/kg unica dosis durante 4-6 meses (* no utilizar en los casos de co-infección con Loa loa)
Geohelmintosis	
Uncinariosis	ABZ 400 mg OD x 3 d MBZ 100 mg BID x 3 d
Ascariosis	ABZ 400 mg OD x 3 d MBZ 100 mg BID x 3 d
Tricurosis	ABZ 400 mg OD x 3 d MBZ 100 mg BID x 3 d
Estrongiloidosis	Ivermectina 200 µg/kg OD x 2d ABZ 400 mg BID x 7 d
Esquistosomosis	PZQ 40 mg/kg dosis única
Infecciones causadas por bacterias	
Tracoma	Azitromicina 20 mg/kg
Úlcera de Buruli	Rifampicina 10 mg/kg OD + estreptomina 15 mg/kg OD or rifampicina 10 mg/kg OD + claritromicina 7.5 mg/kg BID
Treponematosis endémica	Azitromicina 30 mg/kg, máxima dosis 2g
Leprosia	
Leprosia Multibacilar (MB) leprosis	Rifampicina: 600 mg durante un mes Dapsona: 100 mg diaria Clofazimina: 300 mg durante un mes y 50 mg diarios x 12 meses.
Leprosia Paucibacilar (PB)	Rifampicina: 600 mg durante un mes Dapsona: 100 mg diaria x 6 meses.
Lesiones únicas en piel Leprosia paucibacilar	Rifampicina: 600 mg Ofloxacina: 400 mg Minociclina: 100 mg x dosis única.
Infecciones causadas por virus	
Dengue	No hay tratamiento específico para la fiebre del dengue
Rabia	No hay fármacos para el tratamiento masivo, existen protocolos que deben ser iniciados tan pronto como sea posible, después de la exposición o mordedura ocasionada por animal sospechoso de rabia.

^aLos esquemas actualmente aceptados. OD: dosis única al día,
BID: dos veces al día, TID: tres veces al día.

Tabla 1: Tratamientos recomendados para las principales enfermedades tropicales desatendidas.



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESiS DOCTORAL

Efecto *in vitro* e *in vivo* de los análogos
alquilfosfolípidos (APLs) en el desarrollo de nuevos
compuestos contra *Schistosoma mansoni*

EDWARD YEPES VICTORIA

FACULTAD D FARMACIA

DPTAMENTO D BiOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QVÍMICA AGRÍCOLA
2015



