

FACULTAD DE FARMACIA

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

ÁREA DE PARASITOLOGÍA

Tesis presentada como requisito para optar al título  
de Doctor por la Universidad de Salamanca

Evaluación de nuevos compuestos con actividad  
antiparasitaria frente a *Trypanosoma cruzi* y  
*Strongyloides venezuelensis*



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Ana Lucya Legarda Ceballos**

Salamanca, a 20 de junio de 2016



---

# TESIS DOCTORAL EN FORMATO COMPENDIO DE ARTÍCULOS

---

La escritura principal de esta Tesis Doctoral corresponde a un compendio de tres trabajos, dos previamente publicados, y uno en etapa de evaluación, como a continuación se describen:

## Artículo 1

### Trypanocidal Activity of Long Chain Diamines and Aminoalcohols

#### Autores:

Ana L. Legarda-Ceballos<sup>1</sup>, Esther del Olmo<sup>2</sup>, Julio López-Abán<sup>1</sup>, Ricardo Escarcena<sup>2</sup>, Luis A. Bustos<sup>3</sup>, Cristina Fonseca-Berzal<sup>4</sup>, Alicia Gómez-Barrio<sup>4</sup>, Juan C. Dib<sup>5</sup>, Arturo San Feliciano<sup>2</sup>, Antonio Muro<sup>1</sup>

#### Afiliación de los autores:

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Immunology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain.

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain.

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Sciences, Catholic University of the North, 0610-Antofagasta, Chile.

<sup>4</sup>Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid (CEI Campus Moncloa, UCM-UPM CSIC), 28040-Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Research Center on Health for the Tropics, (CIST), Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Magdalena, Colombia

*Molecules* 2015, 20, 11554-11568; doi:10.3390/molecules200611554

**Corresponding author: Esther del Olmo (olmo@usal.es)**

## Artículo 2

*In vitro* and *in vivo* evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*

### Autores:

Ana L. Legarda-Ceballos<sup>1</sup>, Julio López-Abán<sup>1</sup>, Esther del Olmo<sup>2</sup>, Ricardo Escarcena<sup>2</sup>, Luis Bustos<sup>3</sup>, Jose Rojas-Caraballo<sup>1,a</sup>, Belén Vicente<sup>1</sup>, Pedro Fernández-Soto<sup>1</sup>, Arturo San Feliciano<sup>2</sup>, Antonio Muro<sup>1</sup>

### Afiliación de los autores:

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Molecular y Parasitología, Facultad de Farmacia, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, España

<sup>2</sup>Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, España

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Antofagasta, Chile

<sup>a</sup>Current address: Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST), Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Magdalena, Colombia. Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Magdalena, Colombia

**Corresponding author: Julio López-Abán (jlaban@usal.es)**

**Artículo aceptado en Parasites & Vectors (2016). doi 10.1186/s13071-016-1648-5**

### Artículo 3

**The alkylphospholipid edelfosine shows activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death**

#### **Autores:**

**Ana L. Legarda-Ceballos<sup>1</sup>**, Jose Rojas-Caraballo<sup>1</sup>, Julio López-Abán<sup>1</sup>, Ana Lucia Ruano<sup>1,2</sup>, Edward Yepes<sup>1</sup>, Consuelo Gajate<sup>3</sup>, Faustino Mollinedo<sup>3</sup>, Antonio Muro<sup>1</sup>

#### **Afiliación de los autores:**

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca - Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (IBSAL-CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Castilla y León, Spain

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Médicas - Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

<sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Castilla y León, Spain

**Corresponding author: Antonio Muro (ama@usal.es)**

**Artículo enviado a Acta Tropica (2015). Manuscript Number: ACTROP-D-15-00866.**



---

## DEDICATORIA

---

*A mis padres: Mauro y Mariana, por su amor,  
apoyo incondicional y la oportunidad  
de alcanzar diferentes metas en mi vida*

*A John Jorge, por su amor, ternura,  
comprensión y cariño en todos estos años*





---

## CERTIFICACIÓN

---

Dr. Antonio Muro Álvarez, Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, Dra. Esther del Olmo Fernández, Profesora Titular del Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y Dr. Julio López Abán, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca

Certifican:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Evaluación de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria frente a *Trypanosoma cruzi* y *Strongyloides venezuelensis***” que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada por D<sup>a</sup> Ana Lucya Legarda Ceballos bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. Consideramos que la presente Tesis Docotoral reúne los requisitos necesarios por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 20 de junio de 2016.

Antonio Muro Álvarez      Esther del Olmo Fernández      Julio López Abán



---

## AGRADECIMIENTOS

---

Concluida la presente Tesis Doctoral, deseo agradecer a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han intervenido en la realización de este trabajo. En primer lugar, dar gracias a Dios, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por darme paciencia y fuerza para afrontar los momentos difíciles; y por haber puesto en mi camino a personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Quiero agradecer sinceramente a mis directores de Tesis Doctoral: Dr. Antonio Muro Álvarez, Dra. Esther del Olmo Fernández y Dr. Julio López Abán por brindarme su colaboración, paciencia, conocimientos, experiencia, amistad, por su guía, por sus constantes consejos, por darme la oportunidad de continuar estudiando y abrirme las puertas de sus grupos de investigación; mi total agradecimiento ya que sin su orientación esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible.

A los miembros del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, en especial al Dr. Arturo San Feliciano, por su apoyo científico, guía, consejos, tiempo y valiosa amistad.

Al Dr. Faustino Mollinedo García, por su apoyo y accesibilidad para la elaboración de experimentos utilizados en este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Carlos Dib Díaz-Granados, por sus consejos, y por enseñarme en el aprendizaje del tema *Trypanosoma cruzi*.

Quiero agradecer a los doctores que han colaborado en este trabajo realizando ensayos de bioactividad anti-*Trypanosoma cruzi*: Dr. Juan José Nogal, Dra. Alicia Gómez Barrio y Dra. Cristina Fonseca Berzal del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Complutense de Madrid.

A mis padres, Mauro Legarda y Mariana Ceballos, más que dedicarles este trabajo, se lo entrego, gracias por el incondicional esfuerzo en todo proyecto que he emprendido a lo largo de mi vida, y darme la oportunidad

de crecer profesionalmente siempre buscando lo mejor para mí; por su apoyo en la distancia, dándome fuerza y serenidad para no decaer. Los amo con todo mi corazón; este también es un triunfo de ustedes.

A John Jorge Muñoz, gracias por su continua comprensión y ayuda en los momentos difíciles, por brindarme su apoyo incondicional, cuidarme, y motivarme; por todo su amor y cariño, por ser mí amigo y mi cómplice, eres mi sostén en todo momento pero sobre todo por hacerme feliz.

A mi buen amigo, compañero y consejero José Vicente Rojas, por escucharme, ayudarme, darme valor, brindarme sus sabios consejos, su extraordinario apoyo, perseverancia y fuerza para afrontar los momentos difíciles; por esa linda y sincera amistad, por estar todo momento guiándome, y convirtiéndose en pieza fundamental para que este trabajo llegase a buen término; eternamente agradecida. Gracias a ti también Yamileth Monje por la paciencia, tolerancia y comprensión.

A Belén Vicente, por ser mi amiga, cómplice, consejera y una madre en estas tierras; las charlas, los buenos momentos, siempre los llevaré conmigo y recordaré con cariño siempre.

A mis compañeros de laboratorio CIETUS de la Facultad de Farmacia; Edward Yepes, Juan Hernández, Javier Gandasegui, Carmen Vieira y toda la gente que me ha permitido compartir durante mi estancia y horas de trabajo, muchísimas gracias por todo su apoyo, amistad y ánimo en todo el proceso de aprendizaje.

A mi gente querida de Salamanca que conocí durante estos años y llegaron a ser mi familia adoptiva, David Sánchez, Adela Salinero, Pilar Gallego, Jordy Gallego, Margarita Buitrago y Diana Ochoa, gracias por el afecto, constante motivación y sincera amistad.

---

## RESUMEN

---

Las Enfermedades Tropicales Olvidadas o Desatendidas representan un grupo de infecciones que afectan a una gran parte de la población humana, especialmente aquella que vive en condiciones de pobreza y donde las condiciones higiénicas y sanitarias son deficientes. Estas enfermedades son causadas por diferentes agentes infecciosos entre los que se encuentran parásitos, virus y bacterias, siendo los parásitos los que causan mayor afectación a los seres humanos.

A pesar de que actualmente la mayoría de estas enfermedades se pueden tratar eficazmente con agentes quimioterapéuticos, aspectos como la generación de resistencias a los fármacos de elección, su elevada citotoxicidad y generación de efectos adversos, que pueden llegar a ser graves, hacen que la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento y/o prevención sea una prioridad.

El Departamento de Química Farmacéutica (Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca) tiene una gran experiencia en el diseño y síntesis de compuestos con actividad antiparasitaria, especialmente en la obtención de derivados de la esfingosina, compuesto con una importante actividad biológica. Junto con la amplia experiencia del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS) en el manejo de modelos experimentales y ciclos biológicos de agentes infecciosos, en el presente estudio, evaluamos la eficacia antiparasitaria de diversos compuestos derivados de esfingosina, principalmente aminoalcoholes y diaminas, frente al protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas, parasitosis ampliamente distribuida, no solo en el continente americano, sino también en países no endémicos y el nematodo *Strongyloides stercoralis*, agente causal de la estrongiloidosis, una geohelmintosis ampliamente distribuida en el mundo. Además, dada la experiencia que el CIETUS ha adquirido durante los últimos años en el conocimiento de la actividad antiparasitaria de alquilfosfolípidos, entre los que se encuentran edelfosina, miltefosina y perifosina, en el presente estudio también evaluamos la actividad anti-*Strongyloides* de la edelfosina, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, además de investigar acerca de su

mecanismo de acción en ensayos *in vitro*, utilizando la técnica de TUNEL.

Los estudios *in vitro* utilizando macrófagos peritoneales de ratón demostraron la baja citotoxicidad de la mayoría de los compuestos derivados de esfingosina, así como de los alquilfosfolípidos en un amplio rango de concentraciones. La actividad *in vitro* frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* puso en evidencia la alta actividad de 5 compuestos derivados de esfingosina, 3 aminoalcoholes y 2 diaminas, mientras que la actividad *in vitro* frente a tripomastigotes intracelulares en fibroblastos de ratón mostraron una elevada actividad de 1 aminoalcohol.

En lo referente a los estudios de actividad frente a *S. venezuelensis*, los estudios *in vitro* evidenciaron una buena actividad de 4 derivados de esfingosina, 2 aminoalcoholes y 2 diaminas, los cuales llevados a posteriores estudios *in vivo* demostraron buena actividad de 1 aminoalcohol.

Respecto a la actividad antiparasitaria de los alquilfosfolípidos edelfosina, miltefosina y perifosina frente a *S. venezuelensis*, encontramos una mejor actividad, tanto *in vitro* como *in vivo* de edelfosina en un amplio rango de concentraciones, la cual está relacionada con un mecanismo similar a apoptosis.

El conjunto de resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos llevaron a la identificación de nuevos compuestos derivados de esfingosina, así como de edelfosina, como prototipos que precisan ser refinados para la obtención de candidatos y ser utilizados en las parasitosis producidas por *T. cruzi* y *S. stercoralis*.

---

## ABREVIATURAS

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AKT</b>	<i>Serine/threonine kinase B</i>
<b>APLs</b>	Alquilfosfolípidos, del inglés <i>Alkylphospholipids analogs</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATLs</b>	Antitumorales lipídicos, del inglés <i>Synthetic Antitumor Lipids</i>
<b>BCRDHH</b>	Bloqueo Completo de la Rama Derecha del Haz de His
<b>BCRIHH</b>	Bloqueo Completo de la Rama Izquierda del Haz de His
<b>CCR5</b>	Quimiocina receptora de tipo 5
<b>CD<sup>+</sup></b>	<i>Cluster of differentiation-positive</i>
<b>CDC</b>	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
<b>CPRG</b>	Clorofenol rojo D-galactopiranosido; del inglés <i>Chlorophenol Red-β-D-Galactopyranoside</i>
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono
<b>CXCR4</b>	Co-receptor de entrada de tipo 4
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido, del inglés <i>Dimethylsulfoxide</i>
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés <i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
<b>Fas/CD95</b>	<i>Fas ligand/CD95 ligand</i>
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico, del inglés $\gamma$ - <i>Aminobutyric acid</i>
<b>GPI</b>	Glicosil-fosfatidil-inositol, del inglés <i>Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol</i>
<b>HAI</b>	Hemaglutinación Indirecta
<b>HBAS</b>	Hemibloqueo anterior
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón

<b>HPG</b>	Huevos por gramo
<b>HTLV</b>	Virus linfotrópico humano, del inglés <i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia Indirecta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IR</b>	Infrarrojos
<b>LAMP</b>	del inglés <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
<b>LIT</b>	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
<b>MEM</b>	Medio esencial mínimo, del inglés <i>Minimum Essential Medium</i>
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>MS</b>	Espectrometría de masas, del inglés <i>Mass Spectrometry</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
<b>NIE</b>	del inglés <i>recombinant antigen</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>rTdT</b>	Enzima desoxinucleotidil transferasa Terminal
<b>S1P</b>	Esfingosina 1- fosfato, del inglés <i>Sphingosine-1-phosphate</i>
<b>SAPA</b>	Antígeno de expresión de fase aguda, del inglés <i>Sheed Acute Phase Antigen</i>
<b>SCP/TAPS</b>	Moléculas inmunomoduladoras en los parásitos nematodos
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SsIR</b>	del inglés <i>S. stercoralis immunoreactive antigen</i>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento tumoral beta
<b>Th</b>	Células T-ayudadoras, del inglés <i>T-Helper cells</i>
<b>TLR</b>	Receptor de tipo-Toll, del inglés <i>Toll-like Receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling</i>
<b>VIH/SIDA</b>	Virus de inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida, del inglés <i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
<b>WGS</b>	<i>Whole - Genome Shotgun</i>
<b>XTT</b>	<i>2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide</i>



---

## LISTADO DE FIGURAS

---

1.1	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	6
1.2	Moléculas de <i>Trypanosoma cruzi</i> implicadas en procesos de reconocimiento e infección a células del hospedador. . . . .	7
1.3	Lesiones histopatológicas básicas de la miocardiopatía chagásica. . . . .	13
1.4	Manejo de la enfermedad de Chagas en mujer embarazada. . . . .	15
1.5	Fases del ciclo biológico de <i>Strongyloides venezuelensis</i> . . . . .	20
1.6	Ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i> . . . . .	23
1.7	Prevalencia global de la infección por <i>Strongyloides stercoralis</i> . . . . .	24
1.8	Manifestaciones clínicas de la estrongiloidosis. . . . .	27
1.9	Estructuras químicas de la esfingosina, esfinganina y ceramida. . . . .	31
1.10	Estructura química de la esfingosina 1-fosfato. . . . .	31
1.11	Estructura genérica I de compuestos relacionados estructuralmente con dihidroesfingosina. . . . .	32
1.12	Estructura química de compuestos relacionados con el tipo I con un largo de cadena variable. . . . .	32
1.13	Estructuras químicas de alquilfosfolípidos. . . . .	34
4.1	Esquema de obtención de aminoalcoholes y diaminas . . . . .	110
4.2	Obtención de L3 de <i>Strongyloides venezuelensis</i> mediante la técnica de Baermann . . . . .	113



---

## LISTADO DE TABLAS

---

1.1	Características del genoma de las principales especies de <i>Trypanosoma</i> . . . . .	5
1.2	Prevalencia de la enfermedad de Chagas en Europa. . . . .	10
1.3	Alteraciones electrocardiográficas y ecocardiográficas de la enfermedad de Chagas. . . . .	14
1.4	Tratamiento de la enfermedad de Chagas. . . . .	16
1.5	Seguimiento de la enfermedad de Chagas. . . . .	18
1.6	Prevalencia global de <i>Strongyloides stercoralis</i> en regiones endémicas y no endémicas de la enfermedad. . . . .	25
1.7	Tratamiento de la estrogiloidosis . . . . .	30
4.1	Aminoalcanoles y alcanodiaminas ensayadas en este trabajo. .	111
4.2	Principales características de las cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas en este estudio . . . . .	112



---

# ÍNDICE

---

<b>DEDICATORIA</b>	<b>vii</b>
<b>CERTIFICACIÓN</b>	<b>ix</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xiii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xv</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b>	<b>xix</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos actuales de las parasitosis producidas por <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Strongyloides</i> spp. . . . .	1
1.1.1 Enfermedad de Chagas . . . . .	1
1.1.1.1 Agente etiológico . . . . .	2
1.1.1.2 <i>Trypanosoma</i> : Genoma, transcriptoma y proteoma . . . . .	3
1.1.1.3 Ciclo biológico . . . . .	4
1.1.1.4 Epidemiología . . . . .	8
1.1.1.5 Patogenia . . . . .	10
1.1.1.5.1 Mecanismos de agresión . . . . .	10
1.1.1.5.2 Mecanismos de defensa . . . . .	11
1.1.1.5.3 Mecanismos de evasión . . . . .	12

1.1.1.6	Manifestaciones clínicas . . . . .	12
1.1.1.7	Diagnóstico . . . . .	14
1.1.1.8	Tratamiento . . . . .	15
1.1.2	Estrongiloidosis . . . . .	17
1.1.2.1	Agente etiológico . . . . .	18
1.1.2.2	<i>Strongyloides</i> : Genoma, transcriptoma y proteoma . . . . .	19
1.1.2.3	Ciclo biológico . . . . .	22
1.1.2.4	Epidemiología . . . . .	23
1.1.2.5	Patogenia . . . . .	25
1.1.2.6	Manifestaciones clínicas . . . . .	26
1.1.2.7	Diagnóstico . . . . .	28
1.1.2.8	Tratamiento . . . . .	29
1.2	Nuevas alternativas terapéuticas . . . . .	30
1.2.1	Aminoalcoholes y alcanodiaminas . . . . .	30
1.2.2	Agentes antitumorales aplicados a la terapia de la enfermedad parasitaria . . . . .	32
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>35</b>
<b>2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>		<b>53</b>
2.1	Hipótesis . . . . .	53
2.2	Objetivo General . . . . .	53
2.3	Objetivos Específicos . . . . .	54
<b>3 ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN</b>		<b>55</b>
3.1	Artículo 1: Trypanocidal activity of long chain diamines and aminoalcohols . . . . .	55
3.2	Artículo 2: <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation of alkyl-aminoalcohols and diamines against <i>Strongyloides venezuelensis</i> . . . . .	73
3.3	Artículo 3: The alkylphospholipid edelfosine shows activity against <i>Strongyloides venezuelensis</i> and induces apoptosis-like cell death . . . . .	85

<b>4 ANEXO METODOLÓGICO</b>	<b>109</b>
4.1 Compuestos . . . . .	109
4.1.1 Síntesis de aminoalcanoles y alcanodiaminas . . . . .	109
4.1.2 Alquilfosfolípidos . . . . .	110
4.2 Material biológico . . . . .	111
4.2.1 Epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	111
4.2.2 Tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	112
4.2.3 Ciclo biológico de <i>Strongyloides venezuelensis</i> . . . . .	112
4.3 Estudios <i>in vitro</i> . . . . .	113
4.3.1 Cultivo de macrófagos peritoneales y fibroblastos de ratón . . . . .	113
4.3.2 Evaluación de la citotoxicidad en macrófagos . . . . .	114
4.3.3 Ensayo de citotoxicidad inespecífica en fibroblastos . . . . .	115
4.3.4 Ensayo de susceptibilidad en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	115
4.3.5 Ensayo de susceptibilidad en amastigotes . . . . .	116
4.3.6 Ensayo de susceptibilidad de L3 de <i>Strongyloides</i> <i>venezuelensis in vitro</i> . . . . .	117
4.3.7 Test de viabilidad celular mediante XTT en L3 de <i>Strongyloides venezuelensis</i> . . . . .	118
4.3.8 Técnica de TUNEL para estudio de apoptosis . . . . .	118
4.4 Estudios <i>in vivo</i> . . . . .	119
4.4.1 Declaración ética y animales de experimentación . . . . .	119
4.4.2 Actividad de edelfosina frente a <i>Strongyloides</i> <i>venezuelensis</i> . . . . .	120
4.4.3 Actividad de aminoalcoholes y diaminas frente a <i>Strongyloides venezuelensis</i> . . . . .	120
4.4.4 Estudio de la viabilidad de larvas tratadas inoculadas en ratones . . . . .	121
4.5 Análisis estadístico . . . . .	121
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>123</b>
 <b>CONCLUSIONES</b>	 <b>125</b>





# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Aspectos actuales de las parasitosis producidas por *Trypanosoma cruzi* y *Strongyloides* spp.

#### 1.1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana es una infección parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y transmitida a los seres humanos por triatomíneos que se alimentan de sangre. Existen otras formas de transmisión mediante transfusiones de sangre, trasplantes, alimentos contaminados, transmisión vertical de madre a hijo y accidentes de laboratorio. Esta enfermedad fue inicialmente descrita en el año 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas y es endémica en Sudamérica, Centroamérica y México, presentando unos elevados índices de morbilidad y mortalidad. Sin embargo, esta enfermedad ha sido diagnosticada en un gran número de países del mundo, debido principalmente a la elevada migración de la población afectada. Actualmente se estima que entre 8 a 10 millones de personas en el mundo padecen la enfermedad y cerca de 10.000 mueren cada año (Rassi et al., 2010).

La enfermedad de Chagas está incluida en el grupo de enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas de la Organización Mundial de la Salud y actualmente ocupa el cuarto puesto en importancia dentro de las enfermedades tropicales olvidadas de América Latina y el Caribe (Hotez et al., 2008; World Health Organization, 2008). Debido a su gran impacto social y económico, la enfermedad de Chagas también ha sido definida como “el nuevo VIH/SIDA de las Américas” (Hotez et al., 2012). Esta enfermedad tropical desatendida está poco estudiada ya que afecta principalmente a las poblaciones más vulnerables.

### 1.1.1.1 Agente etiológico

*T. cruzi* pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, *phylum* *Sarcomastigophora*, *subphylum* *Mastigophora*, clase *Zoomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, Familia *Trypanosomatidae*, sección *Estercoralia* y género *Trypanosoma*. Existen cuatro formas morfológicas de *T. cruzi*, dependiendo de la fase de su ciclo biológico; en el hospedador invertebrado (triatominos) se presentan las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico; y en el hospedador vertebrado (mamíferos, incluido el ser humano) están las formas de amastigote y tripomastigote.

Las formas del parásito se diferencian entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de la membrana ondulante. Las principales características morfológicas de las diferentes fases del ciclo biológico de *T. cruzi* se describen a continuación:

**Epimastigote:** Es la forma replicativa de multiplicación, no infectiva para el ser humano o mamífero y se encuentra en el intestino del vector invertebrado. De aspecto fusiforme de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de longitud. El cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes. Este estadio morfológico se multiplica en el intestino de los triatominos de manera profusa para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, forma de los parásitos en medio de cultivo.

**Tripomastigote:** Es la forma no replicativa e infectiva para el hombre u otros mamíferos. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, siendo estas últimas las formas infectivas. Tiene una forma alargada y mide de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud. Se distingue un núcleo vesiculoso y hacia la parte posterior de éste se halla el cinetoplasto de forma casi siempre esférica el cual se encuentra localizado posterior al núcleo. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior (De Souza, 2002).

**Amastigote:** Es la forma replicativa intracelular en el hospedador y la que lo distingue de otros miembros del género. Esta forma proviene de la diferenciación de los tripomastigotes, tanto metacíclico como sanguíneo y tiene la capacidad de infectar otras células, mide de 2,0 a 2,5  $\mu\text{m}$ . Su flagelo está secuestrado dentro de una bolsa visible por lo que no tiene un flagelo libre, y presenta un gran núcleo y cinetoplasto que se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo.

### 1.1.1.2 *Trypanosoma*: Genoma, transcriptoma y proteoma

El conocimiento de la secuencia del genoma de *T. cruzi* constituye una valiosa fuente de información para un mejor entendimiento de los procesos biológicos determinantes durante el proceso de infección. De igual forma, permite estudiar la expresión relativa de genes y su identificación como potenciales candidatos a vacuna o para ser utilizados como agentes quimioterapéuticos. La secuencia del genoma de *T. cruzi* fue descrita en el año 2005, la cual se determinó utilizando la técnica *Whole - Genome Shotgun* (WGS). Para determinar la secuenciación del genoma de *T. cruzi*, se utilizó la cepa de referencia CL Brener, la cual ha sido bien caracterizada experimentalmente y pertenece a un híbrido de dos linajes del parásito (IIb y IIc) (Zingales et al., 1997). El tamaño del genoma de *T. cruzi* es de 67 Mb y contiene aproximadamente 12.000 genes haploides. Cerca del 50% del genoma de *T. cruzi* representa una secuencia repetitiva, principalmente de genes que codifican para moléculas de superficie como transialidasas, proteínas de superficie asociadas a mucinas y una glicoproteína de 63 kDa.

La secuencia de repetición también incluye retrotransposones y repeticiones subteloméricas (El-Sayed et al., 2005). Se han descrito 1.052 *clusters* que abarca 8.419 genes, de los cuales 46 grupos contienen 20 o más parálogos que representan la mayor parte codificante del genoma y a menudo se producen en regiones subteloméricas (Freitas et al., 2011). Además, una gran familia de proteínas son los  $\beta$ -galactofuranosil-transferasas, con abundantes glicoconjugados en la superficie celular del parásito, similar a lo observado en *Leishmania major* (Ivens et al., 2005). Un análisis del genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* muestra diferencias con otros eucariotas en la replicación y reparación de ácido desoxirribonucleico (ADN), genes que codifican enzimas en la ruta de glicosilación, como también proteínas de superficie del parásito (El-Sayed et al., 2005). La información del genoma aislado de la cepa CL Brener y de las principales especies de *Trypanosoma* (Tabla 1.1) se encuentra disponible en TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>).

Un aspecto característico del genoma de muchos tripanosomátidos es la ausencia de moléculas importantes en rutas de señalización, como lo son: receptores de serpentina, proteínas G heterotriméricas, diferentes clases de receptores catalíticos, dominios de interacción y factores reguladores de la transcripción (El-Sayed et al., 2005).

La regulación de la expresión génica se presenta a nivel post-transcripcional e incluye la degradación, estabilidad, movilización del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) hacia los polisomas, además del transporte al citoplasma y de la regulación del procesamiento del transcrito primario (trans-splicing y poliadenilación), eficiencia de traducción y modificaciones post-transduccionales (Haile & Papadopoulou, 2007;

Gutiérrez & Padilla, 2008). Por tanto, la secuenciación de ARN para caracterizar el transcriptoma de *T. cruzi* en las diferentes etapas de su ciclo de vida se ha evaluado y comparado, mostrando asociaciones funcionales entre los genes con patrones similares de expresión entre las fases del parásito encontrando LITc, un elemento que se transcribe activamente tanto en amastigotes como en tripomastigotes y epimastigotes, con niveles de transcripción elevados (Bringaud et al., 2006).

En el análisis transcriptómico de este organismo, se han detectado 30 fosfatasa de proteínas y 128 quinasas, que son reguladas a nivel transcripcional, importante para la interacción hospedador-parásito y para conocer los mecanismos moleculares de defensa e infección. La regulación de la transcripción proporciona a *T. cruzi*, la capacidad para cambiar rápidamente entre entornos diferentes a nivel intra y extracelular (Minning et al., 2009; Michaeli, 2011; Shigihara et al., 2008).

En el año 2005 se publicó el proteoma de las cuatro etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*, identificando 2.784 proteínas (Atwood et al., 2005). *T. cruzi* tiene un gran número de proteínas de superficie específicas; una de ellas es mucina (*Mucin-Associated Surface Proteins*), se asocia al estrés celular y al proceso de invasión; además constituye una extensa familia génica que representa aproximadamente el 6% del genoma del parásito (De Pablos et al., 2011). La metalo-proteinasa GP63 se asocia a la virulencia y a la infección de la célula huésped (El-Sayed et al., 2005). Las glicoproteínas gp82 y gp90 están implicadas en la invasión celular y en la diferenciación morfológica de las formas de epimastigote a tripomastigote metacíclico, adquiriendo la infectividad y virulencia (Cordero et al., 2008; de Godoy et al., 2012).

### 1.1.1.3 Ciclo biológico

Para poder desarrollarse, *T. cruzi* necesita de dos hospedadores: uno invertebrado que actúa como vector de la enfermedad y que son insectos hematófagos y uno vertebrado definitivo, que puede ser el hombre u otras especies de mamíferos que también actúan como reservorios de la enfermedad. Cerca de 100 especies pueden servir como vectores de la enfermedad, los cuales se encuentran principalmente en áreas rurales en países de Sur y Centro América y en algunas regiones dentro de Estados Unidos (Diaz, 2008). En la figura 1.1 se muestra el ciclo biológico de *T. cruzi*.

En la sangre de un hospedador definitivo infectado circulan los tripomastigotes de *T. cruzi*, los cuales son ingeridos por el vector. La mayoría de los tripomastigotes son lisados en el estómago del insecto y sólo una pequeña parte de ellos sobreviven (Castro et al., 2007). En pocos días, los tripomastigotes sobrevivientes se desarrollan en

Organismo	NCBI ID	Fuente	Versión	Tamaño (Mbp)	Total de genes
<i>T. brucei</i> gambiense DAL972	679716	GeneDB	2013-01-16	22,15	10.000
<i>T. brucei</i> Lister strain 427	-	GeneDB	2010-10-20	26,75	9.302
<i>T. brucei</i> TREU927	185431	GeneDB	2013-08-28	35,83	12.094
<i>T. congolense</i> IL3000	1068625	GeneDB	2013-01-16	41,37	13.358
<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	-	GeneDB	2014-09-16	32,53	10.597
<i>T. cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like	-	GeneDB	2014-09-16	32,53	11.106
<i>T. cruzi</i> Dm28c	1416333	GenBank	2013-11-13	27,35	11.398
<i>T. cruzi</i> JR cl. 4	914063	GenBank	2013-01-17	41,48	-
<i>T. cruzi</i> marinkellei strain B7	-	Franzen	1.0	38,65	10.282
<i>T. cruzi</i> strain CL Brener	353153	GeneDB	2014-09-16	36,03	3.397
<i>T. cruzi</i> strain Esmeraldo	366581	GenBank	2013-01-17	38,08	-
<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	-	GenBank	2012-10-02	38,59	10.947
<i>T. cruzi</i> Tula cl2	1206070	GenBank	2013-06-26	83,51	-
<i>T. evansi</i> strain STIB 805	-	Schnauffer	2014-06-03	25,43	10.174
<i>T. grayi</i> ANR4	-	FieldLab	2014-03-21	20,95	10.686
<i>T. rangeli</i> SC58	429131	GenBank	2013-10-30	14,02	7.479
<i>T. vivax</i> Y486	1055687	GeneDB	2013-01-16	47,50	12.581

Tabla 1.1: Características del genoma de las principales especies de *Trypanosoma*.  
(Adaptado de <http://tritrypdb.org/tritrypdb/showApplication.do>)

su intestino medio produciendo unas formas parasitarias denominadas epimastigotes, los cuales se multiplican y se adhieren a las membranas de las microvellosidades del intestino medio. La adhesión es dependiente de glicoconjugados del parásito expuestos en la superficie, así como de proteínas encontradas en las membranas de las microvellosidades. Aquí se empieza a desencadenar el proceso de transformación de epimastigotes no-infectivos a tripomastigotes altamente infectivos, comúnmente conocidos como tripomastigotes metacíclicos (Alves et al., 2007; Nogueira et al., 2007).

En el intestino posterior y en el recto del vector, muchos epimastigotes se despegan de la superficie del intestino y se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son liberados a través de las heces y que constituyen la fase infectiva para los hospedadores definitivos, incluido el ser humano (García et al., 2007).

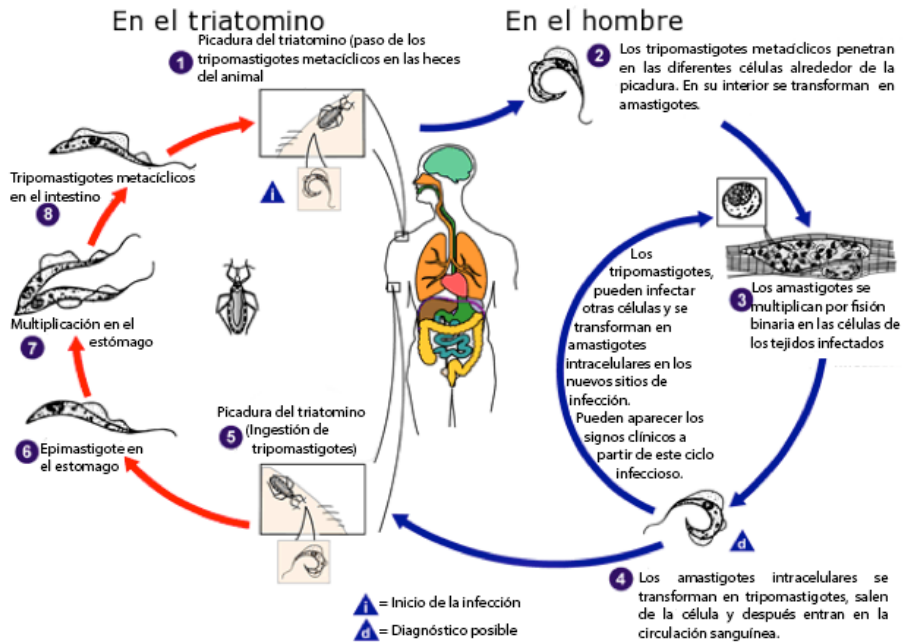


Figura 1.1: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.  
 (Tomado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)

La infección del ser humano ocurre por la inoculación directa de los tripomastigotes metacíclicos a través de la conjuntiva ocular o a través de lesiones en la piel tras alimentarse el vector de la sangre del hospedador mamífero. Los seres humanos también se pueden infectar a través de transfusiones de sangre, trasplante de órganos, mediante la ingesta de alimentos o por transmisión congénita de madres gestantes a sus hijos. Una vez que el ser humano adquiere la infección, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células en el sitio de inoculación, como por ejemplo, fibroblastos, macrófagos y células epiteliales a través de una compleja red de interacciones moleculares entre el parásito y las células del hospedador definitivo, dando inicio al ciclo intracelular de *T. cruzi* (de Souza et al., 2010), produciéndose: (i) formación de la vacuola parasitófora, (ii) transformación de los tripomastigotes a amastigotes y (iii) lisis de la membrana de la vacuola parasitófora por enzimas secretadas por el parásito y liberación de amastigotes.

Además, se distinguen tres pasos fundamentales en la etapa inicial del ciclo intracelular de *T. cruzi* en el hospedador vertebrado: adhesión y reconocimiento, señalización e invasión. En el paso de adhesión ocurre el reconocimiento de moléculas que están presentes en la superficie del parásito (Figura 1.2). También se cree que las proteínas secretadas por el parásito desempeñan un importante papel en este proceso.

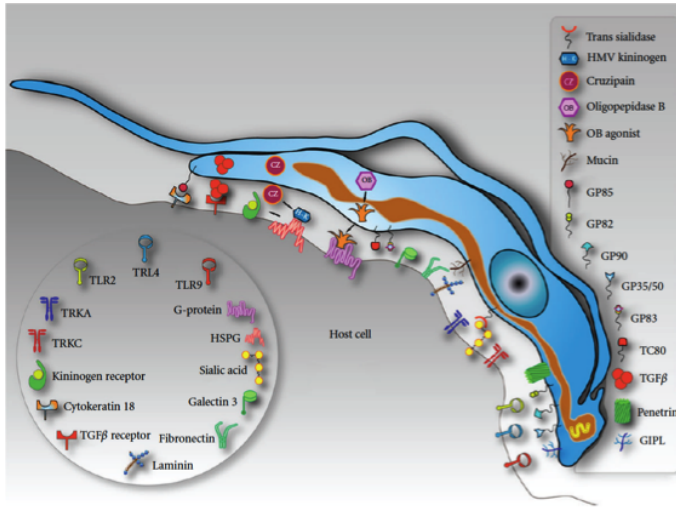


Figura 1.2: Moléculas de *Trypanosoma cruzi* implicadas en procesos de reconocimiento e infección a células del hospedador. (Tomado de De Souza et al., 2010)

En el paso de reconocimiento se han identificado diversas glicoproteínas que se expresan diferencialmente en los distintos estadios del parásito y sus ligandos se encuentran en diferentes células del hospedador vertebrado como, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. Se ha descrito la participación de la glicoproteína gp90, distintas mucinas y el complejo denominado Tc85 que está formado por glicoproteínas de 82 y 85 kDa, y transialidasas importantes en el proceso de reconocimiento uniéndose a diferentes receptores ya sea de la superficie celular, así como a componentes extracelulares como fibronectina o laminina. También se ha descrito la participación de las glicoproteínas gp82 y gp35/50 en el proceso de invasión, las cuales están expresadas mayoritariamente en el estadio de tripomastigote metacíclico (Giordano et al., 1999; de Souza et al., 2010).

Las transialidasas cumplen la función de transferir moléculas de ácido siálico del hospedador vertebrado a los glicoconjugados de *T. cruzi*, los cuales no sintetizan esta molécula. Estas proteínas son expresadas por los tripomastigotes y están unidas a la membrana plasmática del parásito mediante unión a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y se caracterizan por tener una región catalítica en el extremo amino terminal y una región denominada antígeno de excreción en fase aguda (SAPA) que son repeticiones de 12 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. Diferentes estudios han descrito la importancia de las glicoproteínas sialiladas de *T. cruzi* en la infección a células del hospedador vertebrado (Pereira et al., 1996). Además, este proceso lo hace resistente frente a la acción del complemento (Tomlinson et al., 1994).

En cuanto a las moléculas del hospedador vertebrado, diferentes estudios han mostrado la participación de citocalasina B, concanavalina A ó fitohemaglutinina en los procesos de invasión. Los receptores tipo Toll 2 y 9 (TLR-2, TLR-9) también son reconocidos por *T. cruzi* (Schmitz et al., 2009). Moléculas del hospedador vertebrado similares a lectinas también participan en la unión e invasión del parásito. Se han identificado residuos de galactosa, manosa y ácido siálico en regiones de la membrana plasmática donde ocurre la interacción del parásito con las células del hospedador vertebrado.

Una vez que el parásito se ha unido y es reconocido por la superficie celular del hospedador vertebrado, se llevan a cabo diferentes procesos de señalización celular que termina con la invasión del parásito a la célula del hospedador y la posterior formación de la vacuola parasitófora. Uno de los mecanismos involucrados en la invasión es la fagocitosis, donde hay activación de tirosina quinasas y participación de filamentos de actina (Vieira et al., 2002).

En el interior de la vacuola parasitófora los tripomastigotes liberan transialidasa y neuraminidasa, eliminando residuos de ácido siálico de la membrana de la vacuola parasitófora y haciéndola sensible a la acción de una molécula denominada Tc-Tox, que es un péptido que tiene homología con el factor 9 del complemento humano. Esta molécula, destruye la vacuola parasitófora mediante la formación de poros en su membrana. Al mismo tiempo, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, los cuales pueden infectar otras células del hospedador vertebrado, ya sean fagocíticas o no-fagocíticas (Andreoli et al., 2006; Mortara et al., 2008).

#### 1.1.1.4 Epidemiología

La epidemiología de la enfermedad de Chagas adopta varios patrones que dependen de la forma de transmisión y del estado inmunocompetente del individuo infectado. La forma más frecuente de transmisión de la enfermedad de Chagas a nivel mundial es la transmisión vectorial. Los vectores implicados en la transmisión de *T. cruzi* se incluyen en la familia *Reduvidae*, subfamilia *Triatominae*, siendo las principales especies responsables de la transmisión: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Pastronylus megistus*. El ecosistema característico de estos vectores incluye zonas de elevada humedad, con una temperatura comprendida entre 24 y 30 °C, siendo el hábitat característico las grietas, orificios y tejas de paja o adobe de zona rurales (Gutierrez Zufiaurre et al., 2012).

La enfermedad de Chagas es endémica en el continente americano, principalmente en países de Sudamérica, América Central y algunas partes del Norte de América (México y el sur de los Estados Unidos). En zonas rurales donde las condiciones sanitarias son deficientes, se



favorece la presencia de los vectores y la forma aguda de la enfermedad ocurre principalmente en niños menores de 12 años (Rassi et al., 2012). Tradicionalmente, la enfermedad de Chagas estaba confinada a zonas rurales de países de Sudamérica, pero debido a la migración de las poblaciones, la forma crónica se ha ido expandiendo hacia las ciudades dentro y fuera de Sudamérica, convirtiéndose en un importante problema de salud pública. Se estima que en América Latina entre 7 a 10 millones de personas padecen la forma crónica de la enfermedad y entre 10.000 - 14.000 personas mueren cada año por esta enfermedad (Kirchhoff, 2011; Rassi et al., 2012). Sin embargo, durante los últimos años se han llevado a cabo diversas iniciativas para el control en la transmisión de *T. cruzi*, entre las que se encuentran: programas para el control y erradicación del vector transmisor, análisis clínico de las unidades de sangre utilizadas en transfusiones y educación de la población en riesgo.

Estas iniciativas, en conjunto, han logrado una disminución en la carga de la enfermedad. Así, Uruguay y Chile fueron declaradas libre del vector transmisor (*T. infestans*) en la década de 1990 (Moncayo, 2003).

A pesar de que la prevalencia global de la enfermedad de Chagas en países de Sudamérica no es extremadamente alta (Bolivia 6,8%; Argentina 4,1%; Honduras 3,1%; Paraguay 2,5%), más del 60% de la población infectada con *T. cruzi* viven en Brasil y México (Rassi et al., 2010, 2012).

La alta prevalencia en Estados Unidos se debe, casi exclusivamente, a la presencia de población inmigrante de zonas endémicas. Se estima que cerca de 23 millones de personas inmigrantes viven en Estados Unidos, de las cuales 17 millones son mexicanos y esta es la razón por la que ocupa el séptimo puesto a nivel mundial.

En Europa, el número estimado de personas con enfermedad de Chagas oscila entre 68.000 y 122.000 (Tabla 1.2) (Basile et al., 2011). En España se ha multiplicado en los últimos años por la inmigración procedente de Latinoamérica, siendo el país europeo con mayor número de casos. Se estima que un 4,2% del total de latinoamericanos que viven en Europa padecen la enfermedad de Chagas (Requena-Méndez et al., 2015; Navarro et al., 2012).

Para el control de la enfermedad debe tenerse en cuenta la detección de casos importados y la detección de casos nuevos que puedan originarse como consecuencia de transfusiones de sangre, donaciones de órganos y tejidos o transmisión congénita (Lucas & Barba, 2009). Según la normativa del Ministerio de Salud de España, los donantes considerados en situación de riesgo incluyen personas nacidas en área endémica, nacidos a partir de la madre que proceda de una zona endémica, haber sido residente o haber recibido una transfusión de sangre en un país endémico (Angheben et al., 2015). Se deben adoptar medidas para mejorar la seguridad de las

donaciones de sangre, debido a que un 20% de las infecciones se da por transfusiones sanguíneas. Además, la supervivencia del parásito en sangre es entre 2 semanas y 3 meses. En España, las comunidades autónomas de Cataluña, Valencia, Galicia y Andalucía han puesto en marcha protocolos de cribado y diagnóstico en las mujeres embarazadas procedentes de países con alta incidencia de la enfermedad de Chagas, como medida esencial para la prevención de la transmisión de madre a hijo, ya que los datos de prevalencia para casos de la enfermedad en gestantes oscilan entre 3,4 – 4,7% y para casos de enfermedad congénita entre 0 – 0,73% (Requena-Méndez et al., 2014).

País	Población en riesgo	Población infectada estimada	Prevalencia
Italia	297.074	3.042 - 3.403	1,0 – 1,1%
España	1.617.762	53.481 – 54.929	3,3 – 3,4%
Suiza	34.654	509 - 641	1,5 – 1,8%
Bélgica	12.080	150 - 204	1,2 - 1,7%

Tabla 1.2: Prevalencia de la enfermedad de Chagas en Europa.  
(Adaptado de Muro A et al., 2010)

### 1.1.1.5 Patogenia

A continuación, se describen los mecanismos involucrados en la patogenia de la enfermedad de Chagas; de agresión, de defensa y de evasión.

**1.1.1.5.1 Mecanismos de agresión** Tras la picadura, principalmente en zonas faciales de los niños (hospedador), el rascado permite la entrada de los tripomastigotes metacíclicos que están en las heces de los vectores y determina la aparición de los síntomas tras la inoculación, dando lugar a las manifestaciones clínicas en un bajo número de sujetos infectados, dependiendo de factores del parásito o factores del hospedador. La entrada de los tripomastigotes desencadena una respuesta inflamatoria con reclutamiento de macrófagos y penetración intracelular. Las células parasitadas inicialmente son las del sistema mononuclear fagocítico, células dendríticas, células musculares y epiteliales, siendo los receptores tipo TLR 2 y 9 (toll like receptor) los mejor caracterizados (Tarleton, 2007).

Tras el proceso de invasión celular, el parásito sale desde la vacuola parasitófora hasta el citoplasma, donde se replica en forma de amastigote. Aquí libera moléculas como proteínas de superficie ancladas a residuos GPI o transalidasas, que en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I son presentadas a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Gutierrez Zufiaurre et al., 2012). Una vez que los parásitos se

diseminan por el sistema linfático y el torrente sanguíneo, estos se concentran principalmente en músculos (incluyendo el miocardio). Una segunda etapa invasiva afecta el sistema mononuclear fagocítico, las células de los plexos nerviosos y las células musculares. Superada la fase aguda se desarrolla una fase indeterminada de la enfermedad, donde no existen manifestaciones clínicas, solamente mediante técnicas serológicas y/o moleculares se reconoce la infección. Un 60% de sujetos inmunocompetentes infectados por *T. cruzi* permanecerán de forma indefinida en esta fase, mientras que el resto de sujetos desarrollará la fase crónica de la enfermedad.

Se han postulado cuatro teorías (Marin-Neto et al., 2007) asociada a los daños ocasionados en esta fase de la enfermedad: *a)* daño directo provocado por el parásito o por el proceso inflamatorio desencadenado a nivel local; *b)* disfunción neurogénica producida por el daño del parásito sobre las células del sistema parasimpático que inerva los órganos afectados, ocasionando una hiperestimulación del sistema simpático; *c)* alteraciones en la microcirculación y *d)* mecanismos inmunológicos de origen autoinmune provocados por la baja pero persistente infección sistémica, basada en la observación de respuestas en células mononucleares de pacientes chagásicos a antígenos autólogos, en el mimetismo molecular que existe entre componentes del parásito y del hospedador y en la detección de anticuerpos autorreactivos.

**1.1.1.5.2 Mecanismos de defensa** Los antígenos de los tripomastigotes en la fase aguda de la infección (Dutra et al., 2005) y una vez reconocidos por TLR macrofágicos (TLR2 y TLR9), inducen la producción de interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). El parásito también induce la estimulación macrofágica de quimiocina receptora de tipo 5 (CCR5). La producción de IL-12, TNF- $\alpha$  y CCR5 facilita la migración y activación de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, que intervienen en el control de la infección y son capaces de producir interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Los macrófagos activados por TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  producen óxido nítrico, implicado en la eliminación del parásito. Los anticuerpos y linfocitos CD8<sup>+</sup> también intervienen en el control de la infección. Es necesario elementos de control que regulen la respuesta inmunológica a la infección; tanto la producción de IL-4 e IL-10, que inhiben las respuestas de la células T-ayudadoras (Th1), como la producción de IFN- $\gamma$ . Si la respuesta es adecuada se elimina la infección, pero si es excesiva puede desencadenar cuadros graves en la fase crónica de la enfermedad.

Los mecanismos de defensa en fase crónica han sido estudiados en pacientes chagásicos con el fin de determinar los mecanismos responsables de lesiones graves como la cardiomiopatía chagásica (Dutra et al., 2005). El rol de los anticuerpos se ha puesto de manifiesto de diferentes formas:

anticuerpos protectores que producen la lisis de tripomastigotes de *T. cruzi*; anticuerpos contra estructuras del hospedador en las alteraciones cardíacas y anticuerpos inductores de inmunidad celular, estimulando células CD5<sup>+</sup>B. También los linfocitos T participan en la inmunopatología de esta enfermedad. La información obtenida de los marcadores inmunológicos celulares para diferenciar lesiones graves no es concluyente, la alta expresión de CCR5, la elevada detección de IL-10 y la expresión conjunta de Vβ3.1 y Vβ5 se atribuye a lesiones leves; y la baja expresión del Co-receptor de entrada de tipo 4 (CXCR4), la elevada detección de TNF-α y la expresión por CD8<sup>+</sup> de Vβ3.1 se asocia con lesiones graves.

**1.1.1.5.3 Mecanismos de evasión** El parásito *T. cruzi* evade la respuesta inmune por varios mecanismos: (i) gp160, una molécula estructural de los tripomastigotes, reguladora del sistema del complemento, es capaz de unirse al fragmento C3b e inhibir la formación y estabilidad de la convertasa de la vía alterna (Pérez-Arellano et al., 2001); (ii) AgC10 una mucina de *T. cruzi* es capaz de inhibir TNFα, IL-10 y ciclooxigenasa-2 en macrófagos, delimitando las funciones derivadas de su activación (Alcaide & Fresno, 2004) y (iii) fosfatidilserina presente en tripomastigotes de *T. cruzi* es responsable de la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa inducible utilizando factor de crecimiento tumoral beta (TGFβ), evitando que el parásito muera mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico (Damatta et al., 2007).

### 1.1.1.6 Manifestaciones clínicas

En la fase aguda de la enfermedad, la mayoría de los individuos, independiente de la forma de transmisión de la enfermedad de Chagas, permanecen asintomáticos. Sin embargo, pueden aparecer síntomas entre 8 y 10 días después de la infección vectorial o entre 20 y 40 días si la infección ocurre por transfusión de sangre infectada con *T. cruzi*. Pueden aparecer tres signos locales característicos: (i) chagoma o chancro de inoculación; (ii) edema palpebral unilateral o signo de Romana y; (iii) linfadenopatía regional (Teixeira et al., 2011; Gutierrez Zufiaurre et al., 2012).

La fase crónica de la enfermedad ocurre entre 2 a 3 meses después de la infección inicial, cuando las manifestaciones clínicas (si las hubo) de la fase aguda han desaparecido. Esta forma de la enfermedad sólo se reconoce mediante técnicas serológicas o moleculares. Se estima que entre 60 a 70% de los pacientes infectados con *T. cruzi* se mantendrán de forma indefinida con esta forma de la infección y cerca de un 30 a 40% desarrollarán manifestaciones cardiovasculares y aproximadamente un 10% problemas digestivos. Las lesiones histopatológicas básicas de la miocardiopatía

chagásica (Figura 1.3) son las siguientes: (i) alteraciones del sistema de excitación; (ii) dilatación de las cavidades derechas; (iii) presencia de trombos murales y; (iv) aneurisma apical del ventrículo izquierdo. Las manifestaciones clínicas derivan de: las arritmias (palpitaciones, síncope, muerte súbita), de la insuficiencia cardíaca izquierda (disnea de esfuerzo, ortopnea, disnea paroxística nocturna) y/o derecha (hepatalgia) y de la presencia de trombos que pueden ocasionar embolias pulmonares o sistémicas (accidentes cerebrovasculares).

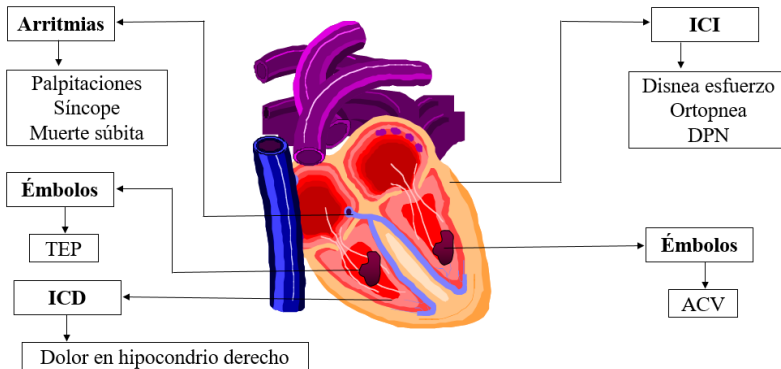


Figura 1.3: Lesiones histopatológicas básicas de la miocardiopatía chagásica.

En el paciente con infección por *T. cruzi* (sintomático o asintomático) se recomienda de forma sistemática la realización de un electrocardiograma (ECG) y un ecocardiograma transtorácico. La detección de anomalías determinará la realización de estudios específicos (Holter, estudios electrofisiológicos específicos, prueba de esfuerzo, cateterismo) (Teixeira et al., 2011; Gutierrez Zufiaurre et al., 2012). Las principales alteraciones electrocardiográficas y ecocardiográficas de la miocardiopatía chagásica se señalan en la tabla 1.3.

Las manifestaciones clínicas de la forma digestiva crónica dependen principalmente de la afectación del esófago (disfagia progresiva, dolor retroesternal, regurgitaciones asociadas o no a neumonía por aspiración), colon (estreñimiento, dolor abdominal, presencia de fecalomas) y de la hipertrofia de las glándulas salivales.

Es posible que se reactive la infección por *T. cruzi* en pacientes inmunodeprimidos. Las manifestaciones clínicas dependen del tipo de inmunosupresión adquirida. En pacientes trasplantados es frecuente la aparición de linfadenopatías y miocarditis, siendo rara la afectación del sistema nervioso central. Sin embargo, pacientes coinfectados con VIH desarrollan cuadros clínicos compatibles con meningoencefalitis y encefalitis multifocal, siendo rara la presencia de miocarditis (Almeida et al., 2011).

Frecuencia	Electrocardiograma	Ecocardiograma
Muy frecuentes	BCRDHH + HBAS Extrasístolia ventricular	Alteraciones segmentarias de pared postero-inferior de ventrículo izquierdo Aneurismas apicales del ventrículo izquierdo con trombos
Frecuentes	Alteración de repolarización ventricular Zonas eléctricas inactivas (ondas Q) Bloque A-V	Hipocinesia/acinesia de pared postero-inferior Afectación de porción basal del septo anterior Aneurismas subaórticos
Infrecuentes	BCRIHH Disfunción nódulo sinusal Fibrilación auricular Otras taquiarritmias supraventriculares	Miocardiopatía dilatada Dilatación y alteración funcional del ventrículo izquierdo

Tabla 1.3: Alteraciones electrocardiográficas y ecocardiográficas de la enfermedad de Chagas. (Adaptado de Gutiérrez Zufiaurre et al., 2012)

### 1.1.1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda se basa en la detección del parásito, mediante examen microscópico en sangre periférica o en lesiones como el chancro para detectar los tripomastigotes. En determinados centros especializados se realiza, aunque cada vez con menos frecuencia, el xenodiagnóstico, que consiste en colocar chinches libres de parásitos en el antebrazo del paciente durante 30 minutos, examinando posteriormente al vector para observar si está infectado. Los parásitos también pueden ser observados en extensiones de sangre mediante tinción con Giemsa (Rassi et al., 2012).

En la fase crónica de la enfermedad, donde la parasitemia es muy baja y la observación del parásito es casi imposible, se utilizan métodos serológicos para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* del tipo IgG e IgM mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunoensayo (ELISA). A pesar de que la técnica de ELISA presenta una elevada sensibilidad, tiene el inconveniente de que puede ser inespecífica, debido a la reactividad cruzada que existe con parásitos como *Leishmania* spp. (Gomes et al., 1999). Se recomienda el empleo de, al menos, dos pruebas serológicas para confirmar el resultado.

Los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presentan una elevada sensibilidad y especificidad y se utilizan mayoritariamente para confirmar un diagnóstico que por los métodos anteriormente descritos haya resultado no concluyente y de resultados variables en fase crónica (Piron et al., 2007). Este método es muy utilizado para monitorear la carga parasitaria después del tratamiento. Tiene el inconveniente de la utilización sistemática en zonas de alta endemividad (Rassi et al., 2012). El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en una madre gestante se resume en la figura 1.4.

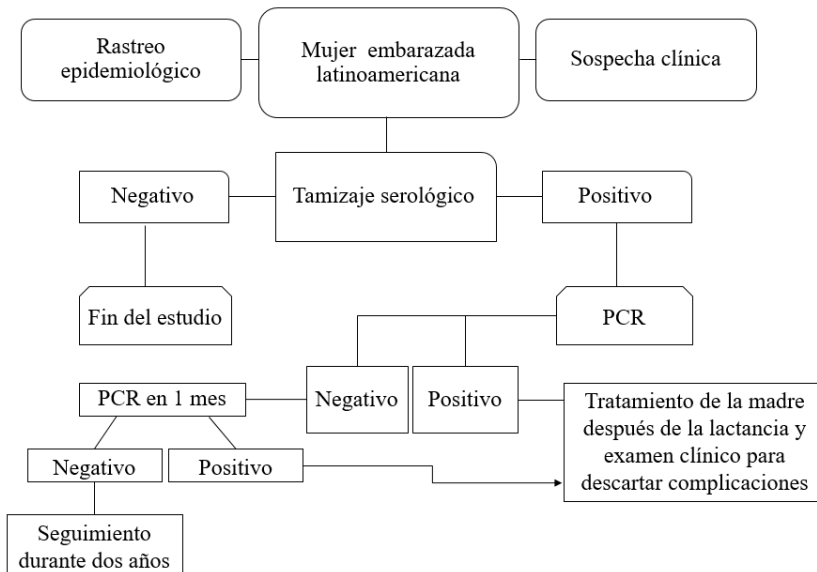


Figura 1.4: Manejo de la enfermedad de Chagas en mujer embarazada.

### 1.1.1.8 Tratamiento

El objetivo del tratamiento de la enfermedad de Chagas en la fase aguda es eliminar completamente el parásito, para prevenir el progreso y desarrollo de la forma crónica. En pacientes con enfermedad crónica chagásica no se sabe exactamente si el parásito debe ser eliminado completamente o si una reducción de la parasitemia sería suficiente para prevenir o retrasar el progreso de la enfermedad (Rassi et al., 2009). Actualmente el benznidazol y el nifurtimox son los fármacos de elección y alternativo para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En la tabla 1.4 se muestra la pauta de administración de estos fármacos, así como sus principales contraindicaciones y efectos secundarios.

El tratamiento antichagásico en la fase aguda elimina la parasitemia, reduce la gravedad y duración de los síntomas y reduce la mortalidad. La tasa de curación se estima en más del 81% y es obligatorio para todos los pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda, independiente de la vía de transmisión. Pacientes con enfermedad cardíaca o síntomas gastrointestinales deben acudir a un médico especialista para un tratamiento personalizado (Rassi et al., 2012).

El benznidazol [*N*-bencil-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida], actúa uniéndose de forma covalente a los intermediarios de la nitrorreducción con los componentes del parásito, reaccionando con biomoléculas y ocasionando peroxidación de lípidos, daño al ADN y a las membranas celulares (Bermudez et al., 2016). La eficacia tripanocida varía según la región

Fármaco	Indicación	Dosis	Contraindicaciones	Efectos secundarios
Benznidazol	Elección	Adultos: 5 mg/kg/día cada 12h durante 60 días	Insuficiencia renal Mujeres gestantes	Primera semana: Alteraciones digestivas Reacciones de hipersensibilidad
		No más de 300 mg/día		Entre 2 - 4 semanas: Agranulocitosis Trombopenia
Nifurtimox	Alternativo	Adultos:8-10 mg/kg/día cada 6h durante 90 días	Mujeres gestantes	Síntomas constitucionales Alteraciones psíquicas Manifestaciones digestivas
		Niños (1 - 10 años): 15 - 20 mg/kg/día cada 6h durante 90 días		
		Niños (11 - 16 años): 15 - 20 mg/kg/día cada 6h durante 90 días		

Tabla 1.4: Tratamiento de la enfermedad de Chagas.  
(Adaptado de Gutiérrez Zufiaurre et al., 2012)

geográfica de procedencia del paciente, probablemente debido a diferencias en la susceptibilidad intrínseca de diferentes cepas del *T. cruzi*.

El nifurtimox [3-metil-4[(5-nitrofur-2-il-metilenimina)]tetrahydro-2H-1,4-tiazin-1,1-dióxido], tiene la capacidad de inducir una reducción y formar radicales de alta reactividad como el superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. *T. cruzi* parece ser deficiente en defensas enzimáticas contra las especies reactivas de oxígeno, lo que lo hace susceptible al estrés oxidativo, provocando en el parásito lisis de la membrana, inactivación enzimática y daño del ADN (Bermudez et al., 2016).

En los últimos años han aparecido numerosas investigaciones en busca de un tratamiento efectivo contra *T. cruzi* y con baja toxicidad. Así, se han ensayado antifúngicos como ketoconazol y clotrimazol, que no indujeron toxicidad en células de mamífero manteniendo su actividad tripanocida (Iniguez et al., 2013; Martínez et al., 2012). También se han hecho estudios con bisfosfonatos utilizados para el tratamiento de enfermedades de los huesos, resultando ser activos contra amastigotes de *T. cruzi*. La desventaja, es la pobre biodisponibilidad oral (Demoro et al., 2010). Además, las tiosemicarbazonas representan compuestos con amplio rango de aplicaciones farmacológicas, incluyendo actividad contra tripomastigotes de *T. cruzi*. También están las fenotiazinas, fármacos tricíclicos empleados como antidepresivos, que muestran actividad tripanocida inhibiendo la tripanotión reductasa (Lo Presti et al., 2015).



Los efectos tóxicos de benznidazol y nifurtimox son consecuencias de los metabolitos generados durante la nitrorreducción, producidos por una reacción enzimática en el grupo nitro generando radicales como hidronitróxido ( $\text{RNHO}$ ) y nitroanión ( $\text{RNO}_2^-$ ) para benznidazol y nifurtimox, respectivamente (Castro et al., 2006; Teixeira et al., 2006). Ambos fármacos generan efectos adversos, lo cual es un gran inconveniente ya que puede ocasionar la interrupción del tratamiento.

Una de las principales contraindicaciones del benznidazol es la insuficiencia renal. Además, no puede administrarse a mujeres gestantes. Los efectos secundarios se presentan desde la primera semana de administración; como alteraciones digestivas y reacciones de hipersensibilidad (mialgias, artralgias, adenopatías, exantema, síndrome de Stevens-Johnson). Entre la segunda y cuarta semana de administración del fármaco se puede producir agranulocitosis y trombopenia, siendo la polineuropatía el efecto secundario más frecuente a partir de la cuarta semana del tratamiento. Nifurtimox se asocia frecuentemente a efectos secundarios inespecíficos de tipo constitucional (anorexia, pérdida de peso, irritabilidad, alteraciones del sueño), alteraciones psíquicas y manifestaciones digestivas (náuseas o vómitos de forma más frecuente y diarrea o cólicos abdominales de forma menos frecuente) (Castro et al., 2006); algunos pacientes también pueden desarrollar erupciones en la piel. Actualmente no existe un tratamiento eficaz para pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas a las ya existentes, constituye un objetivo prioritario.

Para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas, las personas que vivan o procedan de áreas endémicas deben adoptar medidas preventivas encaminadas a la evaluación de la sangre transfundida, detección de los donantes de órganos, utilización de insecticidas en los domicilios con el fin de eliminar los vectores y construcción de edificios seguros para minimizar el contacto. Los viajeros que vayan a zonas endémicas de Chagas deben conocer el riesgo de transmisión en la región concreta, evitar dormir en casas con grietas y agujeros y utilizar siempre mosquiteras. Finalmente, deben conocer la sintomatología propia de la enfermedad, iniciar rápidamente el tratamiento y si la enfermedad ha aparecido, es importante establecer el seguimiento de la misma de acuerdo a la clasificación clínica (Tabla 1.5), dependiendo del período establecido (Gutierrez Zufiaurre et al., 2012).

### 1.1.2 Estrongiloidosis

La estrongiloidosis es una enfermedad parasitaria causada por nematodos del género *Strongyloides*. Aunque hay más de 40 especies que infectan a aves, reptiles, anfibios, ganado y otros primates, *Strongyloides stercoralis* es

Clasificación clínica	Duración del seguimiento
Aguda o congénita	3 – 5 años
Crónica reciente	5 – 10 años
Crónica tardía	15 – 20 años

Tabla 1.5: Seguimiento de la enfermedad de Chagas.  
(Adaptado de Muro A et al., 2010)

la especie principal que causa enfermedad en el hombre. También se han descrito infecciones por *Strongyloides fuelleborni* en África y *Strongyloides fuelleborni kelly* en Papúa Nueva Guinea (Yepes Victoria et al., 2012).

En 1876, el médico Louis Normand del Hospital de St. Mandrier en Toulon, Francia, fue el primero en describir las larvas de *S. stercoralis*, a partir de las heces de soldados franceses que volvían de la antigua región de Indochina. Describe también las manifestaciones gastrointestinales de esta infección parasitaria como dolor epigástrico y diarrea acuosa (Genta RM et al., 1995; Puthiyakunnon et al., 2014).

A partir de noviembre de 2004, por recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, se sugirió medidas para el control de *S. stercoralis* en áreas donde la infección es endémica, debido a la capacidad de autoinfección, permaneciendo así de forma indefinida (World Health Organization, 2005).

### 1.1.2.1 Agente etiológico

*S. stercoralis* es un nematodo que pertenece al reino *Animalia*, *phylum Nematoda*, clase *Secernentea*, orden *Rhabditida*, familia *Strongyloididae*, género *Strongyloides* (Viney & Lok, 2015). Como se ha mencionado anteriormente *S. stercoralis* y *S. fuelleborni* son las principales especies que afectan al ser humano, aunque se han descrito casos aislados por *Strongyloides canis*, *Strongyloides cebus*, *Strongyloides myopotami*, *Strongyloides planiceps* y *Strongyloides simiae* (Viney & Lok, 2007). *Strongyloides* presenta varias fases durante su ciclo biológico: hembras partenogenéticas intestinales, larvas rhabditiformes, larvas filariformes y formas adultas hembras y machos de vida libre.

Las hembras partenogenéticas miden entre 2,0 a 2,5 mm x 30 a 40  $\mu\text{m}$ , son transparentes, poseen una cutícula delgada, tienen esófago cilíndrico ubicado en el tercio anterior del cuerpo que se continúa con el intestino y termina en el orificio anal, cercano al extremo posterior del cuerpo (Mahmoud, 1996). Se alojan en túneles de la submucosa duodenal y en la primera porción del yeyuno. En cuanto al sistema reproductivo, el útero contiene un pequeño número de huevos alineados en una sola fila y ocupan

la mayor parte del cuerpo del parásito. Los huevos tienen forma elíptica, de pared fina y con tamaño de 40 - 70  $\mu\text{m}$ . Son expulsados diariamente y cuando eclosionan dan lugar a la forma larvaria rhabditiforme.

La larva rhabditiforme (L1) es móvil y mide aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  de longitud por 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. No atraviesa, ni invade la mucosa o la piel sana, encontrándose en las heces o en el fluido intestinal. Anatómicamente tiene un extremo anterior romo, cavidad bucal corta que llega al esófago y continúa con el intestino para desembocar en el ano en el extremo posterior (Hammond & Robinson, 1994; Costa-Cruz et al., 2000). Cuando las larvas rhabditiformes salen a la luz intestinal, el contenido digestivo las arrastra, transformándose tras dos mudas en larvas filariformes (L3), fase infectiva. Estas larvas salen al medio exterior donde pueden permanecer vivas en el suelo durante varias semanas. La larva filariforme (L3) es muy móvil y mide entre 500 a 700  $\mu\text{m}$  de longitud y 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el extremo anterior posee un estilete y en el extremo posterior termina en una muesca. Puede o no tener membrana envolvente y no posee cavidad bucal. El esófago es largo y se prolonga hasta la parte media del cuerpo (Mahmoud, 1996; Viney & Lok, 2007).

En la fase de adultos de vida libre se identifican machos y hembras. Las hembras miden entre 1 - 1,5 mm x 50 - 75  $\mu\text{m}$  y depositan sus huevos en el medio ambiente. Los machos son más pequeños, miden entre 0,8 - 1 mm x 40 - 50  $\mu\text{m}$ . En el extremo posterior curvo tienen dos espículas copulatrices, el sistema reproductivo es un simple tubo recto y su período de vida es corto, lo que limita la fecundidad.

Las diferentes fases del ciclo biológico de *S. venezuelensis* se muestran en la figura 1.5.

### 1.1.2.2 *Strongyloides*: Genoma, transcriptoma y proteoma

La comprensión de las diferencias moleculares y genéticas de los parásitos de vida libre es de interés biológico para la identificación de nuevas dianas y métodos para el control de nemátodos parásitos y las enfermedades que causan.