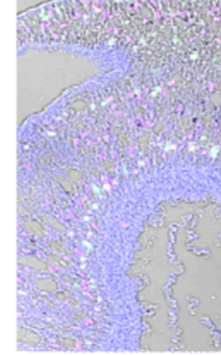
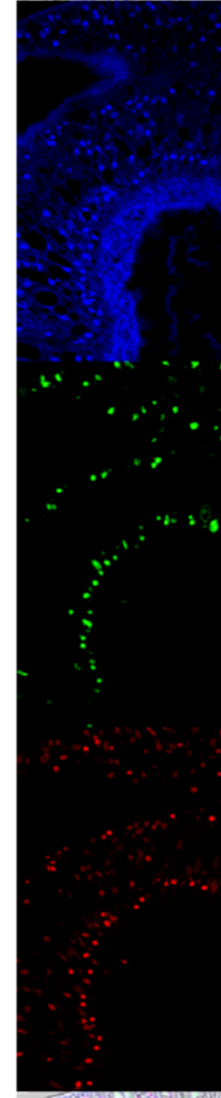
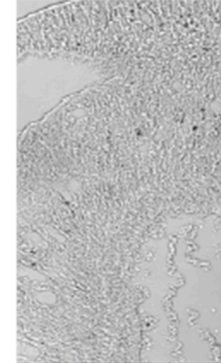
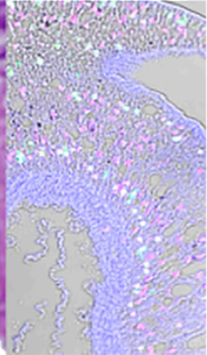
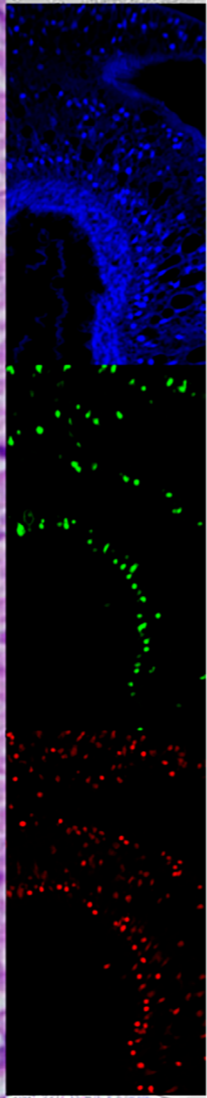
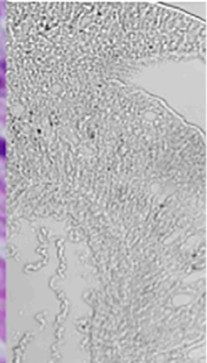
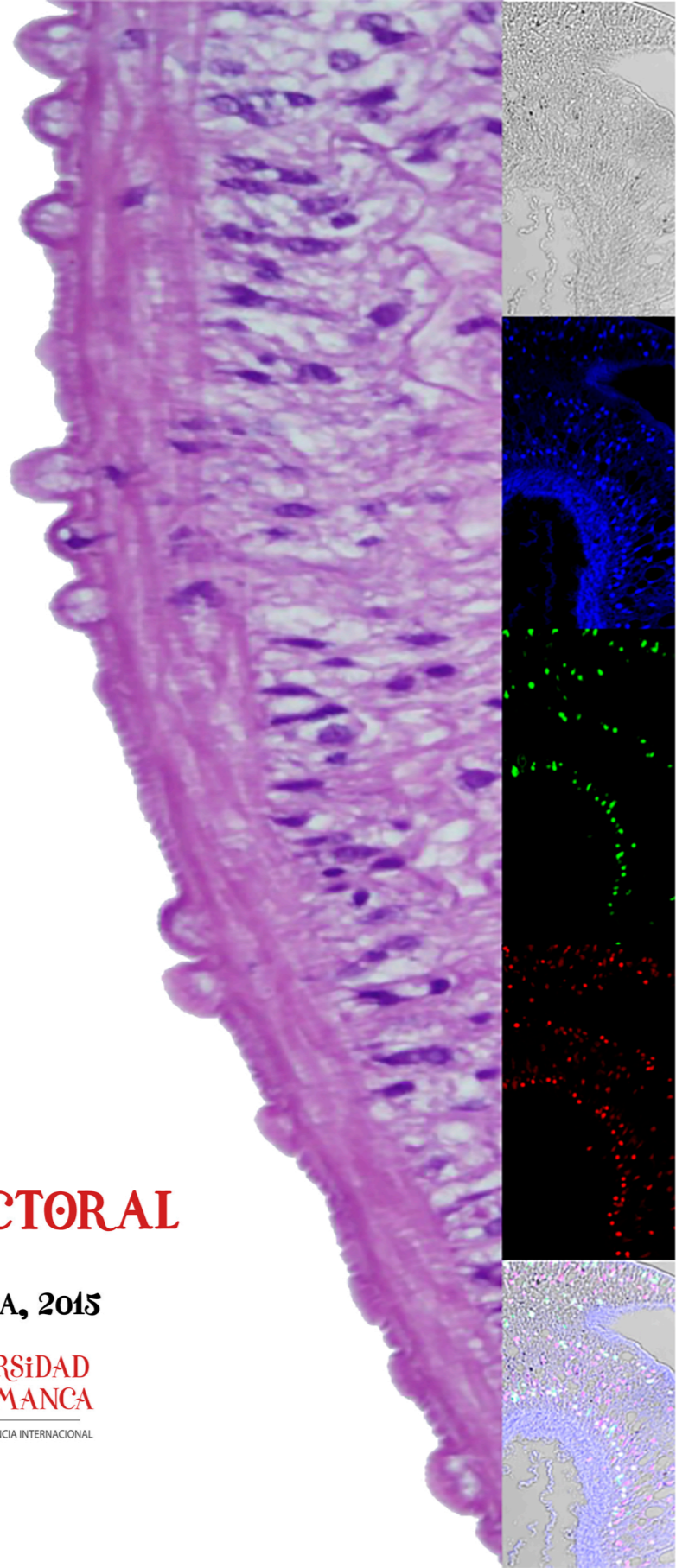
TESiS DOCTORAL

SALAMANCA, 2015



EDWARD YEPES
VICTORIA

EFFECTO *in vitro* E *in vivo* D LOS ANÁLOGOS
ALQUILFOSFOLÍPIDOS (APLs) EN EL DSARROLLO D NVEVOS
COMPUESTOS CONTRA *Schistosoma mansoni*





VNIVERSID
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

EFFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO*
D LOS
ANÁLOGOS ALQUILFOSFOLÍPIDOS (APLs)
EN EL
DESARROLLO D NVEVOS
COMPUESTOS CONTRA
SCHISTOSOMA MANSONI

EDWARD YEPES VICTORIA

SALAMANCA, 27 D JULIO D 2015



VNIVERSID
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

SUPPORTING INFORMATION