Recientemente, se ha reportado la secuencia del genoma *S. ratti* que está compuesto de 43 Mb que revela una organización y estructura similar a las de otros nemátodos de los que se dispone de datos de secuencias mitocondriales de 42 a 60 Mb, tales como *S. stercoralis*, *S. venezuelensis*, *Strongyloides papillosus*, *Parastrongyloides trichosuri* y *Rhabditophanes* sp. KR3021. *S. ratti* y *S. stercoralis* son las principales adaptaciones genómicas y moleculares al estilo de vida parasitaria, con altos contenidos de guanina-citosina (GC) del 21% y 22% respectivamente. Aunque sus tamaños



Figura 1.5: Fases del ciclo biológico de *Strongyloides venezuelensis*.  
 (A) Huevos embrionados (B) Larva L1, rabbitiforme (C) Larva 3, filariforme (D)  
 Parásito adulto, hembra partenogénica. (Tomado de Ruano A.L., 2008)

son más pequeños que otros genomas de nematodos, el contenido total de proteínas codificantes de cada genoma (18 - 22 Mb) es similar a las ocho especies analizadas (14 - 30 Mb) (Hunt et al., 2016).

El genoma mitocondrial de *S. stercoralis* es 13.758 Mb y contiene 36 genes, pero carece del gen *atp8*. Análisis de la estructura secundaria predicha para los 22 genes de ARN de transferencia (TRN) y para los dos genes de ARN ribosomal de *S. stercoralis* son similares a los de otros nematodos, revelando un número limitado de genes compartidos (*atp6-nad2* y *COX2-rrnL*), proporcionando una fuente de caracteres filogenéticamente informativos. El orden de los genes mitocondriales de las especies *Strongyloides* se acompaña de la divergencia de nucleótidos. Respecto al genoma de *S. stercoralis*, se ha encontrado que es muy organizado en comparación con los genomas de los nematodos de los grupos I - *Trichinella spiralis* y *Trichuris muris*, III - *Ascaris suum* y *Brugia malayi* y V - *Necator americanus* y *Caenorhabditis elegans* (Hu et al., 2003).

*Strongyloides* tiene los genes que codifican para las moléculas inmunomoduladoras (SCP/TAPS), que codifican un péptido señal y se expresan diferencialmente en las hembras parásitas (Cantacessi et al., 2009). *S. stercoralis* y *S. ratti* codifican dentro de sus genomas un 71% y 57% respectivamente de genes SCP/TAPS. La familia astacina de metalopeptidasas fue la más extensa con 184 a 387 copias en las especies de *Strongyloides-Parastrongyloides* comparado con *Rhabditophanes*. En el

genoma de *S. ratti* se encontró la presencia del 58% de genes relacionados con astacina mientras que para *S. stercoralis* se encontró el 62%, sugiriendo su asociación en la penetración de la mucosa del hospedador en el que viven las hembras parasitarias (Jing et al., 2010; Semenova & Rudenskaya, 2009).

El estudio de genes diferencialmente expresados como importantes marcadores para los procesos de parasitismo han sido estudiados mediante el análisis del transcriptoma de cuatro diferentes estadios de *S. venezuelensis* procedentes de Japón (Hasegawa, 1934), utilizando una plataforma de pirosecuenciación (Roche 454 GS FLX Titanium) (Nagayasu et al., 2013). Hasta ahora, los estudios de *S. stercoralis* se han limitado al análisis de ESTs en lugar de la secuencia del genoma completo. Un análisis basado en la expresión de microarrays entre larvas infecciosas y no infecciosas de *S. stercoralis*, encontraron diferencias en la expresión de genes de codificación de transcripción, proteínas de choque térmico y antígenos inmunorreactivos en el suero de personas infectadas con el parásito (Ramanathan et al., 2011).

El perfil de expresión génica demostró diferencias significativas en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo de *S. venezuelensis*. En la fase de huevo/L1, se encontraron genes relacionados con el componente estructural del cuerpo de los gusanos, tales como colágeno, tirosinasa, colágenos de la cutícula y laminina (Gerrits & Blaxter, 1996; Huang et al., 2003). Además, tiene un mayor número de genes supuestamente implicados en la transcripción (Mitreva et al., 2004).

En el estadio infectivo de larva 3 (L3i) se identificaron metaloproteasas de zinc similares a astacina y homólogos del antígeno L3Nie de *S. stercoralis*, el cual es considerado un importante antígeno para el inmunodiagnóstico de este parásito (Ravi et al., 2002). Otros genes de interés identificados fueron el OSM-11, el cual es un co-activador del receptor Notch que está implicado en defecación y resistencia osmótica en *C. elegans*. Los genes fosfomanomutasa y  $\alpha$ -manosidasa, implicados en reacciones de biosíntesis de glicanos también fueron identificados (Komatsu et al., 2008; Stoltzfus et al., 2012).

En el estadio de parásito adulto se encontraron una gran cantidad de genes diferencialmente expresados, sin embargo, muchos de ellos (42%) no presentaron homología con ninguna otra especie de nematodos (Johnston et al., 2010).

La caracterización de las proteínas de *S. stercoralis* es difícil, probablemente por la dificultad de obtener suficiente material para estudios bioquímicos. Basados en los estudios de transcriptoma de larva L3 de *S. stercoralis*, se han caracterizado un total de 8.037 proteínas entre las que se incluye un abundante número de proteínas enzimáticas como quinasas y proteasas. Un total de 1.213 de las proteínas fueron recopiladas e identificadas como proteínas de secreción/excreción. Las proteínas

enzimáticas fueron el grupo más representativo con un total de 41 proteínas antigénicas que pueden ser utilizados para el inmunodiagnóstico y como potenciales dianas terapéuticas (Ramanathan et al., 2011; Marcilla et al., 2012).

Desde noviembre de 2014 sólo hay 76 secuencias de proteínas de *S. stercoralis* en el Banco de Genes, la mayoría de ellas deducidas a partir de las secuencias de ADN. Debido a que no se conoce ampliamente las proteínas del parásito que están implicadas en la interacción con receptores del hospedador definitivo, se realizó un análisis proteómico del estadio larvario 3 (L3) de *S. stercoralis*. Dicho estudio demostró que no hay una abundante cantidad de proteínas diferencialmente expresadas (Marcilla et al., 2010). Sin embargo, se requieren nuevos estudios para poder identificar proteínas que puedan ser utilizadas para desarrollar otras herramientas de diagnóstico, vacunas o nuevos tratamientos frente a la estrogiloidosis.

### 1.1.2.3 Ciclo biológico

El ciclo biológico resulta bastante particular, ya que posee dos formas de transmisión: heteroinfección y autoinfección.

(a) Heteroinfección: Es el mecanismo habitual de transmisión en los seres humanos. Ocurre cuando las larvas rabditiformes que son eliminadas en heces fecales sufren dos transformaciones hasta convertirse en larvas filariformes (L3) infectantes y penetran la piel o mucosas del hospedador, migrando a través de la vía sanguínea o linfática hasta alcanzar los pulmones. Después penetran en los alvéolos y ascienden por el árbol respiratorio hasta alcanzar la faringe; son deglutidas para llegar al intestino delgado donde alcanzan su madurez sexual (Cox, 2002).

Un aspecto característico en la biología de *Strongyloides* spp. es la presencia única de hembras parásitas en intestino, que se reproducen sin la aparente presencia de machos. Así, ponen sus huevos en la mucosa intestinal, liberan huevos que eclosionan rápidamente y salen las larvas rabditiformes. En el suelo con temperatura adecuada estas larvas pueden evolucionar en dos direcciones: (i) mudando (máximo dos semanas) a larvas filariformes, capaces de penetrar en un nuevo hospedador y (ii) transformándose en adultos de vida libre, con posterior cópula, producción de huevos, eclosión de la larva L1 rabditiforme, después a L2 y posteriormente a filariforme (L3), que también serán capaces de infectar.

(b) Autoinfección: Es característica biológica propia de *S. stercoralis* la posibilidad de transformación en el intestino grueso del hospedador de

larvas rhabditiformes en larvas filariformes. Así, las larvas filariformes no salen al medio externo y penetran a través de la mucosa intestinal o la piel perianal. En la autoinfección pueden intervenir factores locales como estreñimiento, divertículos o disminución de la motilidad intestinal, o sistémicos como la administración de glucocorticoides. Como consecuencia de 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 graves consecuencias (Grove, 1995; Yepes Victoria et al., 2012).

En especies como *S. venezuelensis*, utilizado como modelo experimental de infección, se observa huevos a diferencia de *S. stercoralis*, en las heces de ratas infectadas. En la figura 1.6 se muestra el ciclo biológico de *S. stercoralis*.

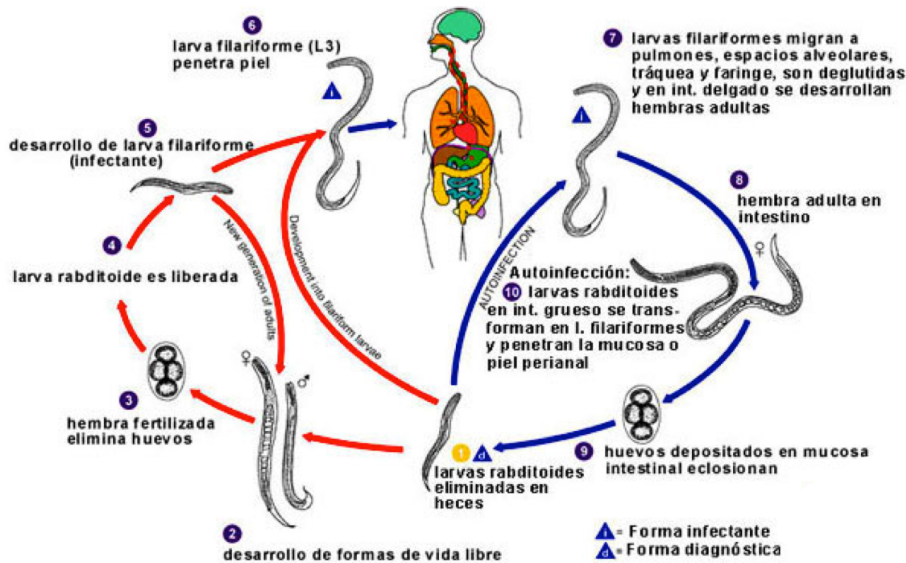


Figura 1.6: Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*.

(Tomado de <http://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>)

#### 1.1.2.4 Epidemiología

La estrongiloidosis es una infección mundial emergente, más frecuente en zonas cálidas donde las condiciones climáticas como humedad y calor permiten el desarrollo y supervivencia del parásito, afectando entre 30 y 100 millones de personas con diferentes prevalencias en todo el mundo (Schär et al., 2013). Principalmente se ha incrementado en Europa meridional,

central y oriental, las islas del Caribe, el sudeste de Asia, América Latina y África subsahariana (Puthiyakunnon et al., 2014). Es altamente prevalente en algunas comunidades tropicales en Australia (Johnston et al., 2005) y es poco común en los Estados Unidos (Crocker et al., 2010).

La distribución de la enfermedad es bastante heterogénea y Paula & Costa-Cruz (2011) plantea tres categorías epidemiológicas basadas en la prevalencia de la estrogiloidosis: regiones dónde la infección ocurre de forma esporádica, con prevalencia global menor al 1%, regiones endémicas con prevalencia entre 1 - 5% y regiones hiperendémicas con prevalencia mayor al 5% y situadas en los trópicos, donde los niños son los más afectados por esta infección.

*Strongyloides* se encuentra con más frecuencia en las zonas rurales y está fuertemente asociado con actividades agrícolas y mineras tradicionales y en lugares donde hay insalubridad ambiental. La falta de conocimiento acerca de la enfermedad en poblaciones de alto riesgo, provoca un aumento en la tasa de infección, por tanto, la prevalencia global de la estrogiloidosis ha ido en aumento en los últimos años (Figura 1.7) y varía mucho entre diferentes países, dependiendo del área analizada (Tabla 1.6) (Puthiyakunnon et al., 2014; Izquierdo et al., 2013; Russell et al., 2014).

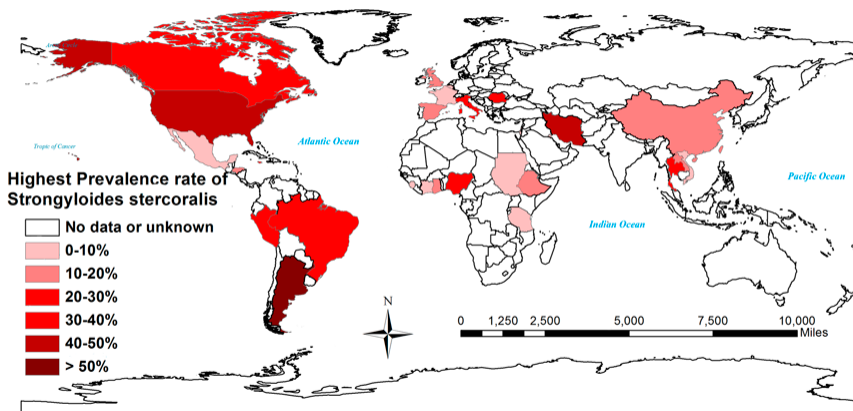


Figura 1.7: Prevalencia global de la infección por *Strongyloides stercoralis*.  
(Tomado de Puthiyakunnon et al.,2014)

Estudios publicados en España sobre infecciones causadas por *S. stercoralis*, indican casos aislados en zonas templadas del mediterráneo en hombres de edad avanzada y procedente de la zona de Gandía (Valencia, España). La mayoría de estos pacientes se dedican a labores agrícolas, en los que la prevalencia alcanza el 12,4% (Román-Sánchez et al., 2003; Sánchez et al., 2001). En otro estudio, se analizaron un total de 70 casos en el área de



Continente	País	Prevalencia % <i>S. stercoralis</i>
América del Norte	Canadá	0,4 – 24,7
	Estados Unidos	0,4 – 46,0
	México	1,0
Centroamérica	Honduras	16,4
	Jamaica	24,2
América del Sur	Argentina	29,4 - 83,3
	Brasil	1,3 – 30,1
	Perú	0,8 – 28,9
Europa	Bélgica	0,9
	Francia	1,4 – 6,4
	Italia	0,07 – 28,0
	Rumania	6,9 – 30,0
	España	0,9 – 12,4
	Reino Unido-Liverpool	12,0
Asia	China	14,0
	Irán	0,03 – 42,0
	Israel	0,9
	Kuwait	0,4
	Laos PDR	19,0
	Tailandia	11,2 – 28,9
	Vietnam	0,8
África	Costa de Marfil	0,1
	Etiopía	7,4 – 13
	Ghana	17,9
	Nigeria	5,3 – 35,2
	Sierra Leona	3,8
	Sudán	3,3
	Tanzania	1,6 – 10,5

Tabla 1.6: Prevalencia global de *Strongyloides stercoralis* en regiones endémicas y no endémicas de la enfermedad. (Adaptado de Puthiyakunnon et al.,2014)

Barcelona (España), se encontró que el 90% de los casos con estrongiloidosis eran inmigrantes, 7% viajeros y sólo el 3% de los casos fueron autóctonos (Valerio et al., 2013).

### 1.1.2.5 Patogenia

En la estrongiloidosis se presenta una disminución en la respuesta de los linfocitos, eosinofilia periférica y aumento en la actividad de los mastocitos intestinales, hiperplasia de las células productoras de mucina e incremento de IgE e IgA. Existe un predominio de linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5 e IL-9. IL-10 e IL-13 participan en la defensa contra *S. stercoralis* (Else & Finkelman, 1998; MacDonald et al., 2002).

Al penetrar la piel en cualquier sitio que se exponga a la

tierra contaminada con el parásito, las larvas L3 filariformes secretan metaloproteasa histolítica con actividad elastasa, que favorece la penetración en la piel por la degradación de la matriz dérmica (Safer et al., 2007).

Las larvas siguen hasta llegar a vasos linfáticos y sanguíneos, los cuales utiliza el parásito para desplazarse y llegar a los pulmones, atraviesan los capilares pulmonares y salen a los alvéolos (Vijayan, 2007; Dogan et al., 2014); posteriormente migran a la tráquea y faringe y son deglutidos hasta llegar al intestino. Algunos mecanismos inmunológicos se activan e intervienen en este nivel como por ejemplo los macrófagos alveolares.

Estudios realizados en nuestro laboratorio con *S. venezuelensis*, demostraron la activación del óxido nítrico y el aumento de la expresión de factores angiogénicos en macrófagos estimulados con diferentes antígenos del parásito (Shariati et al., 2010; Gajate et al., 2012; Ruano et al., 2015).

En el intestino, las células cebadas actúan en la defensa contra la estrongiloidosis. Se han descrito mecanismos que impiden la adhesión a las células epiteliales y la posterior invasión de las hembras a la mucosa intestinal, debido a la disminución de proteínas facilitadoras de la adhesión al epitelio secretadas por el parásito y a la secreción de sustancias por mastocitos (heparina, condroitín sulfato A y E) que son neutralizantes de moléculas secretadas por el parásito (proteína de 42 kDa que se une a heparina) (Ruano et al., 2005).

*S. stercoralis* en la actualidad ha adquirido una mayor importancia debido a su incidencia en determinadas infecciones virales como las producidas en la coinfección por HTLV-1 y VIH/SIDA. En pacientes co-infectados con HTLV-1, se presenta un predominio Th1, con disminución de Th2 que favorece el desarrollo de la hiperinfección.

#### **1.1.2.6 Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas en los pacientes varían según la intensidad de la infección y el estado inmunológico del mismo (Gill et al., 2004). En las personas inmunocompetentes la mitad de los sujetos infectados están asintomáticos y la presencia de eosinofilia en algunas ocasiones nos indica la posibilidad de infección con el parásito (Figura 1.8).

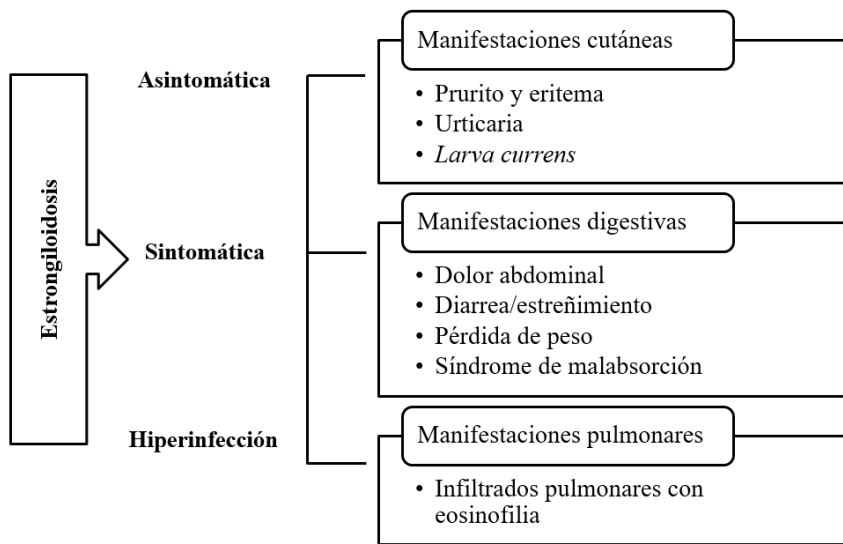


Figura 1.8: Manifestaciones clínicas de la estrongiloidosis.

La manifestación cutánea más característica es la *larva currens*, una lesión linear urticariforme, serpiginosa y migratoria que progresa con rapidez (entre 5 y 10 cm/h), con localización frecuente en nalgas, ingles, abdomen y tronco que desaparece a las 12 a 48 h. Se puede manifestar como prurito, lesión maculopapular en los miembros inferiores y urticaria generalizada si ocurre la sensibilización a antígenos del parásito. Algunos pacientes con infección diseminada y trombocitopenia pueden padecer púrpura cutánea generalizada, provocada probablemente por las larvas filariformes que emigran a la dermis (Caumes, 2004; Montes et al., 2010).

Las manifestaciones respiratorias se producen por el paso de las larvas a través de los pulmones originando tos, broncoespasmo e infiltrados diseminados (Ardıç, 2009).

Las manifestaciones digestivas son dolor abdominal intenso, diarrea leve y prurito anal, náuseas, vómitos, sangrado digestivo, abdomen agudo, granulomas hepáticos, hemoptisis, esteatorrea, anorexia, hipoproteinemia, que posiblemente esté asociado con el estado nutricional e inmunitario del paciente (Ghoshal et al., 2006; Lam et al., 2006; Concha et al., 2005; Gaus et al., 2011). En infecciones moderadas puede haber dilatación del duodeno, yeyuno y edema de la mucosa y en casos graves puede presentarse estenosis intestinal (Concha et al., 2005; Feely et al., 2010).

*S. stercoralis* como consecuencia del proceso de autoinfección puede originar el síndrome de hiperinfección en pacientes sometidos a corticoterapia prolongada o terapia inmunosupresora posterior a trasplante de órganos.

### 1.1.2.7 Diagnóstico

El diagnóstico es esencial para erradicar la infección y el riesgo de por vida causado por *S. stercoralis* en sujetos infectados o asintomáticos. Actualmente existen nuevos enfoques para el diagnóstico definitivo de la infección por *S. stercoralis* que se hace con la visualización directa del parásito, según cantidad o número de larvas rabditiformes de *Strongyloides* presentes en las muestras. El examen coprológico, es un método simple, directo, de bajo coste y con una sensibilidad de hasta el 52% (Ericsson et al., 2001).

Se han desarrollado distintas técnicas para mejorar el diagnóstico y aislar e identificar las larvas. La técnica de Baermann, donde la materia fecal se suspende en una gasa sobre un embudo que se encuentra en contacto con agua a  $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$  y conectado a un tubo. Entre 40 - 60 minutos se observa la presencia de larvas en el fondo del tubo. Es una técnica 3,6 veces más eficiente que los exámenes coprológicos. Otra prueba diagnóstica es la de Harada Mori, donde la materia fecal se coloca sobre un papel de filtro, cuyo extremo se mantiene en agua dentro de un tubo de ensayo y se incuba durante 10 días a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El sedimento se revisa diariamente en busca de larvas vivas (Campo Polanco et al., 2014). Otro método es cultivo en placa de agar nutritivo, donde incuban durante dos días entre  $30 - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se puede observar la migración de las larvas que forman un patrón característico de surcos. Tiene una sensibilidad de hasta el 55% (Sukhavat et al., 1994). La técnica de Kato-Katz es otra técnica coproparasitológica utilizada debido a su sencillez y bajo coste que además permite conocer la intensidad de la infección (Buonfrate et al., 2015). La estrongiloidosis puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, por lo que el aspirado duodenal puede ser efectivo. Exámenes histológicos pueden confirmar la presencia de larvas, huevos y formas adultas del parásito (Kishimoto et al., 2008).

La mayoría de los métodos inmunológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos contra *Strongyloides*; para ello se emplea la técnica ELISA usando extractos crudos procedentes de larvas filariformes permitiendo la detección de anticuerpos IgG. Esta prueba presenta una elevada sensibilidad (Requena-Méndez et al., 2013; van Doorn et al., 2007), aunque existe reactividad cruzada con otras infecciones producidas por helmintos (filarias y esquistosomas). Recientemente se ha desarrollado un sistema de inmunoprecipitación con luciferasa para la detección de IgG contra dos antígenos, uno recombinante denominado NIE (*recombinant antigen*) y otro inmunorreactivo llamado SsIR (*S. stercoralis immunoreactive antigen*), con especificidad del 100% (Ramanathan et al., 2008). El test serológico comercial utilizado en hospitales para el diagnóstico de *S. stercoralis* es *Strongyloides* IgG ELISA, EIA-4208 (DRG Diagnostics, Germany).

En los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas moleculares para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico para la detección de *S. stercoralis*. La técnica de PCR a tiempo real presenta una elevada sensibilidad y especificidad, siendo cada vez más utilizada en los laboratorios de referencia (Marra et al., 2010). Una de las ventajas de esta técnica es que aumenta en dos veces la tasa de detección respecto al método de Baermann (Verweij et al., 2009). La combinación de PCR junto con la observación de heces a través del microscopio presentan resultados de una alta precisión para el diagnóstico de la enfermedad (Becker et al., 2015). Otra técnica molecular de alta sensibilidad para detectar *S. stercoralis* en muestras de heces es el método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), técnica más sensible que la PCR y de fácil aplicación en áreas endémicas (Watts et al., 2014) (Gandasegui et al., *in press*).

### 1.1.2.8 Tratamiento

El objetivo de la farmacoterapia en la estrogiloidosis es erradicar la infección, reducir la morbilidad y la mortalidad, y prevenir complicaciones por el desarrollo de hiperinfección. En la década de 1970, se descubrió una clase de compuestos llamados avermectinas B1a y B1b, lactonas macrocíclicas producidas por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*, que dio lugar a la ivermectina, una mezcla 80:20 de avermectinas. Fue lanzado al mercado en 1981 inicialmente como medicamento veterinario contra una amplia gama de nematodos y artrópodos. Actualmente es el fármaco de elección para el tratamiento de la estrogiloidosis con tasas de curación entre el 70 y 85% en pacientes con infección crónica (Igual-Adell et al., 2004; World Health Organization, 2008). Es de acción rápida, específica, de amplio espectro, bien tolerado y de fácil absorción por vía oral. Además, se está utilizando de forma gratuita, logrando seguridad, eficacia e impacto beneficioso en las comunidades más pobres del mundo (Callaway & Cyranoski, 2015). El uso de la ivermectina puede causar efectos secundarios leves y transitorios como edema, fiebre y prurito que se puede tratar fácilmente (Omura & Crump, 2004; Crump, 2014).

Su mecanismo de acción se basa en la inmovilización de los parásitos por su efecto sobre los canales de iones de cloro que están regulados por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) provocando aumento de permeabilidad de la membrana que causa parálisis de la musculatura y muerte del parásito (Estrada-Mondragon & Lynch, 2015). La pauta de administración se muestra en la tabla 1.7. Para monitorizar la respuesta al tratamiento se valora el recuento de eosinófilos junto con la cuantificación de anticuerpos y el seriado de muestras de heces (Vadlamudi et al., 2006).

Los benzimidazoles como albendazol y tiabendazol, son antihelmínticos que se utilizan como tratamiento alternativo de la estrongiloidosis. Actúan sobre las cadenas de  $\beta$ -tubulina del parásito y sobre la inhibición de la secreción de acetilcolinesterasa provocando relajación y parálisis irreversible del parásito. También inhiben la formación de microtúbulos agotando los niveles de glucosa del parásito causando su muerte. En algunos países hay acceso restringido a la ivermectina, propiciando el uso de benzimidazoles como primera alternativa. Otra alternativa al tratamiento es la terapia de combinación, incluyendo ivermectina y tiabendazol con una mejor eliminación de las larvas de las heces (Puthiyakunnon et al., 2014). Un nuevo fármaco, tribendimidina, sigue siendo objeto de investigación en China y muestra cierta promesa en el tratamiento de la estrongiloidosis (Steinmann et al., 2008).

De momento, no se dispone de una vacuna eficaz para la prevención de la estrongiloidosis y su control 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 las manos o evitar caminar descalzo por los campos (Yepes Victoria et al., 2012).

<b>Elección</b>	<b>Alternativas</b>
Ivermectina	Albendazol 400 mg/12h x 3 días
200 mg/kg 2 días consecutivos	Tiabendazol 25 mg/kg/12h hasta 3g/día
Repetir a la semana	2 días en inmunocompetentes
	7 días en inmunodeprimidos

Tabla 1.7: Tratamiento de la estrongiloidosis. (Adaptado de Yepes Victoria et al., 2012)

## 1.2 Nuevas alternativas terapéuticas

### 1.2.1 Aminoalcanoles y alcanodiaminas

Los esfingolípidos son compuestos que llevan en su estructura un esqueleto base de 2-amino-1,3-diol sobre una cadena carbonada larga, que puede contener algunas insaturaciones. En los mamíferos los más comunes son la esfingosina, con un doble enlace en configuración E en C-4 y la esfinganina, que no presenta doble enlace en su estructura (Figura 1.9). En las especies vegetales el tamaño de la cadena alifática varía de 10 a 20 átomos de carbono (Sperling & Heinz, 2003). Las ceramidas son esfingolípidos que presentan un grupo acilo sobre la amina de tamaño variable, generalmente largo, siendo las más comunes, los ácidos palmíticos (C16) y esteárico (C18), así como ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados (Shayman, 2000).

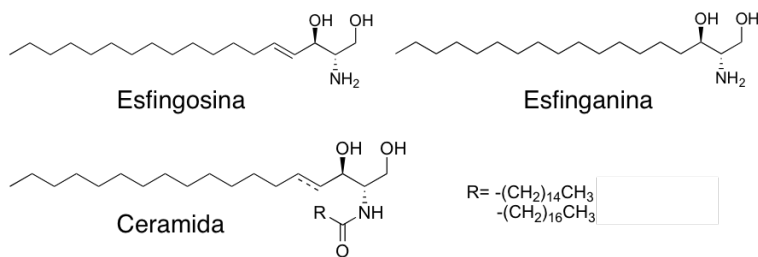


Figura 1.9: Estructuras químicas de la esfingosina, esfinganina y ceramida.

Se sabe que los esfingolípidos y las ceramidas están involucrados en numerosos procesos biológicos, entre los que se encuentran la respuesta inflamatoria y los procesos asociados a estrés, así como la proliferación celular, apoptosis y la diferenciación celular, entre otras (Park et al., 2008). La esfingosina 1-fosfato (S1P) (Figura 1.10), originada a partir de esfingosina, ha sido ampliamente estudiada en los últimos años y se ha asociado a procesos de balance de crecimiento/muerte celular, movilización de calcio, diferenciación celular, angiogénesis, regulación del balance de células T, B y dendríticas y actividad antimicobacteriana (Allende & Proia, 2002; Garg et al., 2006; Kihara et al., 2007; Morales et al., 2007; Hla et al., 2008; Rivera et al., 2008; Takuwa et al., 2008).

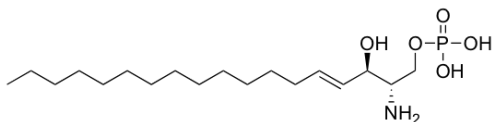


Figura 1.10: Estructura química de la esfingosina 1-fosfato.

El grupo de investigación de Química Farmacéutica - CIETUS, especializado en el diseño y la síntesis de moléculas bioactivas, y enfocado en los últimos años en la obtención de sustancias activas frente a diferentes enfermedades parasitarias, entre las que se encuentran leishmaniosis o malaria, se interesó por este tipo de compuestos, iniciando unos trabajos de síntesis de derivados de 2-aminoalcan-1-oles y alcano-1,2-diaminas, relacionadas estructuralmente con esfingosina y dihidroesfingosina. En un inicio los estudios se enfocaron en la obtención de sustancias potencialmente anti-inflamatorias (compuestos de estructura genérica I) (Figura 1.11).

Además de ensayos de actividad anti-inflamatoria (Lucas et al., 2000), se realizaron ensayos de actividad antifúngica (Lucas et al., 2004), antiparasitaria (del Olmo et al., 2002a), incluso se estudiaron efectos sobre la movilización de calcio intracelular (Lucas et al., 2003) o la inducción de apoptosis (del Olmo et al., 2002b) y más recientemente

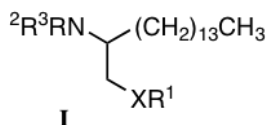


Figura 1.11: Estructura genérica I de compuestos relacionados estructuralmente con dihidroesfingosina.

$R^1 = H, Bn$ ;  $R^2, R^3 = H$ , alquilo (Et, Bu, Hex), acilo ( $-CO(CH_2)_3COOH$ );  $X = N, O$

antimicobacteriana (Patente Española N200602940; Patente Internacional WO/EP2007/062381).

Posteriormente se obtuvieron compuestos relacionados con el tipo I con un largo de cadena variable (Figura 1.12), compuestos que presentaron buena actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* o *Trypanosoma brucei* (Olmo et al., 2012).

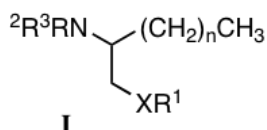


Figura 1.12: Estructura química de compuestos relacionados con el tipo I con un largo de cadena variable.

$n = 9, 13, 15, 17$ ;  $R^1 = H, Bn$ ;  $R^2, R^3 = H$ , alquilo (Et, Bu, Hex), acilo ( $-CO(CH_2)_3COOH$ );  $X = N, O$

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en este trabajo de Tesis Doctoral se han ensayado compuestos tipo I, frente a diferentes cepas de *T. cruzi*, así como frente al nematodo *S. venezuelensis*.

### 1.2.2 Agentes antitumorales aplicados a la terapia de la enfermedad parasitaria

Los denominados lípidos sintéticos antitumorales (ATLs, *synthetic antitumor lipids*), constituyen un grupo heterogéneo de lípidos naturales con una prometedora actividad anticancerígena, que a diferencia de la mayoría de medicamentos antitumorales utilizados hoy en día en la clínica, no tienen como diana el ADN (Gajate & Mollinedo, 2002), sino que actúan a nivel de membranas celulares afectando a la señalización apoptótica (Gajate & Mollinedo, 2007). Los ATLs pueden clasificarse en dos categorías:

- a) Los fosfolípidos alquil éter, conocidos como éter lípidos antitumorales o análogos de alquilfosfolípidos, siendo la edelfosina



(1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) su prototipo.

- b) Las alquilfosfocolinas, de las que su ejemplo es la miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Mollinedo et al., 2004).

La edelfosina induce apoptosis de forma selectiva en células tumorales, a través de un mecanismo de acción que implica la activación intracelular del receptor de muerte Fas/CD95 (*Fas ligand/CD95 ligand*) (Gajate & Mollinedo, 2002), mediante su reclutamiento y concentración en los denominados *lipid rafts*, y por este mecanismo parece ser eficaz frente a malignidades hematológicas (Gajate et al., 2004; Mollinedo et al., 2010a,b). En tumores sólidos actúa a través del retículo endoplásmico (Nieto-Miguel et al., 2007; Gajate et al., 2012), siendo la mitocondria, al menos en parte, fundamental en la inducción de apoptosis por edelfosina (Gajate et al., 2000; Burgeiro et al., 2013).

De entre los análogos alquilfosfolípidos (APLs), la miltefosina, un análogo fosfocolina (hexadecilfosfocolina) que afecta a las vías de señalización celular y la síntesis de la membrana, es actualmente el único tratamiento oral contra la leishmaniosis visceral. Se administra a dosis de 100 a 150 mg/día durante 28 días, y para casos de leishmaniosis cutánea o mucosa se administra a dosis de 2,5 mg/kg al día durante 28 días (Jha et al., 1999). Este medicamento ha sido aprobado para tratamiento en países como la India desde el año 1998 en pacientes con leishmaniosis visceral (Sundar et al., 2013) y el éxito logrado ha impulsado su evaluación como tratamiento de otras formas de leishmaniosis. Sin embargo, la miltefosina no es igualmente eficaz contra todas las especies de *Leishmania* (Soto et al., 2004). La fácil administración por vía oral de la miltefosina es una ventaja frente a otros tratamientos, pero presenta el inconveniente de que puede tener efecto teratogénico, por lo que no se puede administrar en mujeres gestantes (Dorlo et al., 2006).

Otro análogo alquilfosfolípido con interés clínico es la perifosina, que tiene actividad anti-proliferativa a nivel *in vitro* como *in vivo* en diferentes tumores humanos. Se han llevado a cabo ensayos clínicos en fase I / II con perifosina como único agente, pero con eficacia anticancerígena limitada en diversos tipos de cánceres (Gills & Dennis, 2009). Perifosina es un inhibidor de la proteína AKT (*Serine/threonine kinase B*) al interferir con su reclutamiento a la membrana celular y la fosforilación por PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) (Ma et al., 2012). Perifosina se ha mostrado como un potente antitumoral en un modelo de ratón de xenoinjerto de linfoma de células de manto (Reis-Sobreiro et al., 2013), y una opción interesante para un futuro uso clínico es su combinación con otros compuestos, como los inhibidores de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), inhibidor de tirosina quinasas y Raf quinasas. En este sentido

la actividad antitumoral de perifosina combinada con otros fármacos se está evaluando en la actualidad en distintos tipos de cáncer, incluyendo ensayos clínicos de fase III (Fensterle et al., 2014). En los ensayos clínicos que se han llevado a cabo, se ha observado que el tratamiento con perifosina es bien tolerado, a excepción de unas pequeñas manifestaciones que se observan con mayor frecuencia como náuseas y diarrea (Cho et al., 2012). Las estructuras químicas de los alquifosfolípidos se muestran en la figura 1.13.

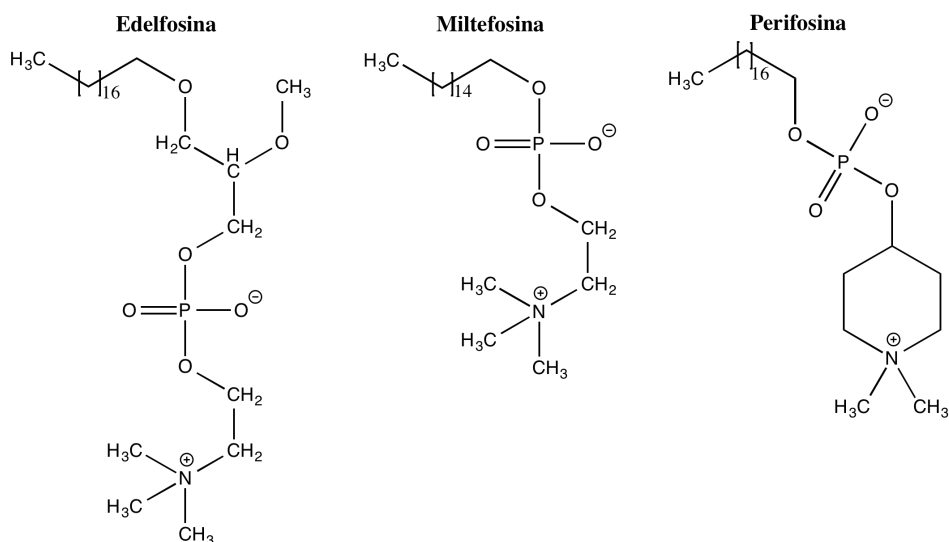


Figura 1.13: Estructuras químicas de alquifosfolípidos.

Además de su actividad antitumoral, la edelfosina ha demostrado que ejerce actividad contra parásitos tales como *Leishmania* spp. en cultivos de macrófagos infectados y en infecciones experimentales en ratones y hámster (Varela-M et al., 2012). Así mismo potencia la inducción de muerte celular por medio de apoptosis en *L. infantum* y en promastigotes de *L. panamensis* (Varela-M et al., 2014). En embriones del nematodo de vida libre *C. elegans* induce acción selectiva y muerte directa (Sánchez-Blanco et al., 2014), así como en adultos de *Schistosoma mansoni* en ensayos *in vitro* e *in vivo* en ratones tratados por vía oral con edelfosina reduce la carga parasitaria (Yepes et al., 2014). En combinación con praziquantel es capaz de matar formas inmaduras de *S. mansoni* modulando la respuesta inmune de los ratones infectados con la reducción significativa en la carga parasitaria y tamaño del granuloma hepático (Yepes et al., 2015).

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Alcaide, P. & Fresno, M. (2004). Agc10, a mucin from trypanosoma cruzi, destabilizes tnf and cyclooxygenase-2 mrna by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Eur J Immunol*, 34(6), 1695–1704.
- Allende, M. L. & Proia, R. L. (2002). Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta*, 1582(1-3), 222–7.
- Almeida, E. A. d., Ramos Junior, A. N., Correia, D., & Shikanai-Yasuda, M. A. (2011). Co-infection trypanosoma cruzi/hiv: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop*.
- Alves, C. R., Albuquerque-Cunha, J. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., Nogueira, N. F., Bourguignon, S. C., de Souza, W., Azambuja, P., & Gonzalez, M. S. (2007). *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, 116(1), 44–52.
- Andreoli, W. K., Taniwaki, N. N., & Mortara, R. A. (2006). Survival of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes within *Coxiella burnetii* vacuoles: differentiation and replication within an acidic milieu. *Microbes Infect*, 8(1), 172–82.
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus*, 13(4), 540–50.
- Ardıç, N. (2009). An overview of *Strongyloides stercoralis* and its infections. *Mikrobiyol Bul*, 43(1), 169–77.
- Atwood, 3rd, J., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2005). The trypanosoma cruzi proteome. *Science*, 309(5733), 473–476.
- Basile, L., Jansa, J. M., Carlier, Y., Salamanca, D. D., Angheben, A., Bartoloni, A., Seixas, J., Van Gool, T., Canavate, C., Flores-Chavez,

- M., Jackson, Y., Chiodini, P. L., Albajar-Vinas, P., & Working Group on Chagas Disease (2011). Chagas disease in european countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill*, 16(37).
- Becker, S. L., Piraisoody, N., Kramme, S., Marti, H., Silué, K. D., Panning, M., Nickel, B., Kern, W. V., Herrmann, M., Hatz, C. F., N’Goran, E. K., Utzinger, J., & von Müller, L. (2015). Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Côte d’Ivoire: Diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. *Acta Trop*, 150, 210–217.
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Pablo Real, J., & Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop*, 156, 1–16.
- Bringaud, F., Bartholomeu, D. C., Blandin, G., Delcher, A., Baltz, T., El-Sayed, N. M. A., & Ghedin, E. (2006). The trypanosoma *cruzi* 11tc and nartc non-ltr retrotransposons show relative site specificity for insertion. *Mol Biol Evol*, 23(2), 411–420.
- Buonfrate, D., Formenti, F., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2015). Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Microbiol Infect*, 21(6), 543–552.
- Burgeiro, A., Pereira, C. V., Carvalho, F. S., Pereira, G. C., Mollinedo, F., & Oliveira, P. J. (2013). Edelfosine and perifosine disrupt hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation and induce the permeability transition. *Mitochondrion*, 13(1), 25–35.
- Callaway, E. & Cyranoski, D. (2015). Anti-parasite drugs sweep nobel prize in medicine 2015. *Nature*, 526(7572), 174–175.
- Campo Polanco, L., Gutiérrez, L. A., & Cardona Arias, J. (2014). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013). *Rev Esp Salud Publica*, 88(5), 581–600.
- Cantacessi, C., Campbell, B. E., Visser, A., Geldhof, P., Nolan, M. J., Nisbet, A. J., Matthews, J. B., Loukas, A., Hofmann, A., Otranto, D., Sternberg, P. W., & Gasser, R. B. (2009). A portrait of the "scp/taps" proteins of eukaryotes—developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes. *Biotechnol Adv*, 27(4), 376–388.
- Castro, D. P., Seabra, S. H., Garcia, E. S., de Souza, W., & Azambuja, P. (2007). *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol*, 117(2), 201–7.

- Castro, J. A., de Mecca, M. M., & Bartel, L. C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat chagas' disease (american trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*, 25(8), 471–9.
- Caumes, E. (2004). Efficacy of albendazole ointment on cutaneous *larva migrans* in 2 young children. *Clin Infect Dis*, 38(11), 1647–1648.
- Cho, D. C., Hutson, T. E., Samlowski, W., Sportelli, P., Somer, B., Richards, P., Sosman, J. A., Puzanov, I., Michaelson, M. D., Flaherty, K. T., Figlin, R. A., & Vogelzang, N. J. (2012). Two phase 2 trials of the novel Akt inhibitor perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma after progression on vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer*, 118(24), 6055–62.
- Concha, R., Harrington, Jr, W., & Rogers, A. I. (2005). Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *J Clin Gastroenterol*, 39(3), 203–11.
- Cordero, E. M., Gentil, L. G., Crisante, G., Ramírez, J. L., Yoshida, N., Añez, N., & Franco da Silveira, J. (2008). Expression of gp82 and gp90 surface glycoprotein genes of *trypanosoma cruzi* during in vivo metacyclogenesis in the insect vector *rhodnius prolixus*. *Acta Trop*, 105(1), 87–91.
- Costa-Cruz, J., Neves, D., & Melo, A. (2000). *Strongyloides stercoralis*. *Parasitologia Humana*, 10, 247–256.
- Cox, F. E. (2002). History of human parasitology. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 595–612.
- Crocker, C., Reporter, R., Redelings, M., & Mascola, L. (2010). Strongyloidiasis-related deaths in the united states, 1991-2006. *Am J Trop Med Hyg*, 83(2), 422–426.
- Crump, A. (2014). The advent of ivermectin: people, partnerships, and principles. *Trends Parasitol*, 30(9), 423–425.
- Damatta, R. A., Seabra, S. H., Deolindo, P., Arnholdt, A. C. V., Manhães, L., Goldenberg, S., & de Souza, W. (2007). *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett*, 266(1), 29–33.
- de Godoy, L. M. F., Marchini, F. K., Pavoni, D. P., Rampazzo, R. d. C. P., Probst, C. M., Goldenberg, S., & Krieger, M. A. (2012). Quantitative proteomics of *trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics*, 12(17), 2694–2703.

- De Pablos, L. M., González, G. G., Solano Parada, J., Seco Hidalgo, V., Díaz Lozano, I. M., Gómez Samblás, M. M., Cruz Bustos, T., & Osuna, A. (2011). Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 79(10), 3993–4001.
- De Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, 8(4), 269–85.
- de Souza, W., de Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*, 2010.
- del Olmo, E., Alves, M., López, J. L., Inchausti, A., Yaluff, G., Rojas de Arias, A., & San Feliciano, A. (2002a). Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(4), 659–62.
- del Olmo, E., Macho, A., Alves, M., López, J. L., el Banoua, F., Muñoz, E., & San Feliciano, A. (2002b). Long-chain aminoalcohol and diamine derivatives induce apoptosis through a caspase-3 dependent pathway. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(18), 2621–6.
- Demoro, B., Caruso, F., Rossi, M., Benítez, D., Gonzalez, M., Cerecetto, H., Parajón-Costa, B., Castiglioni, J., Galizzi, M., Docampo, R., Otero, L., & Gambino, D. (2010). Risedronate metal complexes potentially active against chagas disease. *J Inorg Biochem*, 104(12), 1252–1258.
- Diaz, J. H. (2008). Recognizing and reducing the risks of Chagas disease (american trypanosomiasis) in travelers. *J Travel Med*, 15(3), 184–95.
- Dogan, C., Gayaf, M., Ozsoz, A., Sahin, B., Aksel, N., Karasu, I., Aydogdu, Z., & Turgay, N. (2014). Pulmonary strongyloides stercoralis infection. *Respir Med Case Rep*, 11, 12–5.
- Dorlo, T. P. C., Eggelte, T. A., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2006). Miltefosine: a new remedy for leishmaniasis. *Ned Tijdschr Geneesk*, 150(49), 2697–701.
- Dutra, W. O., Rocha, M. O. C., & Teixeira, M. M. (2005). The clinical immunology of human chagas disease. *Trends Parasitol*, 21(12), 581–587.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T.,

- Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasc, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., & Andersson, B. (2005). The genome sequence of *trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*, 309(5733), 409–415.
- Else, K. J. & Finkelman, F. D. (1998). Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int J Parasitol*, 28(8), 1145–58.
- Ericsson, C. D., Steffen, R., Siddiqui, A. A., & Berk, S. L. (2001). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 1040–1047.
- Estrada-Mondragon, A. & Lynch, J. W. (2015). Functional characterization of ivermectin binding sites in  $\alpha 1\beta 2\gamma 2l$  gaba(a) receptors. *Front Mol Neurosci*, 8, 55.
- Feely, N. M., Waghorn, D. J., Dexter, T., Gallen, I., & Chiodini, P. (2010). *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: difficulties in diagnosis and treatment. *Anaesthesia*, 65(3), 298–301.
- Fensterle, J., Aicher, B., Seipelt, I., Teifel, M., & Engel, J. (2014). Current view on the mechanism of action of perifosine in cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 14(4), 629–35.
- Freitas, L. M., Dos Santos, S. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Mendes, T., Rodrigues, T. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M., Fujiwara, R. T., & Bartholomeu, D. C. (2011). Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*, 6(10), e25914.
- Gajate, C., Del Canto-Jañez, E., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F., Geijo, E., Santos-Beneit, A. M., Veldman, R. J., & Mollinedo, F. (2004). Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med*, 200(3), 353–65.
- Gajate, C., Matos-da Silva, M., Dakir, e.-H., Fonteriz, R. I., Alvarez, J., & Mollinedo, F. (2012). Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene*, 31(21), 2627–39.

- Gajate, C. & Mollinedo, F. (2002). Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH-3 (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab*, 3(5), 491–525.
- 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(2), 711–719.
- Gajate, C., Santos-Beneit, A. M., Macho, A., Lazaro, M. d. C., Rojas, H.-D., Modolell, M., Muñoz, E., Mollinedo, F., et al. (2000). Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH3-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer*, 86(2), 208–218.
- Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A., Whitten, M. M., Gonzalez, M. S., & Azambuja, P. (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* - *Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol*, 53(1), 11–21.
- Garg, S. K., Santucci, M. B., Panitti, M., Pucillo, L., Bocchino, M., Okajima, F., Bisen, P. S., Saltini, C., & Fraziano, M. (2006). Does sphingosine 1-phosphate play a protective role in the course of pulmonary tuberculosis? *Clin Immunol*, 121(3), 260–4.
- Gaus, B., Toberer, F., Kapaun, A., & Hartmann, M. (2011). Chronic strongyloides stercoralis infection. *Larva currens* as skin manifestation. *Hautarzt*, 62(5), 380–3.
- Genta RM, Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H. B., Guerrant, R. L., et al. (1995). *Infections of the gastrointestinal tract.*, chapter Strongyloides stercoralis, (pp. 1197–1207). Raven Press.
- Gerrits, D. & Blaxter, M. (1996). Tyrosinases of caenorhabditis elegans. *European Worm Meeting*.
- Ghoshal, U. C., Alexander, G., Ghoshal, U., Tripathi, S., Krishnani, N., et al. (2006). *Strongyloides stercoralis* infestation in a patient with severe ulcerative colitis. *Indian J Med Sci*, 60(3), 106.
- Gill, G. V., Welch, E., Bailey, J. W., Bell, D. R., & Beeching, N. J. (2004). Chronic strongyloides stercoralis infection in former british far east prisoners of war. *QJM*, 97(12), 789–95.
- Gills, J. J. & Dennis, P. A. (2009). Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep*, 11(2), 102–10.
- Giordano, R., Fouts, D. L., Tewari, D., Colli, W., Manning, J. E., & Alves, M. J. (1999). Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for



- the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem*, 274(6), 3461–8.
- Gomes, M. L., Galvao, L. M., Macedo, A. M., Pena, S. D., & Chiari, E. (1999). Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*, 60(2), 205–10.
- Grove, D. I. (1995). Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol*, 38, 251–309.
- Gutiérrez, A. G. & Padilla, V. M. M. (2008). Algunos aspectos de la organización y regulación genética en trypanosoma cruzi: El agente etiológico de la enfermedad de chagas. *Rev Latinoam Microbiol*, 50(3-4), 103–118.
- Gutierrez Zufiaurre, M. N., Dib Diaz-Granados, J. C., Perez-Arellano, J. L., & Muro Alvarez, A. (2012). Infecciones difícilmente transmisibles II: Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas. Tripanosomosis africana. *Manual de Enfermedades Importadas*, (pp. 461).
- Haile, S. & Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*, 10(6), 569–577.
- Hammond, M. P. & Robinson, R. D. (1994). Endoreplication in the ovary, testis, and intestine of *Strongyloides stercoralis*. *J Parasitol*, 80(6), 905–10.
- Hasegawa, H. (1934). (nematoda: Strongyloididae) collected from rattus norvegicus in naha, okinawa, japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 37, 429–434.
- Hla, T., Venkataraman, K., & Michaud, J. (2008). The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim Biophys Acta*, 1781(9), 477–82.
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., & Periago, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(9), e300.
- Hotez, P. J., Dumonteil, E., Woc-Colburn, L., Serpa, J. A., Bezek, S., Edwards, M. S., Hallmark, C. J., Musselwhite, L. W., Flink, B. J., & Bottazzi, M. E. (2012). Chagas disease: the new HIV/AIDS of the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1498.
- Hu, M., Chilton, N. B., & Gasser, R. B. (2003). The mitochondrial genome of strongyloides stercoralis (nematoda) - idiosyncratic gene order and evolutionary implications. *Int J Parasitol*, 33(12), 1393–1408.

- Huang, C.-c., Hall, D. H., Hedgecock, E. M., Kao, G., Karantza, V., Vogel, B. E., Hutter, H., Chisholm, A. D., Yurchenco, P. D., & Wadsworth, W. G. (2003). Laminin  $\alpha$  subunits and their role in *c. elegans* development. *Development*, 130(14), 3343–3358.
- Hunt, V. L., Tsai, I. J., Coghlan, A., Reid, A. J., Holroyd, N., Foth, B. J., Tracey, A., Cotton, J. A., Stanley, E. J., Beasley, H., Bennett, H. M., Brooks, K., Harsha, B., Kajitani, R., Kulkarni, A., Harbecke, D., Nagayasu, E., Nichol, S., Ogura, Y., Quail, M. A., Randle, N., Xia, D., Brattig, N. W., Soblik, H., Ribeiro, D. M., Sanchez-Flores, A., Hayashi, T., Itoh, T., Denver, D. R., Grant, W., Stoltzfus, J. D., Lok, J. B., Murayama, H., Wastling, J., Streit, A., Kikuchi, T., Viney, M., & Berriman, M. (2016). The genomic basis of parasitism in the strongyloides clade of nematodes. *Nat Genet*, 48(3), 299–307.
- Igual-Adell, R., Oltra-Alcaraz, C., Soler-Company, E., Sánchez-Sánchez, P., Matogo-Oyana, J., & Rodríguez-Calabuig, D. (2004). Efficacy and safety of ivermectin and thiabendazole in the treatment of strongyloidiasis. *Expert Opin Pharmacother*, 5(12), 2615–2619.
- Iniguez, E., Sánchez, A., Vasquez, M. A., Martínez, A., Olivas, J., Sattler, A., Sánchez-Delgado, R. A., & Maldonado, R. A. (2013). Metal–drug synergy: new ruthenium (ii) complexes of ketoconazole are highly active against leishmania major and trypanosoma cruzi and nontoxic to human or murine normal cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(7), 779–790.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M. R., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O’neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell,

- J. M., Stuart, K. D., Barrell, B., & Myler, P. J. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436–442.
- Izquierdo, I., Briones, J., Lluch, R., Arqueros, C., & Martino, R. (2013). Fatal strongyloides hyperinfection complicating a gram-negative sepsis after allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature. *Case Rep Hematol*, 2013, 860976.
- Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., Voss, A., & Berman, J. (1999). Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*, 341(24), 1795–800.
- Jing, Y., Toubarro, D., Hao, Y., & Simões, N. (2010). Cloning, characterisation and heterologous expression of an astacin metalloprotease, sc-ast, from the entomoparasitic nematode *steinernema carpocapsae*. *Mol Biochem Parasitol*, 174(2), 101–108.
- Johnston, F. H., Morris, P. S., Speare, R., McCarthy, J., Currie, B., Ewald, D., Page, W., & Dempsey, K. (2005). Strongyloidiasis: a review of the evidence for australian practitioners. *Aust J Rural Health*, 13(4), 247–254.
- Johnston, W. L., Krizus, A., & Dennis, J. W. (2010). Eggshell chitin and chitin-interacting proteins prevent polyspermy in *c. elegans*. *Current Biology*, 20(21), 1932–1937.
- Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y., & Igarashi, Y. (2007). Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog Lipid Res*, 46(2), 126–44.
- Kirchhoff, L. V. (2011). Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Adv Parasitol*, 75, 1.
- Kishimoto, K., Hokama, A., Hirata, T., Ihama, Y., Nakamoto, M., Kinjo, N., Kinjo, F., & Fujita, J. (2008). Endoscopic and histopathological study on the duodenum of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *World J Gastroenterol*, 14(11), 1768–73.
- Komatsu, H., Chao, M. Y., Larkins-Ford, J., Corkins, M. E., Somers, G. A., Tucey, T., Dionne, H. M., White, J. Q., Wani, K., Boxem, M., & Hart, A. C. (2008). Osm-11 facilitates lin-12 notch signaling during *caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol*, 6(8), e196.
- Lam, C. S., Tong, M. K. H., Chan, K. M., & Siu, Y. P. (2006). Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(1), 14–8.

- Lo Presti, M. S., Bazán, P. C., Strauss, M., Báez, A. L., Rivarola, H. W., & Paglini-Oliva, P. A. (2015). Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of chagas disease. *Acta Trop*, 145, 79–87.
- Lucas, R., Alves, M., del Olmo, E., San Feliciano, A., & Payá, M. (2003). LAAE-14, a new *in vitro* inhibitor of intracellular calcium mobilization, modulates acute and chronic inflammation. *Biochem Pharmacol*, 65(9), 1539–49.
- Lucas, R., Ubeda, A., Payá, M., Alves, M., del Olmo, E., López, J. L., & San Feliciano, A. (2000). Synthesis and enzyme inhibitory activities of a series of lipidic diamine and aminoalcohol derivatives on cytosolic and secretory phospholipases A2. *Bioorg Med Chem Lett*, 10(3), 285–8.
- Lucas, R., Villamón, E., Payá, M., Alves, M., del Olmo, E., Gozalbo, D., & Gil, M. L. (2004). LAAE-14, a new anti-inflammatory drug, increases the survival of *Candida albicans*-inoculated mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40(3), 239–42.
- Lucas, R. M. O. & Barba, M. C. P. (2009). [prevalence of american trypanosomiasis in pregnant women from a health area of valencia, spain: 2005-2007]. *Rev Esp Salud Publica*, 83(4), 543–55.
- Ma, Z., Zhu, L., Luo, X., Zhai, S., Li, P., & Wang, X. (2012). Perifosine enhances mTORC1-targeted cancer therapy by activation of GSK3β in NSCLC cells. *Cancer Biol Ther*, 13(11), 1009–17.
- MacDonald, A. S., Araujo, M. I., & Pearce, E. J. (2002). Immunology of parasitic helminth infections. *Infect Immun*, 70(2), 427–433.
- Mahmoud, A. A. (1996). Strongyloidiasis. *Clin Infect Dis*, (pp. 949–952).
- Marcilla, A., Garg, G., Bernal, D., Ranganathan, S., Forment, J., Ortiz, J., Muñoz-Antolí, C., Dominguez, M. V., Pedrola, L., Martinez-Blanch, J., et al. (2012). The transcriptome analysis of strongyloides stercoralis l3i larvae reveals targets for intervention in a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2), e1513.
- Marcilla, A., Sotillo, J., Pérez-García, A., Igual-Adell, R., Valero, M. L., Sánchez-Pino, M. M., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Trelis, M., Toledo, R., & Esteban, J. G. (2010). Proteomic analysis of strongyloides stercoralis l3 larvae. *Parasitology*, 137(10), 1577–1583.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., & Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109–1123.

- Marra, N. M., Chiuso-Minicucci, F., Machado, G. C., Zorzella-Pezavento, S. F. G., França, T. G. D., Ishikawa, L. L. W., Amarante, A. F. T., Sartori, A., & Amarante, M. R. V. (2010). Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(1), 57–61.
- Martínez, A., Carreon, T., Iniguez, E., Anzellotti, A., Sánchez, A., Tyan, M., Sattler, A., Herrera, L., Maldonado, R. A., & Sánchez-Delgado, R. A. (2012). Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium–clotrimazole complexes display high in vitro activity against leishmania major and trypanosoma cruzi and low toxicity toward normal mammalian cells. *Journal of medicinal chemistry*, 55(8), 3867–3877.
- Michaeli, S. (2011). Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol*, 6(4), 459–474.
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, 3rd, J., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of trypanosoma cruzi. *BMC Genomics*, 10, 370.
- Mitreva, M., McCarter, J. P., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., Chiapelli, B., Pape, D., Clifton, S. W., Nutman, T. B., & Waterston, R. H. (2004). Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes strongyloides stercoralis and caenorhabditis elegans. *Genome research*, 14(2), 209–220.
- Mollinedo, F., de la Iglesia-Vicente, J., Gajate, C., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Villa-Pulgarin, J. A., Campanero, M. A., & Blanco-Prieto, M. J. (2010a). Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*, 29(26), 3748–57.
- Mollinedo, F., de la Iglesia-Vicente, J., Gajate, C., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Villa-Pulgarin, J. A., de Frias, M., Roué, G., Gil, J., Colomer, D., Campanero, M. A., & Blanco-Prieto, M. J. (2010b). *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(7), 2046–54.
- Mollinedo, F., Gajate, C., Martín-Santamaría, S., & Gago, F. (2004). ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem*, 11(24), 3163–84.
- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(5), 577–91.

- Montes, M., Sawhney, C., & Barros, N. (2010). *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis*, 23(5), 500.
- Morales, A., Lee, H., Goñi, F. M., Kolesnick, R., & Fernandez-Checa, J. C. (2007). Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 923–939.
- Mortara, R. A., Andreoli, W. K., Fernandes, M. C. D. C., da Silva, C. V., Fernandes, A. B., L'Abbate, C., & da Silva, S. (2008). Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem*, 47, 101–9.
- Nagayasu, E., Ogura, Y., Itoh, T., Yoshida, A., Chakraborty, G., Hayashi, T., & Maruyama, H. (2013). Transcriptomic analysis of four developmental stages of *strongyloides venezuelensis*. *Parasitol Int*, 62(1), 57–65.
- Navarro, M., Navaza, B., Guionnet, A., & López-Vélez, R. (2012). Chagas disease in Spain: need for further public health measures. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(12), e1962.
- Nieto-Miguel, T., Fonteriz, R. I., Vay, L., Gajate, C., López-Hernández, S., & Mollinedo, F. (2007). Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. *Cancer Res*, 67(21), 10368–78.
- Nogueira, N. F. S., Gonzalez, M. S., Gomes, J. E., de Souza, W., Garcia, E. S., Azambuja, P., Nohara, L. L., Almeida, I. C., Zingales, B., & Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, 116(2), 120–8.
- Olmo, E. D., Diaz-González, R., Escarcena, R., Carvalho, L., Bustos, L. A., Navarro, M., & Feliciano, A. S. (2012). Diamine and aminoalcohol derivatives active against *Trypanosoma brucei*. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(1), 440–3.
- Omura, S. & Crump, A. (2004). The life and times of ivermectin - a success story. *Nat Rev Microbiol*, 2(12), 984–989.
- Park, J.-J., Lee, J. H., Li, Q., Diaz, K., Chang, Y.-T., & Chung, S.-K. (2008). Divergent syntheses of all stereoisomers of phytosphingosine and their use in the construction of a ceramide library. *Bioorg Chem*, 36(5), 220–8.
- Paula, F. M. & Costa-Cruz, J. M. (2011). Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*, 138(11), 1331–1340.
- Pereira, M. E., Zhang, K., Gong, Y., Herrera, E. M., & Ming, M. (1996). Invasive phenotype of *trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect Immun*, 64(9), 3884–92.

- Pérez-Arellano, J., Epinoza, E., Sánchez, M., & Muro, A. (2001). Evasion mechanisms of parasites. *Res Rev Parasitol*, 61, 4–16.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., Gascón, J., Gómez i Prat, J., Portús, M., & Sauleda, S. (2007). Development of a real-time pcr assay for trypanosoma cruzi detection in blood samples. *Acta Trop*, 103(3), 195–200.
- Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J., & Chen, X. (2014). Strongyloidiasis—an insight into its global prevalence and management. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(8), e3018.
- Ramanathan, R., Burbelo, P. D., Groot, S., Iadarola, M. J., Neva, F. A., & Nutman, T. B. (2008). A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of strongyloides stercoralis infection. *J Infect Dis*, 198(3), 444–451.
- Ramanathan, R., Varma, S., Ribeiro, J. M. C., Myers, T. G., Nolan, T. J., Abraham, D., Lok, J. B., & Nutman, T. B. (2011). Microarray-based analysis of differential gene expression between infective and noninfective larvae of strongyloides stercoralis. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e1039.
- Rassi, Jr, A., Dias, J. C. P., Marin-Neto, J. A., & Rassi, A. (2009). Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*, 95(7), 524–34.
- Rassi, Jr, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*, 26(2), 275–91.
- Rassi, Jr, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388–402.
- Ravi, V., Ramachandran, S., Thompson, R. W., Andersen, J. F., & Neva, F. A. (2002). Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (nie) from strongyloides stercoralis l3-stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*, 125(1-2), 73–81.
- Reis-Sobreiro, M., Roué, G., Moros, A., Gajate, C., de la Iglesia-Vicente, J., Colomer, D., & Mollinedo, F. (2013). Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J*, 3, e118.
- Requena-Méndez, A., Albajar-Viñas, P., Angheben, A., Chiodini, P., Gascón, J., Muñoz, J., & Chagas Disease COHEMI Working Group (2014). Health policies to control chagas disease transmission in european countries. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), e3245.

- Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., Gascon, J., & Muñoz, J. (2015). Prevalence of chagas disease in latin-american migrants living in europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(2), e0003540.
- Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E., & Muñoz, J. (2013). The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(1), e2002.
- Rivera, J., Proia, R. L., & Olivera, A. (2008). The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol*, 8(10), 753–63.
- Román-Sánchez, P., Pastor-Guzmán, A., Moreno-Guillén, S., Igual-Adell, R., Suñer-Generoso, S., & Tornero-Estébanez, C. (2003). 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*, 69(3), 336–40.
- Ruano, A. L., López-Abán, J., Fernández-Soto, P., de Melo, A. L., & Muro, A. (2015). Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by strongyloides venezuelensis in mice treated with dexamethasone. *Acta Trop*, 152, 90–95.
- Ruano, A. L., Martín, T., Pardo, J., López-Aban, J., & Muro, A. (2005). Avances en el estudio sobre la estrogiloidosis. *Enf Emerg*, 7(2), 102–9.
- Russell, E. S., Gray, E. B., Marshall, R. E., Davis, S., Beaudoin, A., Handali, S., McAuliffe, I., Davis, C., & Woodhall, D. (2014). Prevalence of strongyloides stercoralis antibodies among a rural appalachian population—kentucky, 2013. *Am J Trop Med Hyg*, 91(5), 1000–1.
- Safer, D., Brenes, M., Dunipace, S., & Schad, G. (2007). Urocanic acid is a major chemoattractant for the skin-penetrating parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. *Proc Natl Acad Sci*, 104(5), 1627–1630.
- Sánchez, P. R., Guzman, A. P., Guillen, S. M., Adell, R. I., Estruch, A. M., Gonzalo, I. N., & Olmos, C. R. (2001). Endemic strongyloidiasis on the spanish mediterranean coast. *QJM*, 94(7), 357–63.
- Sánchez-Blanco, A., Rodríguez-Matellán, A. G., Reis-Sobreiro, M., Sáenz-Narciso, B., Cabello, J., Mohler, W. A., & Mollinedo, F. (2014). *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell Cycle*, 13(21), 3375–89.
- Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., & Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), e2288.



- Schmitz, V., Svensjö, E., Serra, R. R., Teixeira, M. M., & Scharfstein, J. (2009). Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. *J Leukoc Biol*, 85(6), 1005–14.
- Semenova, S. & Rudenskaya, G. (2009). The astacin family of metalloproteinases. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 3(1), 17–32.
- Shariati, F., Pérez-Arellano, J. L., López-Abán, J., El Behairy, A. M., & Muro, A. (2010). Role of angiogenic factors in acute experimental strongyloides venezuelensis infection. *Parasite Immunol*, 32(6), 430–439.
- Shayman, J. A. (2000). Sphingolipids. *Kidney Int*, 58(1), 11–26.
- Shigihara, T., Hashimoto, M., Shindo, N., & Aoki, T. (2008). Transcriptome profile of trypanosoma cruzi-infected cells: simultaneous up- and down-regulation of proliferation inhibitors and promoters. *Parasitol Res*, 102(4), 715–722.
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J., & Sindermann, H. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 38(9), 1266–72.
- Sperling, P. & Heinz, E. (2003). Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1632(1-3), 1–15.
- Steinmann, P., Zhou, X.-N., Du, Z.-W., Jiang, J.-Y., Xiao, S.-H., Wu, Z.-X., Zhou, H., & Utzinger, J. (2008). Tribendimidine and albendazole for treating soil-transmitted helminths, strongyloides stercoralis and taenia spp.: open-label randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(10), e322.
- Stoltzfus, J. D., Minot, S., Berriman, M., Nolan, T. J., & Lok, J. B. (2012). Rnaseq analysis of the parasitic nematode strongyloides stercoralis reveals divergent regulation of canonical dauer pathways. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(10), e1854.
- Sukhavat, K., Morakote, N., Chaiwong, P., & Piangjai, S. (1994). Comparative efficacy of four methods for the detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool specimens. *Ann Trop Med Parasitol*, 88(1), 95–6.
- Sundar, S., Sinha, P., Jha, T. K., Chakravarty, J., Rai, M., Kumar, N., Pandey, K., Narain, M. K., Verma, N., Das, V. N. R., Das, P., Berman, J., & Arana, B. (2013). Oral miltefosine for Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis: a randomised trial. *Trop Med Int Health*, 18(1), 96–100.

- Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K., & Takuwa, N. (2008). Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta*, 1781(9), 483–8.
- Tarleton, R. L. (2007). Immune system recognition of trypanosoma cruzi. *Curr Opin Immunol*, 19(4), 430–434.
- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev*, 24(3), 592–630.
- Teixeira, A. R. L., Nascimento, R. J., & Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in chagas disease—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(5), 463–91.
- Tomlinson, S., De Carvalho, L. P., Vandekerckhove, F., & Nussenzweig, V. (1994). Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J Immunol*, 153(7), 3141–3147.
- Vadlamudi, R. S., Chi, D. S., & Krishnaswamy, G. (2006). Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin Mol Allergy*, 4, 8.
- Valerio, L., Roure, S., Fernández-Rivas, G., Basile, L., Martínez-Cuevas, O., Ballesteros, Á.-L., Ramos, X., Sabrià, M., & , N. M. W. G. o. I. D. (2013). Strongyloides stercoralis, the hidden worm. epidemiological and clinical characteristics of 70 cases diagnosed in the north metropolitan area of barcelona, spain, 2003-2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 107(8), 465–470.
- van Doorn, H. R., Koelewijn, R., Hofwegen, H., Gilis, H., Wetsteyn, J. C. F. M., Wismans, P. J., Sarfati, C., Vervoort, T., & van Gool, T. (2007). Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of strongyloides stercoralis infection in humans. *J Clin Microbiol*, 45(2), 438–42.
- Varela-M, R. E., Mollinedo-Gajate, C., Muro, A., & Mollinedo, F. (2014). The hsp90 inhibitor 17-aag potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine. *Acta Trop*, 131, 32–36.
- Varela-M, R. E., Villa-Pulgarin, J. A., Yepes, E., Müller, I., Modolell, M., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Muskus, C. E., López-Abán, J., Muro, A., Vélez, I. D., & Mollinedo, F. (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.
- Verweij, J. J., Canales, M., Polman, K., Ziem, J., Brienen, E. A. T., Polderman, A. M., & van Lieshout, L. (2009). Molecular diagnosis of

- strongyloides stercoralis in faecal samples using real-time pcr. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103(4), 342–6.
- Vieira, M., Dutra, J. M. F., Carvalho, T. M. U., Cunha-e Silva, N. L., Souto-Padrón, T., & Souza, W. (2002). Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol*, 118(6), 491–500.
- Vijayan, V. K. (2007). How to diagnose and manage common parasitic pneumonias. *Curr Opin Pulm Med*, 13(3), 218–24.
- Viney, M. E. & Lok, J. B. (2007). *Strongyloides* spp. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, (pp.1).
- Viney, M. E. & Lok, J. B. (2015). The biology of strongyloides spp. *WormBook*, (pp. 1–17).
- Watts, M. R., James, G., Sultana, Y., Ginn, A. N., Outhred, A. C., Kong, F., Verweij, J. J., Iredell, J. R., Chen, S. C.-A., & Lee, R. (2014). A loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for strongyloides stercoralis in stool that uses a visual detection method with syto-82 fluorescent dye. *Am J Trop Med Hyg*, 90(2), 306–311.
- World Health Organization (2005). *Report of the Third Global Meeting of the Partners for Parasite Control: Deworming for health and development*. World Health Organization.
- World Health Organization (2008). *The Global Burden of Disease 2004*. World Health Organization.
- Yepes, E., Varela-M, R. E., López-Abán, J., Dakir, E. H., Dakir, E. L. H., Mollinedo, F., & Muro, A. (2014). In vitro and in vivo anti-schistosomal activity of the alkylphospholipid analog edelfosine. *PLoS One*, 9(10), e109431.
- Yepes, E., Varela-M, R. E., López-Abán, J., Rojas-Caraballo, J., Muro, A., & Mollinedo, F. (2015). Inhibition of granulomatous inflammation and prophylactic treatment of schistosomiasis with a combination of edelfosine and praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(7), e0003893.
- Yepes Victoria, E., Moreiro Terroso, M. T., Perez-Arellano, J. L., & Muro Alvarez, A. (2012). Infecciones difícilmente transmisibles VI: Geohelmintosis. *Manual de Enfermedades Importadas*, (pp. 503).
- Zingales, B., Pereira, M. E., Oliveira, R. P., Almeida, K. A., Umezawa, E. S., Souto, R. P., Vargas, N., Cano, M. I., da Silveira, J. F., Nehme, N. S., Morel, C. M., Brener, Z., & Macedo, A. (1997). Trypanosoma cruzi genome project: biological characteristics and molecular typing of clone cl brener. *Acta Trop*, 68(2), 159–173.



## CAPÍTULO 2

---

### HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

---

#### 2.1 HIPÓTESIS

La búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento a los fármacos convencionales que se usan contra enfermedades parasitarias es una necesidad urgente, debido a que los fármacos utilizados actualmente presentan una elevada citotoxicidad, varios efectos adversos y se ha detectado un incremento en la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos. En estudios previos llevados a cabo de forma conjunta entre el Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular (CIETUS), el Departamento de Química Farmacéutica y el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, se han identificado una serie de compuestos que muestran actividad frente a parásitos protozoos y helmintos, entre los que se encuentran derivados de aminoalcanoles, alcanodiaminas y alquilfosfolípidos. La realización de diferentes ensayos a nivel *in vitro* e *in vivo* en un modelo murino determinarán si estos compuestos pueden ser utilizados como alternativas de tratamiento frente a la infección causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y el nematodo *Strongyloides venezuelensis*.

#### 2.2 OBJETIVO GENERAL

Identificación de nuevos compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento de las enfermedades causadas por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y el nematodo *Strongyloides venezuelensis*, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* en modelo murino.

## 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluación *in vitro* de la actividad de aminoalcoholes y diaminas frente a epimastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
2. Valoración *in vitro* de la actividad de aminoalcoholes y diaminas frente a *Strongyloides venezuelensis* y selección de los compuestos más activos para estudios *in vivo* en ratones infectados.
3. Estudio de la actividad de alquilfosfolípidos frente a larvas de tercer estadio de *S. venezuelensis* con la finalidad de seleccionar el producto más activo.
4. Análisis de la eficacia de la edelfosina frente a infecciones experimentales de *S. venezuelensis* en ratones.
5. Estudio de los mecanismos pro-apoptóticos desencadenados por edelfosina frente a larvas de tercer estadio de *S. venezuelensis*.

# CAPÍTULO 3

---

## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

---

### 3.1 Artículo 1

**Trypanocidal activity of long  
chain diamines and  
aminoalcohols**

**Ana L. Legarda-Ceballos**

Esther del Olmo, Julio López-Abán,  
Ricardo Escarcena, Luis A. Bustos,  
Cristina Fonseca-Berzal,  
Alicia Gómez-Barrio,  
Juan C. Dib, Arturo San Feliciano,  
Antonio Muro

En: *Molecules* 2015, 20, 11554-11568  
*doi:10.3390/molecules200611554*





Article

## Trypanocidal Activity of Long Chain Diamines and Aminoalcohols

Ana L. Legarda-Ceballos <sup>1</sup>, Esther del Olmo <sup>2,\*</sup>, Julio López-Abán <sup>1</sup>, Ricardo Escarcena <sup>2</sup>, Luis A. Bustos <sup>3</sup>, Cristina Fonseca-Berzal <sup>4</sup>, Alicia Gómez-Barrio <sup>4</sup>, Juan C. Dib <sup>5</sup>, Arturo San Feliciano <sup>2</sup> and Antonio Muro <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Immunology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain; E-Mails: analegarda@usal.es (A.L.L.-C.); jlaban@usal.es (J.L.-A.); ama@usal.es (A.M.)

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain; E-Mails: ricar@usal.es (R.E.); asf@usal.es (A.S.F.)

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Sciences, Catholic University of the North, 0610-Antofagasta, Chile; E-Mail: luisbustosg@gmail.com

<sup>4</sup> Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid (CEI Campus Moncloa, UCM-UPM & CSIC), 28040-Madrid, Spain; E-Mails: erfonseca@pdi.ucm.es (C.F.-B.); agbarrio@ucm.es (A.G.-B.)

<sup>5</sup> Research Center on Health for the Tropics, (CIST), Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Magdalena, Colombia; E-Mail: juandib@hotmail.com

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: olmo@usal.es; Tel.: +34-923-294-528; Fax: +34-923-294-521.

Academic Editor: Christophe Dardonville

Received: 15 April 2015 / Accepted: 17 June 2015 / Published: 23 June 2015

---

**Abstract:** Thirteen aminoalcohols and eight diamines were obtained and tested against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes strains MG, JEM and CL-B5 clone. Some of them were equal or more potent (1.0–6.6 times) than the reference compound nifurtimox. From them, three aminoalcohols and two diamines were selected for amastigotes assays. Compound **5** was as potent as the reference drug nifurtimox against amastigotes of the CL-B5 strain (IC<sub>50</sub> = 0.6 μM), with a selectivity index of 54.

**Keywords:** aminoalcohols; diamines; *Trypanosoma cruzi*; epimastigotes; amastigotes; cytotoxicity

---

## 1. Introduction

Chagas disease or American trypanosomiasis is a zoonotic infection caused by the hemoflagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Infection is transmitted to humans by bites and concomitant defecation of different triatomine species, which carry the parasite in their contaminated faeces. In endemic areas, the main mode of infection is vectorial, by domestic, peridomestic, or sylvatic triatomines. However, the existence of non-vectorial mechanisms of transmission (*i.e.*, blood transfusion, organ transplant or congenital infection) has contributed in the spread of the disease to non-endemic areas, such as United States, Canada, Japan, Australia or European countries [1,2]. The disease affects millions of people generating health, economic and social problems in the countries affected [3]. It is widespread in Central and South America, affecting 21 countries in these regions. It has been estimated that the disease affects between 9.8 and 11 million people, while 60 million are at risk. This is due to residence in endemic areas and population mobility between Latin-American countries and the rest of the world.

In most patients the infection is asymptomatic or shows mild symptoms. Over a period of decades, 15%–30% of them will develop a chronic stage with cardiac or gastrointestinal clinical manifestations. In addition, Chagas disease is now seen as an opportunistic infection in immunocompromised patients with reactivation syndromes as acute myocarditis or meningoencephalitis [4,5]. The only available drugs for the etiological treatment of Chagas disease, nifurtimox (NFX) and benznidazole (Bz), are very old and cause severe side effects. They produce an average cure rate of 80% in acute cases, and less than 20% in chronic cases. NFX causes gastrointestinal side effects in 30%–70% of patients, irritability, insomnia and mood changes. Bz causes up to 30% mild to moderate dermatitis in adults. Also, digestive, hepatic, peripheral nerve and bone marrow disorders and teratogenicity have been reported. Resistance and cross-resistance to both drugs have also been observed [6–9].

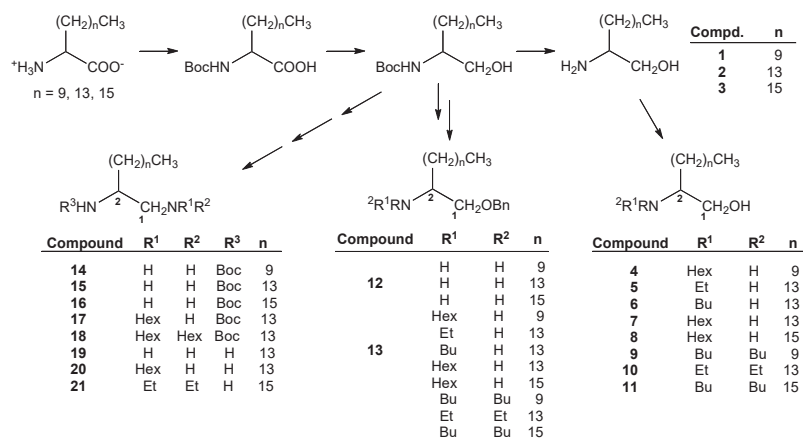
A great number of natural and synthetic compounds have been tested in the past few years as trypanocidal, including drugs uses in the market for the treatment of certain diseases as antiarrhythmics [10] or antifungals [11] among others. Sphingosine is a natural unsaturated C-18 linear aminodiol, which mainly integrates sphingolipids, ceramides and other lipidic metabolites. Sphingosine-1-phosphate has been recognised as a multifunctional physiologic mediator, with roles in regulating cardiogenesis, vascular system formation, oocyte survival and immune cell trafficking. It has also been proposed as an intracellular second messenger [12] and, among other functions, is able to balance and control the levels of sphingolipid metabolites and, consequently, to regulate signalling pathways, determining whether the cell survives or dies. Sphingosine, its metabolites and their derivatives have been considered as target molecules for the design of potential candidates in the development of new drugs [13]. In fact, several reports describe antimicrobial, antiparasitic and other pharmacological properties for linear or substituted aminoalcohols, aminodiols and diamines [14–16].

The CIETUS-Pharmaceutical Chemistry group (PharmChem) has been working on the design, synthesis and biological evaluation of lipidic molecules related to dihydrosphingosine, particularly 2-aminoalkanols and 2-aminocycloalkanols, and has reported some results on their leishmanicidal [17,18], trypanocidal [18,19], and antimycobacterial [20] activities, among others. In the present study the CIETUS-PharmChem and Parasitology groups, in collaboration with the UCM Parasitology group have synthesised and evaluated *in vitro* the activity of some new aminoalcohol and diamine derivatives (Figure 1), with different chain-length and substituents sizes, against epimastigotes and amastigotes of *T. cruzi*. The cytotoxic effect of the compounds on J774.2 mouse macrophages has also been assessed.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemistry

The general procedures for the synthetic preparation of 2-aminoalkan-1-ol (type I compounds) and 1,2-diamine (type II compounds) derivatives were previously reported by the CIETUS-PharmChem group [17,19,20]. All the compounds were obtained and assayed as racemic mixtures. Briefly (Scheme 1), the chemical procedure started with the preparation of three long-chain  $\alpha$ -amino acids with three common but different sizes (2-aminolauric, 2-aminopalmitic and 2-aminostearic acids). The amino group was protected as a *tert*-butyl carbamate (Boc) and the acid group reduced to the corresponding alcohol, through their mixed anhydrides [18].



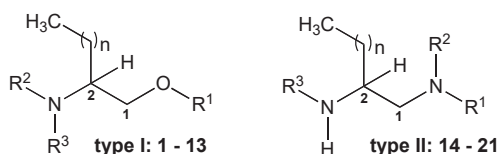
**Scheme 1.** Summary of the synthetic procedure for obtaining type I compounds 1–13 and type II ones 14–21.

On the one hand, the Boc protecting group was removed by treatment with trifluoroacetic acid to give the free amine, compounds 1, 2 and 3. Then, the 2-aminoalkan-1-ols 1, 2 and 3 were alkylated either with ethyl, *n*-butyl or *n*-hexyl bromide in the presence of potassium carbonate to provide the secondary amines, compounds 4–8, or the tertiary amines, compounds 9–11. On the other hand, the primary alcohol of the intermediate Boc-aminoalkanols was converted into a benzyl ether, then the Boc protecting

group removed to give the free amine, which was further alkylated (ethyl, *n*-butyl, *n*-hexyl). Only two benzyl ether compounds (**12** and **13**, Scheme 1) were included in the antiparasitic assays to compare the activity with respect to the free alcohols. 1,2-Diamine derivatives were obtained from the Boc-amino alkanols, by successive conversion of the alcohol group into a mesylate and an azide, whose reduction generated the corresponding *N*<sup>2</sup>-Boc-diamines. Then, the free primary amine at position C-1 was conveniently alkylated (ethyl, *n*-hexyl) to give compounds **14** to **18**. Finally, the removal of the protecting carbamate group by hydrolysis in acidic medium generated the diamines **19** to **21**. All the compounds obtained were conveniently characterized through their IR, MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectral data.

## 2.2. Biological Activity

The antitrypanocidal capacity of the thirteen β-aminoalcohol and eight ethylenediamine derivatives with different chain lengths (lauryl, palmityl and stearyl, *n* = 9, 13 and 15, respectively), was measured with two techniques, the Trypan-Blue and 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenyl-amino)carbonyl]-2*H*-tetrazolium hydroxide (XTT) assay. Concentrations ranging 0.1–70.0 μM were tested as described in experimental section. The activity results expressed as IC<sub>50</sub> (Mean ± SEM) against *T. cruzi* epimastigote strains MG and JEM, are presented in Tables 1 (type I: aminoalcohol derivatives **1**–**13**) and Table 2 (type II: diamine derivatives **14**–**21**). Nifutimox Index (NI) and Selectivity Index (SI) were used to compare with nifutimox activity and macrophage toxicity. The general structures of the compounds are indicated in Figure 1.

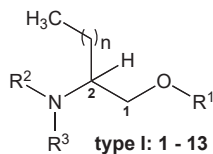


**Figure 1.** General structure of compounds type I and II.

Comparing the aminoalcohols and aminobenzyl ethers (type I) included in Table 1, it can be observed that against the MG strain, compounds **6**, **7** and **1** resulted more potent than NFX and compounds **4**, **5** and **2** appeared as potent as the reference drug. Among them, the least toxic were compounds **6** (SI = 20) and **2** (SI = 3.3). From the comparison of compounds **1**, **2** and **3**, with unsubstituted primary amine and alcohol groups, the *n*-decyl chain (*n* = 9) was deduced as the best for the activity, compound **1** being the most potent (1.5 times NFX) though compound **2** the less toxic (SI = 3.3). Similar comparison and deductions can be made from compounds **4**, **7** and **8** (*n*-hexylated secondary amine and free alcohol group), in this case better activity was found for compound **7**, with an *n*-tetradecyl chain (*n* = 13), unluckily, compound **7** was found to be the most toxic of the three. Interestingly, compound **7** displayed 11 times greater activity on the MG strain (IC<sub>50</sub> = 6 μM) than the JEM strain (IC<sub>50</sub> >70 μM), while conversely the MG strain resulted >40% less susceptible than to NFX the JEM strain (Table 1). The influence of alkylation of the amino group on the trypanocidal activity can be assessed through comparison of the results for the secondary amines of the palmityl series **2**, **5**, **6** and **7** without substitution and

with ethyl, *n*-butyl and *n*-hexyl groups, respectively. As it is observed, within the limited number of substituents checked, the *N*-alkylation increases the trypanocidal potency with the highest influence for the *n*-butyl group, compound **6** is 6.6 times more potent and 1.3 times less toxic than NFX. Among the tertiary amines, compounds **9**, **10** and **11**, only compound **9** (*N,N*-dibutylamine, and *n* = 9) was active, being 0.5 times less potent but at the same time 1.3 times less toxic than NFX. Benzylation of the alcohol function (compounds **12** and **13**) gave less active and more toxic compounds, as can be deduced by comparing compounds **2** (free alcohol) and **12** (benzyl ether).

**Table 1.** *In vitro* activity of aminoalcohol derivatives against epimastigotes of two strains of *Trypanosoma cruzi*.



Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	MG Strain			JEM Strain			Macrophages
					IC <sub>50</sub> (μM)	P <sub>NFX</sub>	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	P <sub>NFX</sub>	SI	LC <sub>50</sub> (μM)
<b>1</b>	H	H	H	9	<b>14.5 ± 3.15</b>	<b>1.5</b>	1.0	33.0 ± 1.70	0.4	0.4	14.0 ± 0.90
<b>2</b>	H	H	H	13	23.7 ± 3.15	0.9	<b>3.3</b>	<b>3.0 ± 1.50 *</b>	<b>4.9</b>	<b>26</b>	<b>77.8 ± 0.35</b>
<b>3</b>	H	H	H	15	46.2 ± 2.50	0.5	0.1	<b>9.9 ± 1.65 *</b>	<b>1.5</b>	0.3	3.0 ± 0.24
<b>4</b>	H	H	Hex	9	<b>21.1 ± 1.25</b>	<b>1.0</b>	1.7	37.2 ± 1.25	0.4	1.0	36.1 ± 2.30
<b>5</b>	H	H	Et	13	<b>21.6 ± 2.95</b>	<b>1.0</b>	2.0	19.3 ± 1.35	0.8	2.3	43.4 ± 0.50
<b>6</b>	H	H	Bu	13	<b>3.2 ± 0.20 *</b>	<b>6.6</b>	<b>20</b>	<b>2.8 ± 0.75 *</b>	<b>5.3</b>	<b>23</b>	<b>63.9 ± 3.50</b>
<b>7</b>	H	H	Hex	13	<b>6.1 ± 0.15 *</b>	<b>3.5</b>	1.3	na	-	-	8.2 ± 1.55
<b>8</b>	H	H	Hex	15	na	-	-	na	-	-	26.0 ± 0.20
<b>9</b>	H	Bu	Bu	9	39.2 ± 0.20	0.5	1.6	50.5 ± 0.70	0.3	1.3	<b>63.7 ± 0.73</b>
<b>10</b>	H	Et	Et	13	na	-	-	na	-	-	5.6 ± 0.27
<b>11</b>	H	Bu	Bu	13	na	-	-	50.3 ± 0.10	0.3	-	nt
<b>12</b>	Bn	H	H	13	34.4 ± 1.80	0.6	0.8	28.8 ± 1.20	0.5	1.0	27.7 ± 0.10
<b>13</b>	Bn	H	Bu	13	na	-	-	na	-	-	nt
<b>NFX</b>					21.2 ± 1.16	1.0	2.3	14.8 ± 1.24	1.0	3.3	49.1 ± 1.15

P<sub>NFX</sub> (potency relative to NFX) = IC<sub>50</sub>-NFX/IC<sub>50</sub>-compound. SI (Selectivity Index): LC<sub>50</sub>-macrophages/IC<sub>50</sub>-epimastigotes. na: >70 μM. Bn: benzyl; Bu: *n*-butyl; Hex: *n*-hexyl; Et: ethyl; \* statistical significance (*p* < 0.05). Results better than those found for NFX are **bold-faced** for easier comparison.

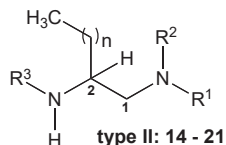
A similar structure activity relationship (SAR) analysis can be performed with the results found against the more sensitive JEM strain for these β-aminoalcohol derivatives. The most remarkable differences lie on the increased potency and selectivity for compound **2** (2-aminohexadecanol, IC<sub>50</sub> = 3.0 μM, NI = 4.9, SI = 26), that approaches the activity of this compound to that of compound **6** (2-butylaminohexadecanol), the most potent compound against both strains. The last showed low-μM IC<sub>50</sub> values of statistical significance (*p* = 0.004), with NI values of 6.6 and 5.3 times more potent than NFX against the MG and JEM strain, respectively, in a dose-dependent manner, and with selectivity indexes SI of 20 or higher, that are substantially better than those found for NFX. In order to complete the SAR analysis for this group of compounds it should be noted that dialkylation of the amino group

(tertiary amines **9**, **10** and **11**) or benzylation of the alcohol function (compounds **12** and **13**) resulted in less potent or even inactive ( $IC_{50} > 70 \mu M$ ) compounds.

The most interesting compounds **2** and **6** are structurally very close, and also recognized as  $\beta$ -aminopalmitol (the reduction product of  $\alpha$ -aminopalmitic acid) and  $\beta$ -(butylamino)palmitol, respectively. Their trypanocidal activity and their lesser toxicity values for macrophages, with SI values substantially better than those found for NFX (2.3 and 3.3 in those experiments performed in this research, Table 1) led to their selection for further research.

The eight diamine derivatives **14** to **21** were also tested *in vitro* against epimastigotes of both MG and JEM strains of *T. cruzi*, and the results are shown in Table 2. Globally, they resulted less potent and selective than the aminoalcohol derivatives discussed above, though several of them attained and surpassed those levels of activity (up to the double for the MG strain by **14**, and to 2.2 times for the JEM strain by **16**) and selectivity (SI = 4.4 on MG for **14** and 3.6 on JEM for **16**) found for NFX. The most potent compounds for both strains were the Boc-monoprotected diamines **14**, **15** and **16**. Related to the influence of the chain size of diamines on the activity, results in Table 2 indicate the same, though softer, tendency as the aminoalcohols against the MG strain. A decrease of trypanocidal potency with the increasing of chain size (NI: 1.5 for the  $C_{18}$ -stearyl derivative **16**, 1.8 for the  $C_{16}$ -palmityl derivative **15**, and 2.0 for the  $C_{12}$ -lauryl compound **14**). The softer influence of the chain size on the activity, in comparison with the case of aminoalcohols, could be associated to the presence of the Boc-protector, which through its electron-attracting carbamate function would modulate, disturb or even prevent the interaction of the amino group at C-2 with the target molecule in the parasite. On the other hand, it must be noted that this not certain in the case of the JEM strain, where the best trypanocidal response is observed for the  $C_{18}$ -stearyl derivative **16** (2.2 times more active than NFX). Respecting the influence of the Boc-carbamate group attached to the  $N^2$  atom, the comparison of results found for the Boc-compounds **15** and **17** (NI: 1.8 and 0.8 for MG; 0.7 and 0.5 for JEM strains, respectively) with those for the unprotected compounds **19** and **20** (NI: 1.1 and 0.6 for MG; 0.6 and 0.3 for JEM strains, respectively), all of them with the same palmityl chain size, allows to recommend the presence of the Boc-carbamate or a similar group to reinforce the activity of diamines. Finally, related to the effect of amine alkylation, and due to the predominant presence of the Boc-protecting group at  $N^2$ , only mono and dialkylation on  $N^1$  is being considered. Dialkylation was clearly negative, as can be observed for the tertiary dihexylamine **18** ( $IC_{50} > 70 \mu M$  against both strains) and for the diethylamino analogue **20** ( $IC_{50} = 42.2 \mu M$  against MG and  $>70 \mu M$  against JEM). Similarly, the effect of monoalkylation can be deduced as negative, from comparison of the compounds pairs **15** vs. **17** and **19** vs. **20** with the same palmityl chain. As a consequence, along with the presence of the Boc group at  $N^2$ , the nature of primary amine at C-1, was recommended for a higher trypanocidal activity in this type of compounds. Accordingly, those Boc-diamines **14** and **15**, displaying the highest  $P_{NFX}$  values against the less sensitive MG strain, and the aminoalcohol derivatives **2**, **5** and **6** were selected for further evaluation.

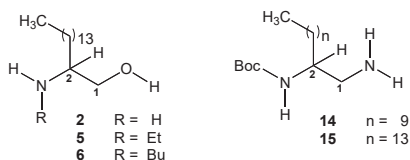
The five compounds were then evaluated against epimastigotes and amastigotes of *T. cruzi* (CL Brener strain clone B5, CL-B5) and the trypanocidal activity results based in  $\beta$ -galactosidase activity are shown in Table 3.  $P_{NFX}$  also used to compare compound potency with nifurtimox. Cytotoxicity assays on NCTC-929 fibroblasts cells were also performed.

**Table 2.** *In vitro* activity of diamine derivatives against epimastigotes of two strains of *Trypanosoma cruzi*.

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	MG Strain			JEM Strain			Macrophages
					IC <sub>50</sub> (μM)	P <sub>NFX</sub>	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	P <sub>NFX</sub>	SI	LC <sub>50</sub> (μM)
14	H	H	Boc	9	<b>10.8 ± 0.0 *</b>	<b>2.0</b>	<b>4.4</b>	<b>14.5 ± 0.05</b>	<b>1.0</b>	<b>3.3</b>	<b>47.1 ± 0.35</b>
15	H	H	Boc	13	<b>12.0 ± 2.15</b>	<b>1.8</b>	<b>4.0</b>	20.4 ± 0.30	0.7	2.4	<b>48.1 ± 0.15</b>
16	H	H	Boc	15	<b>13.9 ± 1.00</b>	<b>1.5</b>	1.7	<b>6.7 ± 2.10</b>	<b>2.2</b>	<b>3.6</b>	24.1 ± 0.20
17	Hex	H	Boc	13	26.7 ± 0.25	0.8	0.2	30.6 ± 0.65	0.5	0.1	4.2 ± 0.05
18	Hex	Hex	Boc	13	na	-	-	na	-	-	nt
19	H	H	H	13	<b>19.2 ± 2.90</b>	<b>1.1</b>	<b>4.1</b>	26.6 ± 0.70	0.6	2.9	<b>78.1 ± 0.85</b>
20	Hex	H	H	13	32.9 ± 1.25	0.6	0.2	48.8 ± 1.05	0.3	0.1	5.0 ± 0.10
21	Et	Et	H	13	42.2 ± 1.4	0.5	0.2	na	-	-	9.3 ± 0.50
NFX					21.2 ± 1.16	1.0	2.3	14.8 ± 1.24	1.0	3.3	49.1 ± 1.15

P<sub>NFX</sub> (potency relative to NFX) = IC<sub>50</sub>-NFX/IC<sub>50</sub>-compound. SI (Selectivity Index): LC<sub>50</sub>-macrophages/IC<sub>50</sub>-epimastigotes. na: >70 μM. nt: Non tested. Boc: *t*-butoxycarbonyl; Hex: *n*-hexyl; Et: ethyl; \* statistical significance (*p* < 0.05). Results better than those found for NFX are **bold-faced** for easier comparisons.

All the compounds were more potent than NFX against the epimastigote form with P<sub>NFX</sub> values ranging from 2.5 to 4.3, whereas only the aminoalcohol **5** attained the potency of NFX against amastigotes.

**Table 3.** *In vitro* activity against epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* CL-B5 clone and NCTC-929 cytotoxicity values of selected aminoalcohol and diamine derivatives.

Compound	Epimastigotes CL-B5 Clone			Amastigotes CL-B5 Clone			Cytotoxicity NCTC-929
	IC <sub>50</sub> (μM)	P <sub>NFX</sub>	SI	IC <sub>50</sub> (μM)	P <sub>NFX</sub>	SI	LC <sub>50</sub> (μM)
2	<b>3.5 ± 0.01 *</b>	<b>3.0</b>	7.2	1.8 ± 0.12	0.3	14.0	25.2 ± 0.12
5	<b>3.3 ± 0.10 *</b>	<b>3.1</b>	9.8	<b>0.6 ± 0.25</b>	<b>1.0</b>	<b>54.0</b>	32.4 ± 0.02
6	<b>4.2 ± 0.52 *</b>	<b>2.5</b>	<b>22.7</b>	2.0 ± 0.27	0.3	<b>47.8</b>	95.6 ± 1.19
14	<b>2.5 ± 0.03 *</b>	<b>4.2</b>	11.8	3.0 ± 0.21	0.2	9.9	29.6 ± 0.01
15	<b>2.4 ± 0.01 *</b>	<b>4.3</b>	10.6	2.6 ± 0.23	0.2	9.8	25.6 ± 0.06
NFX	10.4 ± 1.3	1.0	6.7	0.6 ± 0.01	1.00	116.0	69.6 ± 0.17

Nifurtimox Index (NI): nifurtimox IC<sub>50</sub>/compound IC<sub>50</sub>. Selectivity Index (SI): NCTC-29 IC<sub>50</sub>/epimastigote or amastigotes IC<sub>50</sub>. \* statistical significance (*p* < 0.05). Most significant values of potency and/or selectivity are **bold faced**.

Moreover, the aminoalcohols **2**, **5** and **6** resulted more active on the intracellular parasite than over the extracellular one, especially compound **5** ( $IC_{50} = 3.3 \mu\text{M}$  in epimastigotes vs.  $IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$  in amastigotes), as potent as the reference drug NFX. As for cytotoxicity, compound **6** was less toxic than NFX, while compounds **2**, **5**, **14** and **15** were slightly more toxic (2.1–2.7) than NFX on NCTC-929 fibroblasts cells (Table 3). Compound **5** was as potent as NFX on amastigotes but displayed twice the toxicity on NCTC-929 fibroblasts. The structure of compound **5**, in comparison with compound **6**, the most potent aminoalcohol in Table 1, indicates the convenience of the smaller ethyl group, rather than the butyl, attached to the amino group at C-2. The diamine derivatives, compounds **14** and **15**, against amastigotes were less potent than its aminoalcohol analogues.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. General Information

All commercial chemicals, reagents and solvents used were reagent grade. Flash column chromatography was done using Merck Silica Gel 60 (0.04–0.063 mm). Reactions were monitored by TLC using Merck 60F<sub>254</sub> silica gel plates. Compounds were detected visually under UV irradiation (254 nm) and by spraying with sulfuric acid and phosphomolybdic acid reagents followed by heating at 100 °C. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra were obtained with a Bruker AC 200 spectrometer (200 and 50.3 MHz, respectively). Chemical shifts were recorded in parts per million (ppm,  $\delta$ ) and were re-reported relative to the solvent peak or TMS. High resolution mass spectra (HRMS) were measured with a QSTAR XL quadrupole time-of-flight mass spectrometer, by direct injection on the sample dissolved in MeOH and Ionization voltage of 5500 V. Infrared (IR) spectra were measured on a Nicolet Impact 410 spectrophotometer. The biological material was maintained in culture medium until use. Fetal calf serum (FCS), Basal Medium Eagle (BME) without phenol-red, Dulbecco's modified essential medium (DMEM), hemin, gentamycin, EDTA-trypsin, dimethyl sulfoxide (DMSO), XTT and trypan blue 0.4% were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Glutamine, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100  $\mu\text{g/mL}$  and phosphate-buffered saline solution (PBS) were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Forty-eight-well plates and 96-well flat bottomed plates were purchased from Costar (Corning Corp, Cambridge, UK).  $\beta$ -Galactosidase substrate chlorophenol  $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) were purchased from Roche Life Sciences (Indianapolis, IN, USA). Triton X-100 was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Liver-infusion broth and tryptose broth (LIT) growth medium were purchased from Difco (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Nifutimox (Lampit) was provided by Bayer (Leverkusen, Germany). The results were acquired from each test well using ELISA reader Ear400FT spectrophotometer (STL Lab Instruments, Groding, Austria).

#### 3.2. Chemistry

The general method for the preparation of 2-aminoalkan-1-ol (type I compound) and 1,2-diamine (type II compound) derivatives was previously reported by the CIETUS-PharmChem group [11,19,20] and is indicated in Scheme 1. All the compounds were obtained and assayed as racemic mixtures. Here will describe the last step for obtaining compounds **2**, **5**, **6**, **14** and **15**.



### 3.2.1. 2-Aminohexadecanol (2)

Compound **2** was obtained from 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]hexadecanol by removal of the *tert*-butoxycarbonyl protecting group by treatment with trifluoroacetic acid. 2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]hexadecanol (300 mg, 0.84 mmol) was dissolved in a solution of 50% trifluoroacetic acid in dichloromethane (10 mL) and the mixture then maintained 4 h at 0 °C under stirring. Reaction progress was controlled by TLC. Then, 6 M NaOH was added to neutral pH and the mixture was extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic layer was washed with water and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under vacuum to give 186 mg (93%) of **2** as a white solid, m.p. = 66–67 °C; IR: 3420, 3368, 2922, 2852, 1568, 1477, 1388, 1079 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.5 Hz, H-16), 1.25 (26H, br s), 2.78 (1H, m, H-2), 3.24 (1H, dd, *J* = 10.4; 7.5 Hz, H-1a), 3.54 (1H, dd, *J* = 10.4; 3.6 Hz, H-1b); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.1, 22.7, 26.2, 29.4, 29.6 (7C), 32.0, 34.1, 52.8, 65.7; HRMS (ESI<sup>+</sup>) for C<sub>16</sub>H<sub>36</sub>NO [M + H]<sup>+</sup>: calcd: 258.2797; found: 258.2801.

### 3.2.2. 2-(Ethylamino)hexadecanol (5)

2-Aminohexadecan-1-ol (50 mg, 0.19 mmol) was added to a suspension of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (52 mg, 0.19 mmol) in DMF (2 mL) at room temperature under stirring, and the mixture was stirred for another 15 min. Then, ethyl bromide (28 µL; 0.38 mmol) was added and the mixture maintained for 15 h at room temperature. Reaction progress was controlled by TLC. Ethyl acetate (40 mL) was added, and the organic layer washed with water to neutral pH. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent removed under vacuum to give a crude that was purified by column chromatography with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (9:1), to give 34 mg (58%) of the corresponding tertiary amine and 23 mg (40%) of **5** as a white solid, m.p. = 66–67 °C; IR: 3322, 2922, 2847, 1460, 1379, 1128, 1078 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.85 (3H, t, *J* = 6.5 Hz, H-16), 1.10 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-2'), 1.22 (26H, br s), 2.63 (2H, m, H-1'), 3.11 (1H, m, H-2), 3.29 (1H, dd, *J* = 11.0; 6.5 Hz, H-1a); 3.61 (1H, dd, *J* = 11.0; 4.0 Hz, H-1b); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.1, 15.2, 22.7, 26.2, 29.7 (9C), 31.3, 32.0, 41.2, 59.0, 62.7; HRMS (ESI<sup>+</sup>) for C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>NO [M + H]<sup>+</sup>: calcd: 286.5163; found: 286.5148.

### 3.2.3. 2-(Butylamino)hexadecanol (6)

2-Aminohexadecan-1-ol (200 mg, 0.99 mmol) was added to a suspension of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (273 mg, 1.98 mmol) in DMF (3 mL), and the mixture stirred for 15 min. Then, butyl bromide (217 µL, 1.98 mmol) was added and the mixture maintained 15 h at room temperature. Reaction progress was monitored by TLC. The reaction was worked up as mentioned above for compound **5**, to give 140 mg (54%) of the corresponding tertiary amine and 23 mg (39%) of **6** as a white solid, m.p. = 54–55 °C; IR: 3431, 3292, 2922, 2848, 1465, 1374, 1063 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-16), 0.91 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-4'), 1.25 (26H, br s), 2.54 (2H, m, H-1'), 2.68 (1H, m, H-2), 3.27 (1H, dd, *J* = 10.4; 6.4 Hz, H-1a); 3.62 (1H, dd, *J* = 10.4; 3.9 Hz, H-1b); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.0, 14.2, 20.5, 22.7, 26.3, 29.3, 29.7 (8C), 31.5, 32.0, 32.4, 46.5, 59.1, 62.8; HRMS (ESI<sup>+</sup>) for C<sub>20</sub>H<sub>44</sub>NO [M + H]<sup>+</sup>: calcd: 314.3423; found: 314.3417.

### 3.2.4. 2-(*tert*-Butoxycarbonyl)-dodecan-1,2-diamine (**14**)

2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]dodecanol (500 mg, 1.66 mmol) was dissolved in dichloromethane (3 mL) and the solution maintained at 0 °C under stirring. Then, triethylamine (448 µL, 1.66 mmol) and mesyl chloride (448 µL, 1.66 mmol) were added and the mixture kept at 0 °C for 30 min, followed by 30 min a room temperature. Reaction progress was followed by TLC. After that, dichloromethane (80 mL) was added and the organic layer washed with saturated sodium chloride, 2 N HCl and water solutions to neutral pH. The organic layer dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to provide 673 mg (99%) of the mesylate derivative. The obtained mesylate derivative was dissolved in dimethyl formamide (DMF, 5 mL) and sodium azide (335 mg, 5.30 mmol) was added under stirring. The mixture was heated at 50–60 °C for 6 h. DMF was removed under high pressure and the resulting residue redissolved in ethyl acetate (100 mL) and washed with water. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to provide 900 mg of a crude product that was purified by column chromatography to provide 710 mg (65%) of the azido derivative. The obtained azido derivative was dissolved in dry tetrahydrofuran (THF, 4 mL) and NaBH<sub>4</sub> (125 mg, 1.00 mmol) was added, followed by the addition of methanol (30 mL, dropwise from an addition funnel) for 30 min, under stirring. Then, ethyl acetate (100 mL) was added and the organic layer washed with water, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to provide 660 mg of a crude that was purified by column chromatography to provide 236 mg (76%) of **14** as an oil with the following properties: IR: 3362, 2925, 2855, 1689, 1524, 1388, 1367, 1250, 1173, 1054, 894 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-12), 1.25 (18H, br s), 1.44 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.61 (1H, dd, *J* = 12.9; 6.8 Hz, H-1a), 2.78 (1H, dd, *J* = 12.9; 4.3 Hz, H-1a), 3.52 (1H, m, H-2), 4.53 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, NH); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.1, 22.7, 26.0, 28.4, 29.4, 29.6, 30.5, 31.9, 32.9, 46.2, 53.2, 79.1, 156.1; HRMS (ESI<sup>+</sup>) for C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: calcd. 323.2674; found. 323.2651.

### 3.2.5. 2-(*tert*-Butoxycarbonyl)-hexadecan-1,2-diamine (**15**)

Compound **15** was obtained by applying the same procedure. Starting from 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-hexadecanol (1.00 g) 578 mg (56% global yield) of **15** was obtained as a white solid with m.p. = 45–46 °C; IR: 3375; 2922; 2852; 1709; 1547; 1386; 1367; 1176; 1052; 893 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-12), 1.24 (26H, br s), 1.44 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.60 (1H, dd, *J* = 12.8; 6.8 Hz, H-1a), 2.76 (1H, dd, *J* = 12.8; 4.6 Hz, H-1a), 3.49 (1H, m, H-2), 4.52 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, NH); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.2, 22.7, 26.0, 28.4, 29.4, 29.7, 31.7, 33.0, 46.2, 53.2, 79.5, 156.1; HRMS (ESI<sup>+</sup>) for C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: calcd. 379.3300; found. 379.3295.

## 3.3. In Vitro Assays

### 3.3.1. Parasite Strains, Culture and Assays Procedures

For *in vitro* studies, the strains MHOM/CO/04/MG (MG), MHOM/CO/05/JEM (JEM) and CL Brener strain clone B5 (CL-B5) were used. The MG and JEM strains correspond to Group I and Haplotype Ia isolates from two Colombian patients in the acute phase [21], and CL-B5 is a strain stably transfected with *Escherichia coli* β-galactosidase gene (*lacZ*) [22]. Epimastigotes were grown in plastic culture

flasks at 28 °C, in axenic liver-infusion tryptose (LIT) growth medium, supplemented with 10% heat inactivated (30 min at 56 °C) foetal calf serum (FCS; Sigma), 25 mg/mL hemin (Sigma), and 10 µg/mL gentamycin (Sigma) and harvested in the exponential phase for conducting the experiments. Cultures were continuously maintained in logarithmic growth by weekly passages.

For the anti-amastigote assays, axenic cultures of epimastigotes reaching their stationary phase of growth (14 day-old cultures) were used to infect non-confluent monolayers of NCTC-929 fibroblasts to obtain tissue culture derived trypomastigotes (TCT). After 24 h at 33 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, the infected cultures were washed with phosphate buffer saline (PBS) to removed non-penetrated epimastigotes. TCT were harvested from the supernatant of the cultures after one week of incubation in these conditions of temperature and humidity.

### 3.3.2. Macrophage and Fibroblast Cultures

The mouse cell lines J774.2 macrophages and NCTC clone 929 fibroblasts were used and cultured in plastic culture flasks. J774.2 and NCTC-929 cells were grown using DMEM and BME without phenol-red, respectively. Both media were supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and subpassaged once a week. Cells in the pre-confluence phase were harvested with an EDTA-trypsin solution for the experiments.

### 3.3.3. Epimastigote Susceptibility Assay

Three different strains of *T. cruzi* were used for the primary screening on epimastigote forms. For strains MG and JEM, the screening assay was performed with approximately  $1 \times 10^5$  epimastigotes in logarithmic growth phase in 200 µL of supplemented LIT medium per well in 96-well flat bottomed plates (Costar, Corning, Cornig, NY, USA). Stock solutions of the compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Panreac) to obtain final concentrations of 0.1, 0.5, 3.3, 15.0, 35.0 and 70.0 µM and the concentration of DMSO in cultures was always lower than 0.2% (v/v). Mortality control with the reference drug nifurtimox (Bayer) was included in the assay. The plates were incubated for 72 h at 28 °C and all experimental conditions were evaluated in triplicate in three independent experiments. The epimastigote growth inhibition was microscopically determined by the Trypan Blue dye exclusion assay and XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide). Regarding the first method, an aliquot from every culture was suspended in 0.4% trypan blue solution for 5 min and cell viability was determined under microscope by counting live parasites in each condition in a Neubauer chamber [23]. Anti-epimastigote activity percentage was calculated as  $(\text{Parasite counts in control wells} - \text{Parasite counts in experimental wells}) \times 100 / \text{Parasite counts in control wells}$ . Trypanocidal activity over both strains was also measured adding 50 µL of XTT solution per well to obtain a final concentration of 0.3 mg/mL. The plate was re-incubated 24 h in the dark at 37 °C and orange formazan solution formed, was spectrophotometrically quantified at 450 nm with a 630 nm reference filter, using an Ear400FT ELISA reader.

Trypanocidal activity against CL-B5 strain was also assessed by measuring β-galactosidase activity. Briefly, log-phase epimastigotes were seeded in 96-well microplates at a density of  $2.5 \times 10^5$  parasites/mL in a final volume of 200 µL/well and incubated within the compounds for 72 h at 28 °C. Afterwards,

50  $\mu\text{L}$  of the  $\beta$ -galactosidase substrate chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG, Roche) in 0.9% Triton X-100 (Panreac) solution were added to each well (200  $\mu\text{M}$ , pH 7.4) and the plates incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h. Anti-epimastigote activity was estimated by reading absorbance at 595 nm. Each concentration was assayed by triplicate, in three independent experiments. The reference drug nifurtimox (Lampit) was also tested. In all spectrophotometric assays, anti-epimastigote activity percentages were calculated as  $(\text{OD control wells} - \text{OD experimental wells}) \times 100 / \text{OD control wells}$ .

The antiparasitic activity of compounds **1–21** was expressed as the concentration that inhibited 50% of parasites ( $\text{IC}_{50}$ ) and it was calculated by sigmoidal regression analysis [24]. The trypanocidal activity of those assayed compounds was compared to that of NFX using the Nifurtimox Index ( $\text{NI} = \text{nifurtimox IC}_{50} / \text{compound IC}_{50}$ ). Furthermore the Selectivity Index ( $\text{SI} = \text{mammalian cell LC}_{50} / \text{epimastigote IC}_{50}$ ) for each compound was calculated to compare the antiprotozoal activity with its respective mammalian cell cytotoxicity. Compounds with trypanocidal activity comparable or better than nifurtimox against MG or JEM strains were confirmed in CL-B5 epimastigote and amastigote susceptibility assays. Compounds with  $\text{IC}_{50} > 70 \mu\text{M}$  were considered not active (na).

#### 3.3.4. Amastigote Susceptibility Assay

For this assay, 120  $\mu\text{L}$  of BME containing 10,000 NCTC-929 fibroblasts/well were seeded in 48-well plates (Costar) and after their attachment, infected with TCT obtained as above in a 1:6 cell-parasite ratio. The plates were incubated at 33  $^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  overnight and after the infection, experimental wells were washed with PBS to eliminate non-penetrated TCT. Solutions of each compound and nifurtimox were added in fresh medium (final concentrations of 0.1–70.0  $\mu\text{M}$ ) in a final volume of 450  $\mu\text{L}$ /well and incubated for 7 days in similar conditions of temperature and humidity. All experimental conditions were evaluated by triplicate in three independent experiments and nifurtimox was tested in parallel. Then, 50  $\mu\text{L}$  of a CPRG solution in 3% Triton X-100 (pH 7.4) were added to each well in a final concentration of 400  $\mu\text{M}$  and the plates incubated 3 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Finally, anti-amastigote activity was estimated by reading absorbance at 595 nm in a plate reader (Infinite 200, Tecan) and calculated as in Fonseca-Berzal *et al.* [25].  $\text{IC}_{50}$  and NI indexes were calculated as above.

#### 3.3.5. Cytotoxicity Assays

Unspecific cytotoxicity was evaluated over phagocytic macrophages J774.2 cell line. To study cytotoxicity on J774.2 cells, 200  $\mu\text{L}$  of a suspension of  $2 \times 10^5$  macrophages/mL were added to 96 well flat-bottom microplates (Sigma). Cells were allowed to attach for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  and then exposed to the compounds for 72 h at the same concentrations as used for drug screening. A solution of 0.2% DMSO and nifurtimox ranging 0.1–70  $\mu\text{M}$  were used as controls [26]. Each concentration was assayed by triplicate, in independent experiments. Cytotoxicity was assessed by the Trypan Blue and XTT techniques and  $\text{LC}_{50}$  was calculated as described above.

NCTC-929 cells were placed in triplicate in 96-well microtitre plates at  $15 \times 10^3$  cells per well in 100  $\mu\text{L}$  of MEM supplemented with FBS and antibiotics. The cells were grown overnight at 37  $^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Thereafter, the medium was removed and the compounds were added in 200  $\mu\text{L}$  of medium and plates were incubated 48 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . After incubation, 20  $\mu\text{L}$  of 2 mM resazurin (Sigma) solution was added to each well. The plates were incubated for 3 h and metabolic activity was measured

by fluorimetric readings taken in a plate fluorometer (Infinite 200, TECAN, Mannedorf, Switzerland) at  $\lambda$ excitation 535 nm and  $\lambda$ emission 590 nm, according to the Alamar blue<sup>®</sup> Assay. LC<sub>50</sub> was calculated for each compound and NFX.

### 3.3.6. Statistical Analysis

The results were expressed as mean and standard error of mean (SEM). Normal distribution of data was studied by the non-parametric Kolmogorov-Smirnov test. Significant differences between groups were found using Kruskal-Wallis test or one-way ANOVA test and Tukey's honest significance test (HSD). All statistical analyses were considered significant at the  $p < 0.05$  level. IC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values were calculated by plotting drug concentration vs. antiepipmastigote or anti-amastigote activities.

## 4. Conclusions

In summary, the aminoalcohols **1**, **6** and **7** (IC<sub>50</sub> = 14.5, 3.2 and 6.1  $\mu$ M, respectively) and the diamines **14**, **15**, **16** and **19** (IC<sub>50</sub> = 10.8, 12.0 and 13.9  $\mu$ M and 19.2  $\mu$ M, respectively) were more potent than NFX against epimastigotes of the MG strain of *T. cruzi*, while against the JEM strain the aminoalcohols **2**, **3** and **6** (IC<sub>50</sub> = 3.0, 9.9 and 2.8  $\mu$ M, respectively) and the diamines **14** and **16**, (IC<sub>50</sub> values of 14.5 and 6.7  $\mu$ M, respectively) were more effective. Our data support the difference in the susceptibility of MG, JEM strains (both Colombian strains DTU I) for compounds **2** and **6** but did not show so significant difference in susceptibility to NFX. A recent study described large variations in the response to ergosterol biosynthesis inhibitors *in vitro* assays against a panel of *T. cruzi* strains and clones belonging to different genetic lineages; in contrast, Bz and NFX did not differ significantly in their efficacy against the same panel of strains and clones [27]. Nevertheless, the available evidence supports the proposition that assessing the activity of new compounds against a representative panel of strains is essential. Therefore the aminoalcohol **6** resulted more effective and less toxic than NFX for both strains. Compounds **2**, **5**, **6**, **14** and **15** were more potent than NFX against epimastigotes of the CL-B5 strain, and compound **5** was as potent as NFX against amastigotes of the CL-B5 strain (IC<sub>50</sub> = 0.6  $\mu$ M), with a selectivity index of 54. This preliminary study introduces aminoalcohols and diamines as suitable templates for the design of new antichagasic prototypes. However, further *in vivo* studies on murine Chagas models need to be conducted in order to confirm the outcomes achieved *in vitro*.

## Acknowledgments

Financial support came from JCyL-Spain (SA221U13), ISCIII-FIS (RICET: RD12/0018/0002) y FIS (PI 060782). JCD stage was supported by Salamanca University. C.F.-B acknowledges Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM & CSIC) for a PICATA predoctoral fellowship.

## Author Contributions

The work presented in this article was made possible thanks to the collaboration between five research groups. E.O. and A.S.F. have designed the compounds of the study; R.E. and L.A.B. have synthesized and characterized the compounds tested. J.C.D.; A.M. and A.G.-B. have designed the biological experiments; A.L.L.-C.; J.C.D.; J.L.-A.; C.F.-B. and A.G.-B. have performed the *in vitro* *T. cruzi* assays.

E.O.; A.S.F.; J.L.-A. and A.G.-B. have analyzed all the obtained data and have written the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Coura, J.R.; Viñas, P.A. Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature* **2010**, *465*, S6–S7.
2. Teixeira, D.E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P.H.; de Souza, W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1749.
3. World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, Fact Sheet No 340. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed on 16 April 2015).
4. Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A. Chagas disease. *Lancet* **2010**, *375*, 1388–1402.
5. Pérez-Molina, J.A.; Rodríguez-Guardado, A.; Soriano, A.; Pinazo, M.J.; Carrilero, B.; García-Rodríguez, M.; Salas, J.; Torrús, D.; Soler-Ferrer, C.; Puente, S.; *et al.* Guidelines on the treatment of chronic coinfection by *Trypanosoma cruzi* and HIV outside endemic areas. *HIV Clin. Trials* **2011**, *12*, 287–298.
6. Bern, C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr. Opin Infect Dis.* **2012**, *25*, 450–457.
7. Coura, J.R.; Borges-Pereira, J. What is known and what should be improved: A systemic review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2012**, *45*, 286–296.
8. Matta Guedes, P.M.; Gutierrez, F.R.; Nascimento, M.S.; Do-Valle-Matta, M.A.; Silva, J.S. Antiparasitological chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. *Trop. Med. Int. Health* **2012**, *17*, 1057–1065.
9. Sosa-Estani, S.; Cura, E.; Velazquez, E.; Yampotis, C.; Segura, E.L. Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2009**, *42*, 484–487.
10. Benaim, G.; Paniz Mondolfi, A.E. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2012**, *9*, 605–609.
11. Urbina, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* **2010**, *115*, 55–68.
12. Spiegel, S.; Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: Signaling inside and out. *FEBS Lett.* **2000**, *476*, 55–57.
13. Kester, M.; Kolesnick, R. Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol. Res.* **2003**, *47*, 365–371.
14. Lauer, S.A.; Ghori, N.; Haldar, K. Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9181–9185.
15. Howarth, J.; Lloyd, D.G. Simple 1,2-aminoalcohols as strain-specific antimalarial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 625–628.
16. Calas, M.; Ancelin, M.L.; Cordina, G.; Portefaix, P.; Piquet, G.; Vidal-Sailhan, V.; Vial, H. Antimalarial activity of compounds interfering with *Plasmodium falciparum* phospholipid metabolism: Comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 505–516.

17. Del Olmo, E.; Alves, M.; López, J.L.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Rojas de Arias, A.; San Feliciano, A. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 659–662.
18. Rebollo, O.; del Olmo, E.; Ruiz, G.; López-Pérez, J.L.; Giménez, A.; San Feliciano, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of 2-aminocyclohexanol and 1,2-cyclohexanediamine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 184–187.
19. Del Olmo, E.; Diaz-Gonzalez, R.; Escarcena, R.; Carvalho, L.; Bustos, L.A.; Navarro, M.; Feliciano, A.S. Diamine and aminoalcohol derivatives active against *Trypanosoma brucei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 440–443.
20. Del Olmo, E.; Molina-Salinas, G.M.; Escarcena, R.; Alves, M.; Lopez-Perez, J.L.; Hernandez-Pando, R.; Said-Fernandez, S.; Feliciano, A.S. Simple dihydrosphyngosine analogues with potent activity against MDR-Myco bacterium tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5764–5768.
21. Ramirez, J.D.; Duque, M.C.; Guhl, F. Phylogenetic reconstruction based on Cytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. *Acta Trop.* **2011**, *119*, 61–65.
22. Buckner, F.S.; Verlinde, C.L.; la Flamme, A.C.; van Voorhis, W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2592–2597.
23. Tran, S.L.; Puhar, A.; Ngo-Camus, M.; Ramarao, N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22876.
24. Gomez-Ayala, S.; Castrillón, J.A.; Palma, A.; Leal, S.M.; Escobar, P.; Bahsas, A. Synthesis, structural elucidation and *in vitro* antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-benzazepine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4721–4739.
25. Fonseca-Berzal, C.; Escario, J.A.; Arán, V.J.; Gómez-Barrio, A. Further insights into biological evaluation of new anti-*Trypanosoma cruzi* 5-nitroindazoles. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1049–1056.
26. Muelas-Serrano, S.; Le-Senne, A.; Fernandez-Portillo, C.; Nogal, J.J.; Ochoa, C.; Gomez-Barrio, A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 553–557.
27. Moraes, C.B.; Giardini, M.; Kim, H.; Franco, C.H.; Araujo-Junior, A.M.; Schenkman, S.; Chatelain, E.; Freitas-Junior, L.H. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4703–4714.

*Sample Availability:* Samples of the reported compounds are available from the authors.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





## 3.2 Artículo 2

*In vitro* and *in vivo* evaluation  
of 2-aminoalkanol and  
1,2-alkanediamine derivatives  
against *Strongyloides*  
*venezuelensis*

**Ana L. Legarda-Ceballos**

Julio López-Abán, Esther del Olmo,  
Ricardo Escarcena, Luis A. Bustos,  
Jose Rojas-Caraballo,  
Belén Vicente, Pedro Fernández-Soto,  
Arturo San Feliciano, Antonio Muro

En: *Parasites & Vectors*:

*Manuscript Number*:

*PARV-D-16-00084R1*

*doi 10.1186/s13071-016-1648-5*



RESEARCH

Open Access

# In vitro and in vivo evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*

Ana L. Legarda-Ceballos<sup>1</sup>, Julio López-Abán<sup>1\*</sup>, Esther del Olmo<sup>2</sup>, Ricardo Escarcena<sup>2</sup>, Luis A. Bustos<sup>2,3</sup>, Jose Rojas-Caraballo<sup>1,4,5</sup>, Belén Vicente<sup>1</sup>, Pedro Fernández-Soto<sup>1</sup>, Arturo San Feliciano<sup>2</sup> and Antonio Muro<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Strongyloidiasis is a parasitic disease widely present in tropical and subtropical areas. *Strongyloides stercoralis* represents the main species that infects human beings. Ivermectin is the current drug of choice; however, issues related with treatment failure in patients with diabetes or infected with T-lymphotropic virus-1 make the identification of new molecules for alternative treatment a priority. In the present study, the activity of sphingosine-related aminoalcohol and diamine were evaluated against *Strongyloides venezuelensis* third-stage larva (L3) cultures and experimental infections in mice.

**Methods:** The efficacy of each compound against L3 was assessed using both XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay and microscopic observation with concentrations ranging from 1 to 350 µM. Cytotoxicity was evaluated using J774.2 macrophage cell line and XTT assay. Lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>), selectivity index (SI) and structure-activity relationships were established. The activity compounds **4** (2-(ethylamino) hexadecan-1-ol), **6** (2-(butylamino) hexadecan-1-ol), **17** (*tert*-butyl *N*-(1-aminododecan-2-yl) carbamate) and **18** (*tert*-butyl *N*-(1-aminohexadecan-2-yl) carbamate) were further assessed against experimental *S. venezuelensis* infections in CD1 mice measuring reductions in the numbers of parthenogenetic females and egg passed in faeces. Mice were infected with 3,000 L3 and treated with 20 mg/kg/day for five days.

**Results:** In the screening study of 15 aminoalcohols [lauryl (*n* = 9); palmityl (*n* = 13); stearyl (*n* = 15) and alcohol derivatives], the presence of a palmitol chain was associated with the highest efficacy against L3 (LC<sub>50</sub> 31.9–39.1 µM). Alkylation of the 2-amino group with medium size fragments as ethyl or *n*-butyl showed the best larvicidal activity. The dialkylation did not improve efficacy. Aminoalcohols **4** and **6** showed the highest SI (1.5 and 1.6, respectively). With respect to diamine derivative compounds, a chain size of sixteen carbon atoms (palmitoyl chain, *n* = 13), and the alkylation of the 2-amino group with medium-sized fragments, were associated with the highest lethal activities. The presence of carbamoyl group in diamines **17** and **18** yielded high SI (1.7 and 1.4, respectively). Infected mice treated with aminoalcohol **6** showed reduction in parthenogenetic females (59 %) and eggs in faeces (51 %).

**Conclusions:** These results support the potentiality of aminoalcohol and diamine sphingosine-related compounds as suitable prototypes for developing new promising drugs against strongyloidiasis.

**Keywords:** Strongyloidiasis, Treatment, Alkaneaminoalcohol, Alkanediamine, Anthelmintics

\* Correspondence: jlaban@usal.es

<sup>1</sup>Parasite and Molecular Immunology Laboratory, Tropical Disease Research Centre, University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Avda. Licenciado Méndez Nieto s/n, 37007 Salamanca, Spain

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



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## 39 Background

40 Strongyloidiasis is a parasitic disease caused by nematodes  
41 of the genus *Strongyloides*, which are widely present in  
42 tropical and subtropical areas with climate suitable for the  
43 survival of larval stages of the species of this genus. The  
44 main species causing the disease in the human beings is  
45 *Strongyloides stercoralis* and it is estimated that 30 to 100  
46 million people are infected around the world [1]. Strongy-  
47 loidiasis is also classified as a Neglected Tropical Disease,  
48 according to the World Health Organization [2, 3]. This  
49 parasite has a complex life-cycle: larvae penetrate the skin  
50 of the host and migrate through the bloodstream to the  
51 lungs, where they enter into the alveolar spaces, ascending  
52 to the respiratory tree, the trachea, the pharynx and finally  
53 migrate back through the oesophagus and stomach into  
54 the intestine where they reach maturity [4–6]. Partheno-  
55 genetic females inhabit the mucosa of the small intestine  
56 where the eggs are laid. The rhabditiform larvae (L1) are  
57 eliminated together with faeces and develop over a few  
58 days in temperate and humid environment to infective  
59 third-stage filariform larvae (L3). Minimally symptomatic  
60 chronic infection and cutaneous, respiratory or gastro-  
61 intestinal signs are observed in patients. *Strongyloides ster-*  
62 *coralis* has also the ability to cause systemic disseminated  
63 infection and hyperinfection syndrome in immunocom-  
64 promised humans. In most of these cases the outcome of  
65 the disease is fatal [7, 8].

66 Ivermectin is an effective well-tolerated drug against  
67 strongyloidiasis, reaching cure rates of 93.1–96.8 % with  
68 one single dose administration [9]. On the other hand,  
69 treatment failure has been observed in patients co-  
70 infected with *S. stercoralis* and human T-lymphotropic  
71 virus-1 (HTLV-1) [10] and concomitancy with diabetes  
72 [11]. Albendazole, mebendazole and thiabendazole given  
73 in multiple doses are also used for the treatment of  
74 strongyloidiasis but their efficacy and tolerability is not  
75 as efficient as ivermectin [12, 13]. The concern about  
76 decreased efficacy in human nematodosis and the possi-  
77 bility of acquired-resistance in treatments of human  
78 nematodes is increasing [14, 15]. Additionally, rare  
79 population genotypes have shown encephalopathy when  
80 treated against *Loa loa* infections with ivermectin [16]  
81 making the discovery of new alternative nematocidal  
82 drugs a high priority challenge.

83 Long chain aminoalcohols and diamine derivatives are  
84 sphingosine-related compounds considered as key mole-  
85 cules for designing alternative drugs to the current treat-  
86 ment of infectious diseases. Biocidal activity of these  
87 compounds has been reported against bacteria such as  
88 *Mycobacterium tuberculosis* [17], protozoans such as *Plas-*  
89 *modium* spp. [18] *Leishmania* spp. [19], *Trypanosoma bru-*  
90 *cei* [20], *T. cruzi* [21], *Trichomonas vaginalis*, *Giardia*  
91 *lamblia* [22], fungi [23] and helminths such as *Schistosoma*  
92 *mansoni* [24] or the nematode *Caenorhabditis elegans* [25].

Alkylphospholipids are molecules structurally related to  
93 long-chain aminoalcohols and diamines with promising  
94 anticancer, antiprotozoal and anthelmintic activity. Their  
95 activity is exerted through the interaction with cell mem-  
96 branes, activating apoptosis [26].

97  
98 In the present study, we have synthesized and evaluated  
99 the anti-*Strongyloides* activity of two series of sphingosine  
100 derivative compounds including aminoalcohol and diamine  
101 derivatives. We have studied their effect on cultures of  
102 third-stage *S. venezuelensis* larvae, and those compounds  
103 showing good activity were selected to assess their efficacy  
104 against *S. venezuelensis* in experimental infections in mice.  
105 We also studied cytotoxicity and structure-activity relation-  
106 ships of these aminoalcohol and diamine derivatives.

## Methods

### Animals and ethics statement

107  
108 Animal procedures complied with the European Union  
109 (Di 2010/63/CE) and the Spanish (L32/2007, L6/2013,  
110 RD53/2013) regulations on animal experimentation. The  
111 University of Salamanca's Ethics Committee also ap-  
112 proved the procedures that were used in this study  
113 (Protocol: 48531). Male Wistar rats weighing 80–120 g  
114 from the Animal Experimentation facilities of the Uni-  
115 versity of Salamanca (Registration No. PAE/SA/001) and  
116 male Specific Pathogen Free (SPF) CD1 mice (Charles  
117 River, Barcelona, Spain) weighing 25–30 g were used for  
118 the maintenance of *S. venezuelensis* life-cycle and for  
119 in vivo experiments in standard conditions. Size of groups  
120 was calculated by power analysis [27] using "size.fdr" pack-  
121 age for R and following the 3Rs recommendations [28].  
122

### Maintaining *Strongyloides venezuelensis* life-cycle and parasitological techniques

123  
124 The *S. venezuelensis* strain from the Department of Para-  
125 sitology (University of Minas Gerais, Belo Horizonte,  
126 Brazil) was maintained at the University of Salamanca  
127 (biosecurity protocol No. 15/019) by serial in vivo pas-  
128 sages in Wistar rats. The infective third-stage larvae  
129 (L3) of *S. venezuelensis* were obtained from 3 to 4 day-  
130 old vermiculite cultures of faeces from infected rats  
131 using a Baermann apparatus. L3 were decontaminated  
132 according to the methodology previously reported by  
133 Martins et al. [29]. Freshly obtained L3 were washed six  
134 times, for twenty minutes each, with distilled water con-  
135 taining 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and  
136 0.8 mg/ml fluconazole. Absence of bacterial contamin-  
137 ation was confirmed by culturing larvae from each batch  
138 on a Petri dish containing blood agar at 28 °C during 24 h.  
139 Wistar rats were infected with 6,000 L3 in 0.5 ml phos-  
140 phate buffered saline (PBS) using a 23-gauge needle syr-  
141 inge to maintain the life-cycle. To perform faecal egg  
142 counts, mice were placed on grids over clean moist  
143 absorbent paper and allowed to defecate. Individual faecal  
144

145 samples were collected, conserved in a 10 % v/v formalin  
146 buffered solution and counted in triplicate under a micro-  
147 scope using McMaster technique and egg per gram were  
148 reported. The upper half of the small intestine was re-  
149 moved after euthanasia (pentobarbital 100 mg/kg), minced  
150 and placed in a sedimentation cup wrapped by 8 layers of  
151 gauze in PBS for 2 h at 37 °C. The parthenogenetic  
152 females were then collected from the sediment and their  
153 number recorded.

#### 154 Drugs and sample preparation

155 The procedures for the synthesis of 2-aminoalkan-1-ol  
156 (type I; compounds 1–15) and alkane 1,2-diamine (type  
157 II; compounds 16–25) derivatives, which are structurally  
FI 158 related to sphingosine, were previously reported (Fig. 1)  
159 [17, 19, 20, 30]. Fifteen aminoalcohol and ten diamine  
160 derivatives were synthesized. Compounds were solubi-  
161 lized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and appropriate  
162 dilutions were made to perform assays. Edelfosine (1-  
163 *O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine)  
164 was obtained from R. Berchtold (Biochemisches Labor,  
165 Bern, Switzerland) and used as reference for in vitro stud-  
166 ies. Ivermectin was purchased from Sigma (St Louis, MO,  
167 USA) and used as a reference drug for the in vivo treat-  
168 ment of strongyloidiasis.

#### 169 Cytotoxicity assessment in mouse macrophage cultures

170 The J774.2 mouse-derived peritoneal macrophage cell line  
171 was used to assess the cytotoxicity of the compounds.  
172 Macrophages were grown and serial successive in vitro  
173 passages were performed according to the methodology  
174 previously described by Rojas-Caraballo et al. [31]. To  
175 study the cytotoxicity of each compound, 200 µl of a sus-  
176 pension containing  $1 \times 10^5$  cells/ml were added onto 96  
177 well flat-bottom microplates, allowed to adhere to the sur-  
178 face of the plate for 2 h at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> and then exposed  
179 to the compounds for 72 h at the following concentrations:  
180 0.1; 0.5; 3.3; 15.0; 35.0; and 70.0 µM. Each concentration  
181 was assayed at least in triplicate in three independent  
182 experiments. Cytotoxicity was evaluated based on the  
183 colorimetric 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2*H*-  
184 tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay. After the treat-  
185 ment, 50 µl of XTT solution were added to each individual

well and plates were incubated for 24 h at 37 °C. The ab-  
186 sorbance of the plate was then measured at 492 nm using  
187 an ELISA-plate reader (Anthos Labtec Instruments, Wals,  
188 Austria). Results were expressed as the percentage of mac-  
189 rophages remaining alive after each treatment. Untreated  
190 and DMSO-treated macrophages were used as controls.  
191 Each concentration was assayed in triplicate in three in-  
192 dependent experiments and the LC<sub>50</sub> value for each com-  
193 pound was calculated by sigmoidal regression analysis [32].  
194

#### Efficacy and structure-activity study relationship of compounds against third-stage larva cultures

195 A hundred decontaminated L3 in water were added to  
196 96-well flat bottom microplates. Each compound was  
197 added at 1, 10, 35, 70 and 350 µM and then incubated  
198 during 72 h at 28 °C in triplicate and in a minimum of  
199 three independent experiments. Larval viability was quan-  
200 tified both by using the colorimetric XTT assay as de-  
201 scribed above and by monitoring larval motility at 24, 48  
202 and 72 h post-treatment. Larval movement was recorded  
203 after stimulation with direct natural light for 2 min using  
204 an inverted microscope (CK2, Olympus, Tokio, Japan) and  
205 a video recorder (AM423 camera and DinoCapture 2.0  
206 software, Dino-Lite digital microscope, Naarden, Holland).  
207 Larvae were considered dead when no movement was de-  
208 tected for at least two minutes of detailed examination. As  
209 controls, L3 were incubated in water or treated with edel-  
210 fosine in a range of 1–350 µM. Results were expressed as  
211 the concentration of each compound able to inhibit 50 %  
212 of total larvae movement (LC<sub>50</sub>), calculated by sigmoidal  
213 regression analysis [32]. Selectivity Index (SI) was calcu-  
214 lated as the ratio between the LC<sub>50</sub> value of each com-  
215 pound in macrophage culture and the LC<sub>50</sub> in L3 cultures  
216 to compare the efficacy and toxicity of each compound.  
217 Potency relative to edelfosine (P<sub>EDEL</sub>) was calculated as  
218 the ratio between edelfosine-LC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> of each com-  
219 pound. Edelfosine, a sphingosine-related compound, was  
220 used based on the low toxicity and high in vitro activity  
221 against helminths observed in previous experiments in  
222 our laboratory [33]. The influence of the side-chain size,  
223 the substitution of the 2-amino group, and the presence of  
224 a free hydroxyl function or a benzyl ether on the activity  
225 of each compound were studied in compounds of type I.  
226  
227

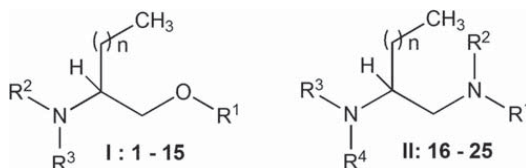


Fig. 1 General structures for aminoalcohol derivatives (type I, compounds 1–15) and diamine derivatives (type II, compounds 16–25)

f1.1

228 The influence of the substituents on the 1-amino group  
229 and the presence of a *tert*-butoxycarbonyl (Boc) protecting  
230 group on the 2-amino group have also been examined in  
231 type II compounds.

#### 232 Assessment of efficacy against *S. venezuelensis* infection 233 in mice

234 Those compounds showing the best activity against L3  
235 in the screening test (aminoalcohols **4** and **6**, and di-  
236 amines **17** and **18**) were tested in *S. venezuelensis* experi-  
237 mental infections of mice. For this purpose, we used a  
238 total of 64 male CD1 mice randomly distributed in  
239 groups of eight animals. We performed two independent  
240 experiments with four groups each: infection control,  
241 infected and treated with ivermectin and two groups  
242 infected and treated with their respective selected com-  
243 pound. In the first experiment, the aminoalcohols **4** and  
244 **6** were tested and in the second experiment the di-  
245 amines **17** and **18** were tested. All mice were subcutane-  
246 ously infected with 3,000 L3 of *S. venezuelensis* prior to  
247 drug treatment. Ivermectin was orally administered with  
248 a single standard dose of 0.2 mg/kg on day 5 post-  
249 infection (p.i.). Aminoalcohols and diamines were orally  
250 administered with a dose of 20 mg/kg/day at the day of  
251 infection and during the next five days to let reaching  
252 therapeutical concentration after day 5 p.i. Doses were  
253 determined on the basis of the cytotoxicity and previous  
254 experience in our laboratory with using sphingosine-  
255 related compounds [23, 34]. The number of parasitic  
256 females in the gut on day 7 p.i. and the number of eggs  
257 released in the faeces during the experiment were quan-  
258 tified to evaluate the efficacy of the treatment.

#### 259 Statistical analysis

260 The results were expressed as the mean and the standard  
261 error of the mean (SEM). Normality of data distribution  
262 was assessed by the non-parametric Kolmogorov-Smirnov  
263 test and the homogeneity of variance was tested by the  
264 Barrett test. Significant differences between groups were  
265 found using one-way ANOVA followed by Tukey's honest  
266 significance test. All statistical analyses were considered  
267 significant at a *P*-value < 0.05. All analyses and graphics  
268 were performed with Prism 5 (GraphPad Software, San  
269 Diego, CA) for Mac.

#### 270 Results

##### 271 Efficacy of aminoalcohols and diamines against *S.* 272 *venezuelensis* L3

273 Concerning the in vitro activity against *S. venezuelensis*  
274 larvae of the aminoalcohol derivatives (compounds **1–15**  
T1 275 in Table 1), compounds **4** and **6** showed the highest  
276 larvicidal activity ( $LC_{50} = 35.1 \pm 0.1$  and  $31.9 \pm 0.5$   $\mu$ M,  
277 respectively), that is 1.4 and 1.5 times, respectively, more  
278 potent than edelfosine ( $LC_{50} = 49.6 \pm 0.5$   $\mu$ M) but less

than ivermectin ( $LC_{50} = 0.46 \pm 0.1$   $\mu$ M) after 72 h of 279  
culture. Compounds **4** and **6** had cytotoxicity values of 280  
 $LC_{50} = 52.0 \pm 5.3$   $\mu$ M and  $LC_{50} = 52.0 \pm 4.1$   $\mu$ M, respec- 281  
tively, which were also less toxic than edelfosine or iver- 282  
mectin for macrophages ( $LC_{50} = 40.7 \pm 7.1$  and  $1.1 \pm$  283  
 $0.1$   $\mu$ M, respectively). The SI for edelfosine and ivermec- 284  
tin were 0.8 and 2.4, respectively, while for compounds 285  
**4** and **6** the SI were 1.5 and 1.6, respectively, meaning 286  
double selectivity (Table 1; Additional file 1: Video S1, 287  
Additional file 2: Video S2 and Additional file 3: Video 288  
S3 for compound **4** and Additional file 4: Video S4, 289  
Additional file 5: Video S5 and Additional file 6: Video 290  
S6 for compound **6**). Compounds **14**, **9**, **11** and **1** also 291  
elicited good activity with SI values ranging from 0.7 to 292  
0.5 compared to edelfosine activity. Unfortunately all of 293  
these were more toxic than edelfosine. 294

Ten alkane-1,2-diamines were also tested, compounds 295  
**16–25** (Table 2). Compounds **17**, **18**, **23** and **24** were T2  
more potent than edelfosine, with relative potency values 297  
of 1.2, 1.2, 1.2 and 1.4, respectively. Compounds **23** and 298  
**24** were more toxic than edelfosine, while SIs of com- 299  
pounds **17** and **18** were 1.7 and 1.4, respectively (Table 2: 300  
Additional file 7: Video S7, Additional file 8: Video S8 301  
and Additional file 9: Video S9 for compound **17** and 302  
Additional file 10: Video S10, Additional file 11: Video 303  
S11 and Additional file 12: Video S12 for compound **18**). 304  
Compounds **25**, **16**, **20** and **22** have also shown good 305  
activity, ranging from 0.7 to 0.5 compared to edelfosine 306  
activity. Compound **16** cytotoxicity was similar to edelfo- 307  
sine while the other three were more toxic. 308

Compounds, **4**, **6**, **17** and **18**, which reached the highest 309  
SI values, seemed to act in a dose- and time-dependent 310  
manner, since larval viability was progressively inhibited 311  
to completion as dose and time increased. As a conse- 312  
quence of the global consideration of SI values, larval 313  
viability measured by XTT and motility examination, the 314  
four compounds were selected for evaluation of their 315  
in vivo efficacy in infected mice. 316

##### Efficacy of aminoalcohols and diamines against *S.* 271 *venezuelensis* experimental infections in mice

The in vivo anti-*Strongyloides* efficacy of compounds **4**, 319  
**6**, **17** and **18** is summarized in Table 3 and Fig. 2. Ami- T3F2  
noalcohol **6** induced parthenogenetic female burden re- 320  
duction of 59 % (Fig. 2a) and significant reductions in 321  
egg numbers in faeces on days 6 and 7 p.i. ranging from 322  
35 to 51 %, respectively (Table 3) compared to infection 323  
controls. Administration of diamine **18** resulted in re- 324  
duction in the number of eggs in faeces on day 7 p.i 325  
(50 %; Table 3) and moderate but not significant reduc- 326  
tion of parthenogenetic females in the gut (25 %; Fig. 2b). 327  
Despite aminoalcohol **4** and diamine **17** inducing a 328  
moderate reduction of eggs in faeces (45 and 21 %, re- 329  
spectively) they failed to reduce female burdens on day 7 330  
331

**Table 1** *In vitro* efficacy and selectivity measured by XTT of alkane aminoalcohol derivatives against *S. venezuelensis* third-stage larvae (L3)

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	Efficacy against L3 LC <sub>50</sub> (μM) Mean ± SEM	P <sub>EDEL</sub>	Cytotoxicity LC <sub>50</sub> (μM) Mean ± SEM	SI <sup>b</sup>	
t1.1									
t1.2									
t1.3									
t1.4									
t1.5	1	H	H	9	97.8 ± 10.6	0.5	17.4 ± 0.4	0.2	
t1.6	2	H	H	13	348.4 ± 1.5	0.1	nt	–	
t1.7	3	H	H	15	239.3 ± 7.9	0.2	nt	–	
t1.8	4	H	H	Et	13	35.1 ± 0.1 <sup>c*</sup>	1.4	52.0 ± 5.3	1.5
t1.9	5	H	H	Bu	9	297.6 ± 5.4	0.1	37.9 ± 1.9	0.1
t1.10	6	H	H	Bu	13	31.9 ± 0.5 <sup>dt</sup>	1.5	52.0 ± 4.1	1.6
t1.11	7	H	H	Bu	15	293.3 ± 2.6	0.1	10.0 ± 1.5	<0.1
t1.12	8	H	H	Hex	9	122.7 ± 6.4	0.4	43.2 ± 0.9	0.4
t1.13	9	H	H	Hex	13	84.2 ± 4.3	0.5	10.9 ± 1.3	0.1
t1.14	10	H	H	Hex	15	112.5 ± 5.3	0.4	54.2 ± 0.9	0.5
t1.15	11	H	Et	Et	13	90.0 ± 5.7	0.5	2.2 ± 2.2	<0.1
t1.16	12	H	Bu	Bu	9	169.0 ± 9.2	0.2	63.7 ± 1.2	0.4
t1.17	13	H	Bu	Bu	13	192.1 ± 7.7	0.2	nt	–
t1.18	14	Bn	H	H	13	67.6 ± 6.3	0.7	30.2 ± 0.3	0.4
t1.19	15	Bn	H	Bu	13	232.0 ± 4.5	0.2	nt	–
t1.20	Edelfosine				49.6 ± 0.5	1.0	40.7 ± 7.1	0.8	

t1.21 Abbreviations: Bn Benzyl, Bu Butyl, Et Ethyl, nt not tested, SEM standard error of the mean, R<sup>1</sup> substituent on the hydroxyl group; R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> substituents on the  
t1.22 amine group

t1.23 <sup>a</sup>Potency relative to edelfosine (P<sub>EDEL</sub>) = Compound-LC<sub>50</sub> against L3 / Edelfosine-LC<sub>50</sub> against L3 <sup>b</sup>Selectivity index (SI) = Compound-LC<sub>50</sub> to macrophages/Compound-LC<sub>50</sub>  
t1.24 against L3

t1.25 <sup>c\*</sup>Significant increase in P<sub>EDEL</sub> compared to edelfosine (ANOVA F<sub>(15, 62)</sub> = 413.82, P < 0.001; HDS P = 0.008)

t1.26 <sup>d\*</sup>Significant increase in P<sub>EDEL</sub> compared to edelfosine (ANOVA F<sub>(15, 62)</sub> = 413.82, P < 0.001; <sup>h</sup>HDS P = 0.002

**Table 2** *In vitro* efficacy and selectivity measured by XTT of alkane diamines derivatives against *S. venezuelensis* third-stage larvae (L3)

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	Efficacy against L3 LC <sub>50</sub> (μM) Mean ± SEM	P <sub>EDEL</sub>	Cytotoxicity LC <sub>50</sub> (μM) Mean ± SEM	SI <sup>b</sup>	
t2.1									
t2.2									
t2.3									
t2.4									
t2.5	16	H	H	H	13	75.0 ± 4.1	0.6	40.1 ± 0.4	0.5
t2.6	17	H	H	Boc	9	39.0 ± 2.9 <sup>c*</sup>	1.2	66.6 ± 2.2	1.7
t2.7	18	H	H	Boc	13	39.1 ± 4.7 <sup>c*</sup>	1.2	56.2 ± 3.3	1.4
t2.8	19	H	H	Boc	15	45.7 ± 9.2	1.0	36.8 ± 2.8	0.8
t2.9	20	H	Et	H	13	95.4 ± 1.5	0.5	10.5 ± 1.4	0.1
t2.10	21	H	Bu	H	13	148.3 ± 3.3	0.3	15.5 ± 1.2	0.1
t2.11	22	H	Hex	H	13	83.6 ± 3.1	0.5	5.2 ± 0.5	0.0
t2.12	23	H	Hex	Boc	13	38.9 ± 4.6 <sup>c*</sup>	1.2	4.9 ± 0.8	0.1
t2.13	24	Et	Et	H	13	33.4 ± 0.7 <sup>dt</sup>	1.4	13.2 ± 1.7	0.3
t2.14	25	Hex	Hex	Boc	13	67.8 ± 7.1	0.7	7.6 ± 0.6	0.1
t2.15	Edelfosine				49.6 ± 0.5	1.0	40.7 ± 7.1	0.8	

t2.16 Abbreviations: Bn Benzyl, Bu butyl, Et ethyl, Hex hexyl, Boc, tert-butoxycarbonyl, SEM standard error of the mean; R1 and R2 substituents on the amine at position  
t2.17 C-1; R3 substituents on the amine at position C-2

t2.18 <sup>a</sup>Potency relative to edelfosine (P<sub>EDEL</sub>) = Compound-LC<sub>50</sub> against L3 / Edelfosine-LC<sub>50</sub> against L3

t2.19 <sup>b</sup>Selectivity index (SI) = Compound-LC<sub>50</sub> to macrophages/Compound-LC<sub>50</sub> against L3

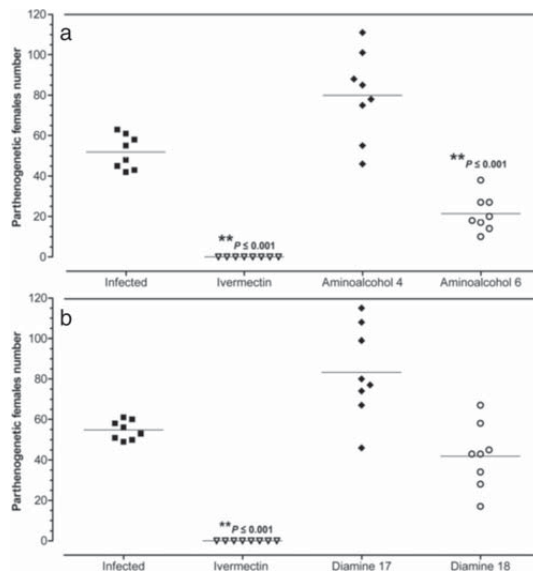
t2.20 <sup>c\*</sup>Significant increase in P<sub>EDEL</sub> compared to edelfosine ANOVA: F<sub>(10, 72)</sub> = 216.85, P < 0.001; HDS P = 0.001

t2.21 <sup>d\*</sup>Significant increase in P<sub>EDEL</sub> compared to edelfosine ANOVA: F<sub>(10, 72)</sub> = 216.85, P < 0.001; HDS P < 0.001

**Table 3** Reduction in egg per gram of faeces (EPGF) in mice infected with 3,000 *S. venezuelensis* L3 after treatment with aminoalcohol derivatives **4** and **6** and diamine derivatives **17** and **18** for five days at a dose of 20 mg/kg, and ivermectin 0.2 mg/kg

Groups	EPGF on day 5 (Mean ± SEM)	Reduction (%)	EPGF on day 6 (Mean ± SEM)	Reduction (%)	HDS <i>P</i>	EPGF on day 7 (Mean ± SEM)	Reduction (%)	HDS <i>P</i>
Experiment 1								
Infected	2,020 ± 430	–	24,800 ± 5,210	–		12,5150 ± 9,200	–	
Ivermectin	5,240 ± 580	nr	330 ± 110	99 <sup>a</sup>	<0.001	0 ± 0	100 <sup>a</sup>	<0.001
Aminoalcohol <b>4</b>	3,830 ± 570	nr	20,220 ± 3,080	18	0.274	68,980 ± 12,810	45 <sup>a</sup>	<0.001
Aminoalcohol <b>6</b>	4,720 ± 900	nr	16,160 ± 1,970	35 <sup>a</sup>	0.044	61,680 ± 1,917	51 <sup>a</sup>	<0.001
ANOVA	$F_{(3, 28)} = 3.28$ $P = 0.051$		$F_{(3, 28)} = 13.42$ $P < 0.001$			$F_{(3, 28)} = 45.31$ $P < 0.001$		
Experiment 2								
Infected	3,190 ± 300	–	11,060 ± 1,710	–		82,820 ± 5,364	–	
Ivermectin	2,950 ± 300	8	160 ± 90	99 <sup>a</sup>	<0.001	80 ± 50	100 <sup>a</sup>	<0.001
Diamine <b>17</b>	2,715 ± 410	15	10,890 ± 1,200	2	0.912	65,520 ± 7,037	21 <sup>a</sup>	0.025
Diamine <b>18</b>	3,410 ± 520	nr	8,110 ± 430	27	0.060	41,450 ± 5,382	50 <sup>a</sup>	<0.001
ANOVA	$F_{(3, 28)} = 0.59$ $P = 0.625$		$F_{(3, 28)} = 23.03$ $P < 0.001$			$F_{(3, 28)} = 47.94$ $P < 0.001$		

Abbreviations: HDS Tukey's honest significance test, nr no reduction, SEM standard error of the mean  
<sup>a</sup>Significant reduction compared to infected control group



**Fig. 2** Number of parthenogenetic females on day 7 post-infection. **a** Mice treated with 20 mg/kg of aminoalcohols **4** and **6** (ANOVA  $F_{(2, 28)} = 62.93$ ,  $P < 0.001$ ). **b** Mice treated with 20 mg/kg of diamines **17** and **18** (ANOVA  $F_{(3, 28)} = 48.03$ ,  $P < 0.001$ ). Worms were recovered from the intestine of mice infected with 3,000 *S. venezuelensis* L3 and treated during five days. Each point represents data from individual mice and horizontal bars indicate the means; stars indicate significant reduction of worm recovery compared to infected control



p.i. (Table 3; Fig. 2). During the experiments, all mice used (64/64) remained alive and there was not evidence of any symptoms of severe pain, excessive distress, suffering or an impending death in any of the animals. Daily oral administration of each compound (20 mg/kg/day) and ivermectin (0.2 mg/kg) were well tolerated by animals in all experiments.

## Discussion

To the best of our knowledge, this study represents the first insight into therapeutic use of alkane aminoalcohols and diamines against a nematode such as *S. venezuelensis*. Synthetic new compounds developed for cancer or organ transplantation are very attractive and untapped resources for the development of new drugs for neglected diseases such as the strongyloidiasis. Long chain-aminoalcohols and diamines are sphingosine-derivatives that have been considered as target molecules for development of new drugs showing cytotoxicity against neoplastic cells [35], and possessing anti-inflammatory properties [34, 36] and ability to kill infectious agents [18, 24, 37]. However, they have never been used against nematodes such as *Strongyloides* spp. These compounds have structural resemblances to anticancer alkylphospholipids with anthelmintic activity against *S. mansoni* and *S. venezuelensis* [38]. Therefore, we used the alkylphospholipid edelfosine as control for in vitro experiments.

We have studied the structure-activity relationships in both type I and type II compounds. We found that aminoalcohols **4** and **6** with a palmitoyl chain (n-hexadecan-1-ol) and the diamines **17** and **18** with chains of lauroyl (n-dodeca-1-ol) and palmitoyl, respectively, showed a more potent activity against *S. venezuelensis* L3, with low cytotoxicity for mammal macrophages and high selectivity indices (SIs) indicating their potential efficacy. Concerning aminoalcohol derivatives (compounds **1–15**) the following comparisons of results can be performed. Examination of the substituents of the 2-amino group indicated the preference for a small- (ethyl) to medium- (butyl) sized alkyl group in the secondary amine, as seen in derivatives **4** and **6**, suggesting a decrease in the activity with increase in substituent size increase, compound **9** activity. Interestingly, compound **6** (2-*n*-butylamino-hexadecan-1-ol) was found to be less toxic and had a better SI than the reference drug edelfosine. Compound **6** was also the most potent and selective compound among the aminoalcohols tested. Transformation of the secondary amines **4** and **6** into their respective tertiary analogues **11** and **13** led to a fair reduction of activity. Regarding the 1,2-alkanediamines **16–25** (Table 2), the most potent compound against larvae was the diamine **24**, a compound with a primary amine at position C-2 and a tertiary one at C-1; unfortunately, it showed a high cytotoxicity. Compounds **17**, **18** and **23**, the three Boc-protected diamines, showed

similar efficacy against L3; the last one was highly toxic, and the other two had SIs of 1.7 and 1.4, respectively. Compounds **17** and **18** only differed in the size of the chain, with respective n-values of 9 and 13; in this case, a small size chain gave less toxicity. In summary, based on the ten alkanediamines tested, it can be concluded that there is a preference for compounds with a Boc-protecting group attached to the 2-amino group in the in vitro activity assays.

Inhibition of the viability of L3 induced by compound **6** increased in a dose- and time-dependent manner, demonstrated using both XTT technique and motility records. Lipophilic diamine and aminoalcohol derivatives containing chains with 13 carbon atoms demonstrate activity against *T. cruzi* trypomastigotes [24], indicating they possess the best range of activity. It seems that the 16-carbon chain length could be involved in the drug's increased solubility, absorption and harmful action, leading to the death of the larvae [39]. We observed that only aminoalcohol **6**, containing an alkyl chain with a 16-carbon atom chain and a butyl radical, displayed efficacy against *S. venezuelensis* infection in mice. Although this activity was less effective than ivermectin, the choice drug for strongyloidiasis treatment, our data indicate that oral treatment with aminoalcohol **6** significantly decreases both, the recovered adult parthenogenetic females in the small intestine and the number of eggs per gram of faeces. Aminoalcohol **6** has also demonstrated the highest activity against three *T. cruzi* strains in cultures [21].



Alkylphospholipids, aminoalcohols and diamines have the ability to interact with membrane lipids, allowing their penetration into the parasite where they may disturb cell metabolism and integrity [24]. The pro-apoptotic mechanism was also described in edelfosine [38, 40] and in long chain aminoalcohols [41]. Further studies should be conducted to determine the mechanisms of action. Despite aminoalcohol **6** did not exhibit activity comparable to ivermectin, combinations with current drugs may result in useful synergistic interactions.

## Conclusions








In conclusion, we have reported the strongyloicidal activity of two series of sphingosine-related compounds, 15 aminoalkanols and 10 alkanediamines, against *S. venezuelensis* using L3 cultures and a strongyloidiasis murine model to search for promising lead compounds that can be optimized to improve their potency and selectivity. This preliminary study introduces aminoalcohol **6** as a suitable prototype for the design of new anti-*Strongyloides* drugs. However, further in vivo studies need to be conducted in order to confirm the outcomes achieved and its utility in therapy against strongyloidiasis and other geohelminthiasis.

437 **Additional files**

438

440 **Additional file 1: Video S1.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
441 with aminoalcohol 4 at 24 h post treatment under optical microscope.  
442 (MP4 6713 kb) 443 **Additional file 2: Video S2.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
444 with aminoalcohol 4 at 48 h post treatment under optical microscope.  
445 (MP4 6623 kb) 446 **Additional file 3: Video S3.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
447 with aminoalcohol 4 at 72 h post treatment under optical microscope.  
448 (MP4 6562 kb) 449 **Additional file 4: Video S4.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
450 with aminoalcohol 6 at 24 h post treatment under optical microscope.  
451 (MP4 6999 kb) 

Q4

452 **Additional file 5: Video S5.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated with  
453 aminoalcohol 6 at 48 h post treatment under optical microscope. 454 **Additional file 6: Video S6.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
455 with aminoalcohol 6 at 72 h post treatment under optical microscope.  
456 (MP4 6772 kb) 457 **Additional file 7: Video S7.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
458 with diamine 17 at 24 h post treatment under optical microscope.  
459 (MP4 7218 kb) 460 **Additional file 8: Video S8.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
461 with diamine 17 at 48 h post treatment under optical microscope.  
462 (MP4 7202 kb) 463 **Additional file 9: Video S9.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
464 with diamine 17 at 72 h post treatment under optical microscope.  
465 (MP4 7227 kb) 466 **Additional file 10: Video S10.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
467 with diamine 18 at 24 h post treatment under optical microscope.  
468 (MP4 7206 kb) 469 **Additional file 11: Video S11.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
470 with diamine 18 at 48 h post treatment under optical microscope.  
471 (MP4 7297 kb) 472 **Additional file 12: Video S12.** Motility in *S. venezuelensis* L3 treated  
473 with diamine 18 at 72 h post treatment under optical microscope.  
474 (MP4 7365 kb) 475 **Abbreviations**476 ANOVA, analysis of variance; Boc, tert-butoxycarbonyl protecting group; HDS,  
477 Tukey's honest significance test; HTLV-1, Human T-lymphotropic virus-1; L1, first-  
478 stage larva or rhabditiform larva; L3 third-stage larva or filariform larva; LC<sub>50</sub>,  
479 lethal concentration 50 %; P<sub>EDEL</sub>, Potency relative to edelfosine; SI, selectivity  
480 index; XTT, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-  
481 carboxanilide)


Q3

482 **Acknowledgements**483 We want to thank J.J. Muñoz Quijano for video production and edition, and F.J.  
484 Burguillo Muñoz, University of Salamanca for the statistical analysis support. We  
485 also acknowledge the support of Manasa Bhatta (Emory University) for the  
486 English edition and the editorial help for the style correction.487 **Funding**488 Financial support came from Proyectos Integrados IBSAL (IBY15/00003;  
489 Salamanca, Spain), ISCIII-FIS (RICET VI PN de I + D + I 2013–2016 FEDER:  
490 RD12/0018/0002) and CIETUS–University of Salamanca. LAB was supported  
491 by International Fellowship USAL–Banco Santander and Human Capital Program-  
492 CONICYT, Chile. Sponsors had no role in study design, or collection, analysis  
493 and interpretation of data. Authors are the only ones responsible for writing and  
494 submission of the publication.495 **Availability of data and materials**496 The datasets supporting the conclusions of this article are included within  
497 the article.**Authors' contributions**EO and ASF designed the compounds of the study. RE and LAB synthesized  
and characterized the compounds tested. JL-A and AM designed the in vitro  
and in vivo experiments. ALL-C, JR-C, BV and PF-S performed the biological  
assays. EO, JL-A, ALL-C, JR-C, BV, PF-S, ASF and AM analysed and interpreted  
the data. JL-A, EO, JR-C and ALL-C drafted the first manuscript. ASF and AM  
critically revised the manuscript. All authors read and approved the final  
manuscript.**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**The University of Salamanca's Ethics Committee approved the procedures  
involving animals used in this study (Protocol: 48531).**Author details**<sup>1</sup>Parasite and Molecular Immunology Laboratory, Tropical Disease Research  
Centre, University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Avda. Licenciado Méndez  
Nieto s/n, 37007 Salamanca, Spain. <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical  
Chemistry, Faculty of Pharmacy (IBSAL-CIETUS), University of Salamanca,  
37007 Salamanca, Spain. <sup>3</sup>Present Address: Departamento de Ciencias  
Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte,  
Antofagasta, Chile. <sup>4</sup>Present Address: Centro de Investigación en Salud para  
el Trópico (CIST), Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta,  
Magdalena, Colombia. <sup>5</sup>Present Address: Facultad de Medicina, Universidad  
Cooperativa de Colombia, Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco,  
Santa Marta, Magdalena, Colombia.

Received: 24 January 2016 Accepted: 16 June 2016

 523 524**References**

- Schär F, Trostdorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2288. [Q5](#)
- Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli AF, Levecke B, Socias E, Arias LM, Sosa N, Abraham D, Cimino R, Echazú A, Crudo F, Verccruysse J, Albonico M. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2165.
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - Summary. *Wkly Epidemiol Rec.* 2011;86:113–20.
- Vadlamudi RS, Chi DS, Krishnaswamy G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin Mol Allergy.* 2006;4:8.
- Viney ME, Lok JB. *Strongyloides* spp. *WormBook*. 2007; 1–15. [Q6](#)
- Reece JJ, Siracusca MC, Scott AL. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun.* 2006;74:4970–81.
- Fardet L, Généreau T, Poirot JL, Guidet B, Kettaneh A, Cabane J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review. *J Infect.* 2007;54:18–27.
- Feely NM, Waghorn DJ, Dexter T, Gallen I, Chiodini P. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: difficulties in diagnosis and treatment. *Anaesthesia.* 2010;65:298–301.
- Supattamongkol Y, Premasathian N, Bhumimuang K, Waywa D, Nilganuwong S, Karuphong E, Anekthananon T, Wanachivanawin D, Silpasakorn S. Efficacy and safety of single and double doses of ivermectin versus 7-day high dose albendazole for chronic strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1044.
- Carvalho EM, da Fonseca Porto A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol.* 2004;26:487–97.
- Hays R, Esterman A, McDermott R. Type 2 Diabetes Mellitus Is Associated with *Strongyloides stercoralis* Treatment Failure in Australian Aboriginals. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003976.
- Salam RA, Haider BA, Humayun Q, Bhutta ZA. Effect of administration of anthelmintics for soil-transmitted helminths during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; CD005547. [Q7](#)
- Speich B, Ali SM, Ame SM, Bogoch II, Alles R, Huwlyer J, Albonico M, Hattendorf J, Utzinger J, Keiser J. Efficacy and safety of albendazole plus

- 564 ivermectin, albendazole plus mebendazole, albendazole plus oxantel  
565 pamoate, and mebendazole alone against *Trichuris trichiura* and  
566 concomitant soil-transmitted helminth infections: a four-arm, randomised  
567 controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:277–84.
- 568 14. Vercruysse J, Albonico M, Behnke JM, Kotze AC, Prichard RK, McCarthy JS,  
569 Montresor A, Levecke B. Is anthelmintic resistance a concern for the control  
570 of human soil-transmitted helminths? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.*  
571 2011;1:14–27.
- 572 15. Osei-Atweneboana MY, Awadzi K, Attah SK, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard  
573 RK. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca*  
574 *volvulus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e998.
- 575 16. Bourguinat C, Kamgno J, Boussinesq M, Mackenzie CD, Prichard RK, Geary  
576 TG. Analysis of the mdr-1 gene in patients co-infected with *Onchocerca*  
577 *volvulus* and *Loa loa* who experienced a post-ivermectin serious adverse  
578 event. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:32–38.
- 579 17. del Olmo E, Molina-Salinas GM, Escarcena R, Alves M, López-Pérez JL, Hernández-  
580 Pando R, Saiz-Fernández S, Feliciano AS. Simple dihydropyrimidine analogues  
581 with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem*  
582 *Lett.* 2009;19:5764–68.
- 583 18. Howarth J, Lloyd DG. Simple 1,2-aminoalcohols as strain-specific antimalarial  
584 agents. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:625–8.
- 585 19. del Olmo E, Alves M, López JL, Inchausti A, Yaluff G, Rojas De Arias A, San  
586 Feliciano A. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-  
587 alcohols. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12:659–62.
- 588 20. del Olmo E, Diaz-González R, Escarcena R, Carvalho L, Bustos LA, Navarro M,  
589 Feliciano AS. Diamine and aminoalcohol derivatives active against  
590 *Trypanosoma brucei*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:440–3.
- 591 21. Legarda-Ceballos AL, del Olmo E, López-Abán J, Escarcena R, Bustos LA, Fonseca-  
592 Berzal C, Gómez-Barrio A, Dib JC, San Feliciano A, Muro A. Trypanocidal Activity of  
593 Long Chain Diamines and Aminoalcohols. *Molecules.* 2015;20:11554–68.
- 594 22. Giordani RB, Araujo DP, Duarte M, Zuanazzi JA, Tasca T, De Almeida MV. Anti-  
595 protozoal activity of diamine derivatives. *Biomed Pharmacother.* 2011;65:60–2.
- 596 23. Derita M, del Olmo E, Barboza B, García-Cadenas AE, López-Pérez JL,  
597 Andújar S, Enriz D, Zacchino S, San Feliciano A. Synthesis, bioevaluation and  
598 structural study of substituted phthalazin-1(2H)-ones acting as antifungal  
599 agents. *Molecules.* 2013;18:3479–501.
- 600 24. Fernandes FS, Rezende Junior CO, Fernandes TS, da Silveira LS, Rezende CA,  
601 De Almeida MV, de Paula RG, Rodrigues V, Da Silva Filho AA, Couri MR.  
602 Anthelmintic effects of alkylated diamines and amino alcohols against  
603 *Schistosoma mansoni*. *Biomed Res Int.* 2013;2013:783490.
- 604 25. Sánchez-Blanco A, Rodríguez-Matellán AG, Reis-Sobreiro M, Sáenz-Narciso B,  
605 Cabello J, Mohler WA, Mollinedo F. *Caenorhabditis elegans* as a platform to  
606 study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell Cycle.*  
607 2014;13:3375–89.
- 608 26. Gajate C, Mollinedo F. Edeffosine and perifosine induce selective apoptosis  
609 in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream  
610 signaling molecules into lipid rafts. *Blood.* 2007;109:711–9.
- 611 27. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies?  
612 *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4:303–6.
- 613 28. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of  
614 experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002;43:244–58.
- 615 29. Martins WA, Melo AL, Nicoli JR, Cara DC, Carvalho MA, Lana MA, Vieira EC,  
616 Farias LM. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae  
617 for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J Med*  
618 *Microbiol.* 2000;49:387–90.
- 619 30. Rebollo O, del Olmo E, Ruiz G, López-Pérez JL, Giménez A, San FA.  
620 Leishmanicidal and trypanocidal activities of 2-aminocyclohexanol and 1,2-  
621 cyclohexanediamine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:184–7.
- 622 31. Rojas-Caraballo J, López-Abán J, Pérez Del Villar L, Vizzaino C, Vicente B,  
623 Fernández-Soto P, del Olmo E, Patarroyo MA, Muro A. *In vitro* and *in vivo*  
624 studies for assessing the immune response and protection-inducing ability  
625 conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and  
626 T-cell epitopes. *PLoS One.* 2014;9:e105323.
- 627 32. Gómez-Ayala S, Castrillón JA, Palma A, Leal SM, Escobar P, Bahsas A.  
628 Synthesis, structural elucidation and *in vitro* antiparasitic activity against  
629 *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-  
630 benzazepine derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:4721–39.
- 631 33. Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Dakir El H, Mollinedo F, Muro A. *In vitro*  
632 and *in vivo* anti-schistosomal activity of the alkylphospholipid analog  
633 edefosine. *PLoS One.* 2014;9:e109431.
34. Reis EF, Castro SB, Alves CC, Oliveira EE, Correa TA, Almeida MV, Ferreira AP. 634  
Lipophilic amino alcohols reduce carrageenan-induced paw edema and 635  
anti-OVA DTH in BALB/c mice. *Int Immunopharmacol.* 2013;17:727–32. 636
35. Nishizaki T, Kanno T, Tsuchiya A, Kaku Y, Shimizu T, Tanaka A. 1-[2-(2- 637  
Methoxyphenylamino) ethylamino]-3-(naphthalene-1-yloxy)propan-2-ol may 638  
be a promising anticancer drug. *Molecules.* 2014;19:21462–72. 639
36. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Patsilnakos A, Tran TM, Marson CM. 640  
Pteridine-2,4-diamine derivatives as radical scavengers and inhibitors of 641  
lipoxygenase that can possess anti-inflammatory properties. *Future Med* 642  
*Chem.* 2015;7:1937–51. 643
37. Pérez-Meseguer J, del Olmo E, Alanis-Garza B, Escarcena R, Garza-González E, 644  
Salazar-Aranda R, Feliciano AS, de Torres NW. Synthesis of leubethanol 645  
derivatives and evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med* 646  
*Chem.* 2012;20:4155–63. 647
38. Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, Muro A, Mollinedo F. 648  
Inhibition of granulomatous inflammation and prophylactic treatment of 649  
schistosomiasis with a combination of edefosine and praziquantel. *PLoS* 650  
*Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003893. 651
39. Carvalho CO, Chagas AC, Cotinguiba F, Furlan M, Brito LG, Chaves FC, 652  
Stephan MP, Bizzo HR, Amarante AF. The anthelmintic effect of plant 653  
extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet* 654  
*Parasitol.* 2012;183:260–8. 655
40. Varela-M RE, Villa-Pulgarín JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, Muñoz DL, 656  
Robledo SM, Muskus CE, López-Abán J, Muro A, Vélez ID, Mollinedo F. *In* 657  
*vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edefosine against *Leishmania spp.* 658  
and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1612. 659
41. del Olmo E, Macho A, Alves M, López JL, el Banoua F, Muñoz E, San 660  
Feliciano A. Long-chain aminoalcohol and diamine derivatives induce 661  
apoptosis through a caspase-3 dependent pathway. *Bioorg Med Chem* 662  
*Lett.* 2002;12:2621–6. 663

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



665  
666



### 3.3 Artículo 3

**The alkylphospholipid edelfosine  
shows activity against  
*Strongyloides venezuelensis* and  
induces apoptosis-like cell death**

**Ana L. Legarda-Ceballos**

Jose Rojas-Caraballo,  
Julio López-Abán, Ana Lucía Ruano,  
Edward Yepes, Consuelo Gajate,  
Faustino Mollinedo, Antonio Muro

*En: Enviado a Acta Tropica:  
Manuscript Number:  
ACTROP-D-15-00866*



# The alkylphospholipid edelfosine shows activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death

Ana L. Legarda-Ceballos<sup>a</sup>, Jose Rojas-Caraballo<sup>a,1</sup>, Julio López-Abán<sup>a</sup>, Ana Lucía Ruano<sup>a,b</sup>, Edward Yepes<sup>a</sup>, Consuelo Gajate<sup>c</sup>, Faustino Mollinedo<sup>c</sup>, Antonio Muro<sup>a\*</sup>

December 10<sup>th</sup> 2015

<sup>a</sup> Parasite and Molecular Immunology Laboratory. Tropical Disease Research Centre, University of Salamanca (IBSAL-CIETUS). Avda. Licenciado Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca, Spain.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Médicas - Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

<sup>c</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Castilla y León, Spain.

<sup>1</sup> Current address: Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST), Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Carretera Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Magdalena, Colombia

## Abstract

Strongyloidiasis is widely distributed in the tropical and subtropical areas. Ivermectin is the drug of choice for the treatment. However, the concerns about relying treatment on a single drug make identification of new molecules a priority. Alkylphospholipid analogues, including edelfosine, are a group of synthetic compounds that have shown activity against protozoan parasites and also against the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. The activity of edelfosine, miltefosine, perifosine against *Strongyloides venezuelensis* was assessed both in cultures of third-stage larvae (L3) and infected mice. The induction of an apoptosis-like mechanism in larvae after treatment was studied. Larval motility and XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay were used to evaluate antiparasitic drug efficacy in L3 cultures as screening test. Edelfosine displayed the highest activity against L3 and the best selectivity index (LD<sub>50</sub> = 49.6 ± 5.4 μM, SI = 1.1) compared to miltefosine or perifosine activity. L3 after culture with edelfosine were not able to develop an infection in CD1

mice. The oral treatment with edelfosine showed reduction of 47% in parasitic females allocated in the gut. Moreover, DNA fragmentation was also observed by TUNEL staining in edelfosine treated L3. These data suggest that edelfosine could be an effective drug against strongyloidiasis, probably through apoptosis-like cell death.

## 1. Introduction

Strongyloidiasis is caused by nematodes of the genus *Strongyloides* widely distributed in tropical and subtropical areas. There are about 52 species in the genus, but only *S. stercoralis* and *S. fuelleborni* infect humans. It is estimated that 30 to 100 million people are infected worldwide (Bisoffi et al. 2013, Puthiyakunnon et al. 2014). Infective third-stage larvae (L3) penetrate the skin, migrate to the lungs, reaching the trachea, oesophagus and small intestine where became mature. Parthenogenetic females lay eggs that hatch into rhabditiform larvae (L1), which are eliminated in the faeces. Some L1 remain and molt into L3 establishing reinfection cycles. The clinical strongyloidiasis ranges from asymptomatic infection, cutaneous *larva migrans*, Löeffler syndrome, chronic intestinal infection to life-threatening disseminated hyperinfection depending upon the immune status of the patient and the presence of risk factors, such as corticosteroid therapy, stem-cell transplantation, alcoholism or HTLV-1 infection. Disseminated hyperinfection involves a massive spread of the parasite in situations of immunosuppression with high mortality (Montes et al. 2010, Schar et al. 2013, Sharifdini et al. 2014).

Thiabendazole was long the drug of choice for treating strongyloidiasis. However, it is no longer available due to the strong adverse side effects. Albendazole, another broad- spectrum drug and anthelmintic agent is effective against *S. stercoralis*. Currently, ivermectin is the best therapeutic option for the treatment of strongyloidiasis, with cure rates from 70% to 85% of chronically infected patients (Pitisuttithum et al. 1995, Igual-Adell et al. 2004, Stuart et al. 2009). The anti-*Strongyloides* activity of ivermectin is superior to that of albendazole (Suputtamongkol et al. 2011).

Alkylphospholipid (APL) analogues include edelfosine, miltefosine and perifosine, a heterogeneous group of natural lipids (Fig. 1) with promising anticancer activity. These compounds act at the level of cell membranes affecting apoptotic signalling. Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) is considered the prototype APL molecule and a promising antitumor ether phospholipid drug that acts by activating apoptosis through its interaction with cell membranes (Gajate and Mollinedo 2002, Mollinedo et al. 2004, Gajate and Mollinedo 2007). In addition to its antitumor activity, edelfosine exerts cytotoxic activity against parasitic



protozoa such as *Leishmania* spp (Varela et al. 2012), *Trypanosoma cruzi* (Luna et al. 2009), *Trichomonas vaginalis* (Rocha et al. 2014), *Giardia lamblia* (Eissa and Amer 2012), *Acanthamoeba keratitis* (Polat et al. 2012), *Neospora caninum* (Debache and Hemphill 2012), *Babesia* spp. and *Theileria equi* (AbouLaila et al. 2014). These compounds are also active against larval stages and eggs of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* (Sanchez-Blanco et al. 2014) and the blood fluke *Schistosoma mansoni* (Eissa et al. 2011, Bertao et al. 2012, Yepes et al. 2014). The human parasite *S. stercoralis* cannot complete its development in immunocompetent mice and rats. Thus, attention has been focused on the related parasites *Strongyloides ratti* and *Strongyloides venezuelensis*, parasite of rats, to study host-parasite relationships (Sato and Toma 1990), and as general experimental models of intestinal parasitism (Yasuda et al. 2014).

In the present study, the efficacy of alkylphospholipid derivatives in killing *S. venezuelensis* was investigated using *in vitro* and *in vivo* approaches, comparing it to other APLs and assessing its potential as a chemotherapeutic alternative for the treatment of strongyloidiasis. Insights into the mode of action of edelfosine in killing *S. venezuelensis* larvae were also investigated using an *in vitro* approach.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Ethics statement**

The animal procedures in this study complied with the Spanish (L6/3013, RD 53/2013) and European Union (Di 2010/63/CE) regulations regarding animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals. The University of Salamanca's accredited Animal Experimentation Facilities (Registration number PAE/SA/001) were used for these procedures. The University of Salamanca's Ethics Committee also approved the procedures that were used in this study (Permit Number: 8402). The animals' health and welfare status was monitored throughout the experiments by a health surveillance program according to Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) guidelines and also by the University of Salamanca's standardized protocols. All efforts were made to minimize suffering.

### **2.2. Animals**

Sixty-nine six-week-old CD1 mice weighing 25-30 g and twelve male Wistar rats weighing 150-200 g (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were used for *in vivo* experiments and life cycle maintenance, respectively. Animals were maintained in the University of Salamanca's

Animal Care Facilities and kept in standard polycarbonate and wire cages with food and water *ad libitum* with regular 12 h light– dark periods and 20–22°C temperature. Animals at the end of the experimentation or those presenting any deterioration of the health status were humanely euthanized by intraperitoneal injection of a lethal dose of pentobarbital (100 mg/kg). Size of groups was calculated by power analysis (Charan and Kantharia 2013) using the “size.fdr” package for R and following the 3Rs recommendations (Festing and Altman 2002).

### 2.3. 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) was 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 (Mollinedo et al. 1997). Ivermectin was purchased from Sigma Aldrich and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 10 µM.

### 2.4. *S. venezuelensis* life cycle maintenance and parasitological techniques

The *S. venezuelensis* strain from Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais (Brazil) was maintained by serial passage in Wistar rats at the University of Salamanca’s animal care facilities since 2003, according to the procedure described by Martins et al. (Martins et al., 2000). Briefly, rats were subcutaneously infected with 6000 third stage larvae (L3) in 500 µL of phosphate buffered saline (PBS) using a 23-gauge needle syringe. Faeces from infected rats (5-14 days p.i.) were cultured with vermiculite and water at 28°C for 3-4 days and then L3 were recovered using a Baermann apparatus. Larvae were decontaminated by mild sodium hypochlorite treatment and exposure to an antibiotic and antifungal cocktail according to Martins et al. (2000). Absence of bacteria was confirmed by culturing L3 on a Petri plate containing blood- agar at 28 °C during 24 h. Faecal egg counts were performed by placing animals individually on grids over clean, moist absorbent paper and allowing them to defecate. Individual faecal samples were collected, preserved in a 10% formalin buffered solution and eggs were counted in triplicate samples using the McMaster technique. The upper halves of the small intestines of experimental rats were removed

at necropsy, cut longitudinally, minced and placed in a sedimentation cup wrapped by 8 layers of gauze in phosphate buffered saline for two hours at 37 °C. Parasitic females were collected from the sediment and counted.

## **2.5. Cytotoxicity in murine macrophages**

For cytotoxicity assays the mouse-derived peritoneal macrophage cell line J774.2 (Sigma-Aldrich) was used. Cells were maintained at 37 °C with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and cultured in plastic culture flasks with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich) and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). 200 µL of a suspension containing 2 x 10<sup>5</sup> macrophages/mL were added onto 96 well flat-bottom microplates (NUNC) and allowed to incubate for 2 h. After, APL's were added at different concentrations ranging from 1 to 100 µM for the next 48 h and 50 µL of XTT were added to each well and incubated again for 24 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Finally, 100 µL of DMSO (Sigma-Aldrich) were added to each well and the absorbance was measured at 492 nm using an ELISA-plate reader (Anthos 2010; Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Ivermectin-treated, untreated and DMSO-treated macrophages were used as controls. Each concentration was assayed in triplicate in three independent experiments and the IC<sub>50</sub> value for each APL was calculated by sigmoidal regression analysis (Gomez-Ayala et al. 2010).

## **2.6. *In vitro* activity of alkylphospholipids**

A batch of 7000 *S. venezuelensis* L3 were rinsed twice with PBS and 100 larvae per well were distributed in 24-well flat bottom culture plates. Larvae were incubated at 28 °C for 2 h to allow adaptation, and treated with edelfosine, miltefosine or perifosine in the range of 1 to 100 µM for 72 h as screening test (Keiser et al. 2008, Tritten et al. 2011, Olounlade et al. 2012). Mortality was assessed as the lack of any movement detected during 2 min of observation under the microscope (magnification 4x), at 24, 48 and 72 h after treatment. Video recordings were taken using an AM423 camera and DinoCapture software version 2.0, (Dino-Lite Digital microscope, Naarden, Holland). Larvae were considered dead when no movement was detected for at least two minutes of detailed examination. As controls, *S. venezuelensis* larvae were incubated in the presence of PBS or treated with ivermectin 10 µM. All experiments were carried out in triplicate and performed at three different times. The colorimetric XTT assay was also used for measuring larvae viability (Paull et al. 1988). After treatment, *S. venezuelensis* L3 were incubated with 50 µL of XTT for 24 h and the

absorbance was measured at 492 nm using an ELISA-plates reader (Anthos 2010; Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Untreated, heat-killed and ivermectin-treated *S. venezuelensis* L3 were used as controls. The antiparasitic activity of the compounds was expressed as the concentration able to kill 50 % of larvae (LD<sub>50</sub>) and it was calculated by sigmoidal regression analysis (Gomez-Ayala et al. 2010). The Selectivity Index (SI = mammalian cell IC<sub>50</sub>/ Larva LD<sub>50</sub>) for each compound was calculated to compare the strongyloidicidal activity with its respective mammalian cell cytotoxicity.

### **2.7. Viability of edelfosine-treated-L3 in mice**

*S. venezuelensis* L3 were rinsed twice with PBS and 100 larvae were distributed per well in 24-well flat bottom culture plates. Larvae were incubated with 5, 10, 20 and 40 µM of edelfosine for 24 h at 28 °C. Untreated-L3 and ivermectin-treated-L3 were used as controls. After incubation period larvae were carefully recovered, re-suspended in PBS and used to subcutaneously infect thirty-six CD1 mice randomly distributed in six groups with six animals each. Parasite eggs in faeces were monitored on days 5, 6 and 7 p.i. to assess the ability of edelfosine-treated-L3 to infect mice.

### **2.8. Edelfosine activity against *S. venezuelensis* infection in mice**

Two different experiments were performed to assess the *in vivo* activity of edelfosine. In the first experiment, mice were randomly distributed in three experimental groups with 5 mice per group as follows: Infected control; Infected and treated with ivermectin; Infected and treated with edelfosine. Ivermectin was administered orally at 0.2 mg/kg/day once on day 5 p.i. and edelfosine was administered at 20 mg/kg/day from the day of the infection to day 5 p.i. since migrant larvae and adults are present in human strongyloidiasis. All animals were infected by subcutaneous injection with 3000 L3 of *S. venezuelensis* resuspended in PBS. Edelfosine was administered to reach the therapeutic concentration synchronically with ivermectin after day 5 p.i. following previous studies (Yepes et al. 2014). Parasitic females were recovered from the gut and eggs in faeces were counted on day 7 p.i. using groups of five animals. In the second experiment, mice were randomly distributed in three experimental groups with six mice per group with the same groups as above and we conducted faecal egg counts on days 5, 9, 11, 15, 17 and 19 p.i.

### **2.9. Assessment of apoptosis-like cell death by TUNEL assay**

DNA fragmentation, which usually occurring in apoptosis-like cell death

was analysed by the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) technique as previously described (Gajate et al. 2009). Larvae were washed with PBS, centrifuged at 1500 rpm for 3 min, mounted on Poly-L-lysine-coated microscope slides (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and incubated for 24 h at 37 °C to stick the L3 to the slides. Larvae were then fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO) for 25 min, and washed with PBS as above. Fixed parasites were treated with trypsin and 0.25% EDTA, and stained for fragmented DNA using the Fluorescein Apoptosis Detection System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Propidium iodide was added for 15 min to stain nuclei of both apoptotic and non-apoptotic cells in red, whereas fluorescein-12-dUTP was incorporated at the 3'-OH ends of fragmented DNA resulting in localized green fluorescence within the nuclei of apoptotic cells. Samples were analysed with a Zeiss LSM 510 laser scan confocal microscope.

## **2.10. Statistical analysis**

Data are expressed as mean and standard deviation (SD). Test for normality was performed by Kolmogorov-Smirnov and homogeneity of variance was tested by the Barlett test. Then one-way ANOVA analysis of variance, followed by Tukey's honest significance (HDS) test was performed to determine any statistical differences between treated and untreated controls. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The data were processed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) for Mac.

## **3. Results**

### **3.1. Experimental infection and treatments**

All mice used in this study (69/69) remained alive during the whole time-course experiments. According to our health surveillance program the status health of all animals used here was optimal during the experimentation. Any symptoms of severe pain, excessive distress, suffering or an impending death were observed in any of the animals. The success of the experimental infection was verified in each mouse by the observation of larvae released in the faeces, demonstrating that all animals were infected. Daily oral administration of 20 mg/kg edelfosine and 0,2 mg/kg ivermectin were well tolerated by CD1 mice in all experiments.

### **3.2. Cytotoxicity in murine macrophages**

Cytotoxicity of each compound was evaluated the in macrophage cell

line by calculating the  $IC_{50}$  for each APL, at six different concentrations. APL cytotoxicity was ranked as follow: edelfosine ( $IC_{50} 53.4 \pm 5.3 \mu M$ ) < perifosine ( $IC_{50} 52.8 \pm 6.3 \mu M$ ) < miltefosine ( $IC_{50} 27.3 \pm 3.8 \mu M$ ), thus showing that edelfosine is the less toxic compound to the macrophages (Table 1).

### **3.3. *In vitro* activity of APLs against *S. venezuelensis* third stage larvae**

First, *in vitro* the anti-*Strongyloides* activity of edelfosine, miltefosine and perifosine were analysed through XTT assay after 72 h of incubation using L3 cultures with a range of 1-100  $\mu M$ . Edelfosine showed the highest efficacy in killing the parasite, being effective at  $\geq 40 \mu M$  with a  $LD_{50}$  value of  $49.6 \pm 5.3 \mu M$  evaluated by the XTT assay (Fig. 2). It would be necessary to administer edelfosine 80 or 100  $\mu M$  to attain efficacy similar activity to that of ivermectin, the drug of choice for treating strongyloidiasis ( $L_{50} = 0.41 \pm 0.12 \mu M$ ). Miltefosine and perifosine also showed efficacy in killing the parasite at higher concentrations, but their anti-*Strongyloides* activity seems rather poor as compared to either edelfosine or ivermectin ( $LD_{50} = 85.7 \pm 8.7 \mu M$  and  $LD_{50} = 90.6 \pm 10.5 \mu M$ , respectively; Fig. 2). Edelfosine also showed the highest Selectivity Index as demonstrated by the SI value, ranked as follows: edelfosine (SI 1.1) > perifosine (SI 0.6) > miltefosine (SI, 0.6).

### **3.4. Dose- and time-dependent effects of APLs on *S. venezuelensis* larvae**

How the dose and the time of action of APL derivatives affected the parasites were investigated and microscopic observation of larvae incubated was performed at 24, 48 and 72h to determine decrease in motor activity. As shown in S1-S3 videos, edelfosine's activity is time and dose-dependent, reaching its maximum efficacy at 72h showing mortality of *S. venezuelensis* L3 equal to 92% at 80  $\mu M$  and 100% at 100  $\mu M$ . These results were similar to those obtained with ivermectin at 10  $\mu M$ . At 48 h significant efficacy of edelfosine (about 50%) was also found with 80 and 100  $\mu M$  (videos S1-S3). Miltefosine's activity was also time and dose dependent and it was inferior to that of edelfosine, showing its maximum activity at 100  $\mu M$  being close to 54% of reduction in larvae motility (videos S4-S6). Perifosine was the ALP with the lowest activity against larvae. Only at higher concentrations ( $\geq 80 \mu M$ ) and after 72 h of treatment perifosine reached a significant reduction of larvae motility (66%) (videos S7-S9). Untreated *S. venezuelensis* larvae remained alive during the next 72 h after being cultured, reaching a motility of around 92%, whilst ivermectin-treated larvae were completely killed at 10  $\mu M$  after 24 h of treatment.

### **3.5. Edelfosine treated-L3 are not able to infect mice.**

In order to complete the assessment of the lethal effect of edelfosine L3 cultures were treated with increasing concentrations of the drug, and after 24 h they were used to infect mice. Egg laying was monitored until day 7 p.i. It was observed that L3 treated with edelfosine at 20-40  $\mu\text{M}$  for 24 h were unable to develop patency in mice because no-eggs were found in faeces of mice challenged with these larvae. Similarly, mice challenged with ivermectin-treated-L3 (Fig. 3). In contrast, animals treated with 1-10  $\mu\text{M}$  developed patent infections but with a significant reduction in eggs per gram of faeces compared to infected controls (Fig. 3).

### **3.6. Edelfosine in vivo activity in mice infected by *S. venezuelensis***

CD1 mice were subcutaneously infected with 3000 *S. venezuelensis* larvae and then orally treated with edelfosine during five consecutive days in order to reach a therapeutic level of the drug after day 5 p.i. when larvae are finishing their migration and reaching maturity and first eggs appear in faeces. In the first experiment, a significant reduction of 47% was observed in parthenogenetic females recovered from small intestines of edelfosine-treated mice on day 7 p.i. ( $350 \pm 162$  females) compared to infected controls ( $661 \pm 259$  females). A non-significant reduction in faecal egg counts (23 %) was observed on day 7 p.i ( $65577 \pm 10402$  EPG *cf*  $85171 \pm 41012$  EPG; Fig. 4). In the second experiment to assess the efficacy on egg laying curves significant reductions of faecal egg counts were observed from day 9 to the end of the experiment (Fig. 5).

### **3.7. Assessment of apoptosis-like cell death by TUNEL assay**

The above results suggested that edelfosine induced killing of *S. venezuelensis* larvae. *S. venezuelensis* L3 larvae treated with 100  $\mu\text{M}$  edelfosine for 72h were analysed for the induction of a putative apoptosis-like death by using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) technique for detecting DNA fragmentation. Labelling of the 3'-OH ends of fragmented DNA with fluorescein-12- dUTP allowed visualization of apoptotic-like cells. Cells were permeabilized and stained with propidium iodide to visualize nuclei from both non-apoptotic and apoptotic cells in red, whereas TUNEL-positive cells, representing apoptotic cells, were stained in green. As shown in Fig. 6, a potent and extensive DNA fragmentation along the whole parasite was found, suggesting an apoptosis-like response in edelfosine-treated *S. venezuelensis* L3 larvae along the whole parasite.

#### 4. Discussion

The present study provides the first insights into the chemotherapeutic potential of the edelfosine against the infection caused by the nematode *S. venezuelensis* in a murine model. The study employed a series of *in vitro* and *in vivo* experiments and also reveals an approximation to its mode of action using the TUNEL assay. The APLs are a group of molecules, which have shown a wide variety of biological functions and have also been assayed against several protozoa, nematodes and trematodes. There are not previous reports in the literature concerning the use APLs for the treatment of strongyloidiasis. Here edelfosine showed the more potent activity against larval *S. venezuelensis in vitro* than other APLs ranked as follows: edelfosine > miltefosine > perifosine. It was also demonstrated that the efficacy of edelfosine in *S. venezuelensis* infections in mice. Although its activity is not as effective as ivermectin, currently the primary drug for treatment of strongyloidiasis, our data suggests that oral treatment with edelfosine decreases significantly both the number of eggs per gram of faeces and the number of parasitic female worms in the gut of mice. This efficacy is in concordance with the schistomicidal activity against adults *in vitro* and *in vivo* and the reduction of tissue egg burden in mice treated orally with edelfosine (Yepes et al. 2014). Moreover, a combination of edelfosine and praziquantel has demonstrated efficacy against schistosomula (Yepes et al. 2015). There is also evidence that edelfosine is active against embryos and eggs of *Caenorhabditis elegans* (Sanchez- Blanco et al. 2014). Furthermore, edelfosine is active against protozoa such as *Leishmania major*, *L panamensis* and *L. braziliensis* in infected macrophage in culture and in experimental infections in mice and hamsters (Varela et al. 2012). In *S. venezuelensis* infection, faecal eggs are found on day 5 p.i. peaking on days 7-8 p.i. and are cleared by 20 days p.i. allowing to assess new drugs in a short time. Moreover, is a synchronous infection permitting to study the effect on each parasitic phase. Edelfosine needs around 5 days to reach therapeutical concentration (Yepes et al. 2014) thus its administration had to start at the time of infection to reach therapeutical concentrations at the time when most of the parasites are adults. Further studies should be carried out to address the use of edelfosine as an alternative or preventive treatment.

In addition, induction of apoptosis-like cell death was observed in *S. venezuelensis* larvae following edelfosine treatment as assessed by TUNEL assay. The data reported here indicate that edelfosine induces DNA strand breaks in *S. venezuelensis* larvae, likely through an apoptosis-like cell death mechanism involved in the antiparasitic action of edelfosine. This suggests a major role of an apoptosis-like response in the cell death



mechanism but additional putative mechanisms cannot be ruled out. This is in agreement with the ability of edelfosine to promote apoptosis or apoptosis-like cell death in a number of distinct cell targets, including cancer cells (Gajate and Mollinedo 2007) as well as *Leishmania* and *Schistosoma* parasites (Varela et al. 2012, Yepes et al. 2015) as visualized by TUNEL assays. It has also been observed that apoptosis could be an effective mechanism using nitric oxide donors in *S. venezuelensis* larvae and *in vitro* cultures of adults (Ruano et al. 2012). Activated macrophages and treatment with edelfosine could be synergistic against this nematode.

Since its introduction for the treatment of strongyloidiasis, ivermectin was considered the drug of choice for this purpose together with albendazole, mebendazole and thiabendazole. All these drugs have broad-spectrum anthelmintic effect and have been used widely against human and veterinary parasites. Benzimidazole and ivermectin resistant-nematode strains have also been reported in grazing livestock (von Samson- Himmelstjerna 2012, Shalaby 2013) and the issue of decreased susceptibility in human nematodes or the possibility of resistance is also increasing (Geerts and Gryseels 2000, Osei-Atweneboana et al. 2011, Vercruysse et al. 2011). Moreover, ivermectin treatment failure has also been observed in coinfecting patients with *S. stercoralis* and human T- lymphotropic virus-1 (HTLV-1) and also adverse events linked to sensitive human genotypes (Carvalho and Da Fonseca Porto 2004, Bourguinat et al. 2010). These situations make the identification of alternative chemotherapies a high priority issue.

Our results indicate that edelfosine significantly reduces worm recovery and egg laying in experimental infections and kills L3 *in vitro* through an apoptotic-like cell death mechanism. The proapoptotic activity of edelfosine as a putative mechanism opens the possibility to combination of drugs that could promote a synergistic action or minimize the possibility of drug resistance (Panic et al. 2014). In addition, edelfosine offers additional advantages as an antiparasitic drug, such as the activity against different tumoral cells (Mollinedo et al. 2010), and the anti-inflammatory activity shown by this APL together with its low toxicity profile (Mollinedo et al. 2009), could be of interest in treatment of strongyloidiasis patients coinfecting with *Leishmania* or *Schistosoma* parasites (Yepes et al. 2014).

In conclusion, strongyloidicidal activity of the alkylphospholipid edelfosine against *S. venezuelensis* was demonstrated using L3 cultures and a strongyloidiasis murine model, possibly through induction of apoptosis-like cell death. It was found significant reductions in egg burden, and it might thus warrant further investigation in other in order to establish the advantage as a therapeutic drug in soil-transmitted helminthic infections.

## Acknowledgements

We want to thank systems engineer John Jorge Muñoz Quijano for his technical support in producing and editing the videos and F.J. Burguillo Muñoz, University of Salamanca for the statistical analysis support.

## Funding

This work has been supported by Proyectos Integrados IBSAL (IBY15/00003; Salamanca, Spain; Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-30518, SAF2014-59716-R, and RD12/0036/0065 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union), and the European Community's Seventh Framework Programme FP7-2007-2013 (grant HEALTH-F2-2011-256986, PANACREAS).

**Competing interest:** The authors declare that they have no competing interest.

## Appendix A. Supplementary data

Videos. The effect of alkylphospholipids, edelfosine (videos S1-S3), miltefosine (videos S4-S6) and perifosine (videos S7-S9) on *S. venezuelensis* larvae was scored as change in the pattern of motility in videos. Mortality was attributed as any movement detected during 2 min of observation under the microscope (magnifications 4x) [1], at 24, 48 and 72 h. Untreated *S. venezuelensis* larvae and ivermectin-treated larvae are also shown in each supplementary video.

Links to videos:



## References

- AbouLaila, M., Batadoj, D., Salama, A., Munkhjargal, T., Ichikawa-Seki, M., M, A.T., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2014. Evaluation of the inhibitory effects of miltefosine on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vet Parasitol.* 204, 104-110. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.05.023.
- Bertao, H.G., da Silva, R.A., Padilha, R.J., de Azevedo Albuquerque, M.C., Radis-Baptista, G., 2012. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res.* 110, 2465-2473. doi: 10.1007/s00436-011-2786-5.
- Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Mendez, A., Munoz, J., Krolewiecki, A.J., Gotuzzo, E., Mena, M.A., Chiodini, P.L., Anselmi, M., Moreira, J., Albonico, M., 2013. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. *PLoS Negl Trop Dis.* 7, e2214. doi:

10.1371/journal.pntd.0002214.

- Bourguinat, C., Kamgno, J., Boussinesq, M., Mackenzie, C.D., Prichard, R.K., Geary, T.G., 2010. Analysis of the *mdr-1* gene in patients co-infected with *Onchocerca volvulus* and *Loa loa* who experienced a post-ivermectin serious adverse event. *Am J Trop Med Hyg.* 83, 28-32. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0734. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0734.
- Carvalho, E.M., Da Fonseca Porto, A., 2004. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol.* 26, 487-497.
- Charan, J., Kantharia, N.D., 2013. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 4, 303-306. doi: 10.4103/0976-500X.119726.
- Debache, K., Hemphill, A., 2012. Effects of miltefosine treatment in fibroblast cell cultures and in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology.* 139, 934-944. doi: 10.1017/S0031182012000066.
- Eissa, M.M., Amer, E.I., 2012. *Giardia lamblia*: a new target for miltefosine. *Int J Parasitol.* 42, 443-452.
- Eissa, M.M., El-Azzouni, M.Z., Amer, E.I., Baddour, N.M., 2011. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. *Int J Parasitol.* 41, 235-242. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.09.010.
- Festing, M.F., Altman, D.G., 2002. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 43, 244-258.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0005044.
- Gajate, C., Mollinedo, F., 2002. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab.* 3, 491-525.
- 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.
- Geerts, S., Gryseels, B., 2000. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin Microbiol Rev.* 13, 207-222.
- Gomez-Ayala, S., Castrillon, J.A., Palma, A., Leal, S.M., Escobar, P., Bahsas, A., 2010. Synthesis, structural elucidation and *in vitro* antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-benzazepine derivatives. *Bioorg Med Chem.* 18, 4721-4739. doi: 10.1016/j.bmc.2010.05.018.

- Igual-Adell, R., Oltra-Alcaraz, C., Soler-Company, E., Sanchez-Sanchez, P., Matogo-Oyana, J., Rodriguez-Calabuig, D., 2004. Efficacy and safety of ivermectin and thiabendazole in the treatment of strongyloidiasis. *Expert Opin Pharmacother.* 5, 2615-2619.
- Keiser, J., Thiemann, K., Endriss, Y., Utzinger, J., 2008. *Strongyloides ratti*: *in vitro* and *in vivo* activity of tribendimidine. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e136. doi: 10.1371/journal.pntd.0000136.
- Luna, K.P., Hernandez, I.P., Rueda, C.M., Zorro, M.M., Croft, S.L., Escobar, P., 2009. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomedica.* 29, 448-455.
- Martins, W.A., Melo, A.L., Nicoli, J.R., Cara, D.C., Carvalho, M.A., Lana, M.A., Vieira, E.C., Farias, L.M., 2000. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J Med Microbiol.* 49, 387-390.
- Mollinedo, F., de la Iglesia-Vicente, J., Gajate, C., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Villa-Pulgarin, J.A., Campanero, M.A., Blanco-Prieto, M.J., 2010. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene.* 29, 3748-3757. doi: 10.1038/onc.2010.131.
- Mollinedo, F., Fernandez-Luna, J.L., Gajate, C., Martin-Martin, B., Benito, A., Martinez-Dalmau, R., Modolell, M., 1997. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res.* 57, 1320-1328.
- Mollinedo, F., Gajate, C., Martin-Santamaria, S., Gago, F., 2004. ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem.* 11, 3163-3184.
- Mollinedo, F., Gajate, C., Morales, A.I., del Canto-Janez, E., Justies, N., Collia, F., Rivas, J.V., Modolell, M., Iglesias, A., 2009. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 329, 439-449. doi: 10.1124/jpet.108.148254.
- Montes, M., Sawhney, C., Barros, N., 2010. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis.* 23, 500-504. doi: 10.1097/QCO.0b013e32833df718.
- Olounladé, P.A., Azando, E.V., Hounzangbé-Adoté, M.S., Ha, T.B., Leroy, E., Moulis, C., Fabre, N., Magnaval, J.F., Hoste, H., Valentin A., 2012. *In vitro* anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. *Parasitol Res* 110:1427-1433. doi: 10.1007/s00436-011-2645-4.

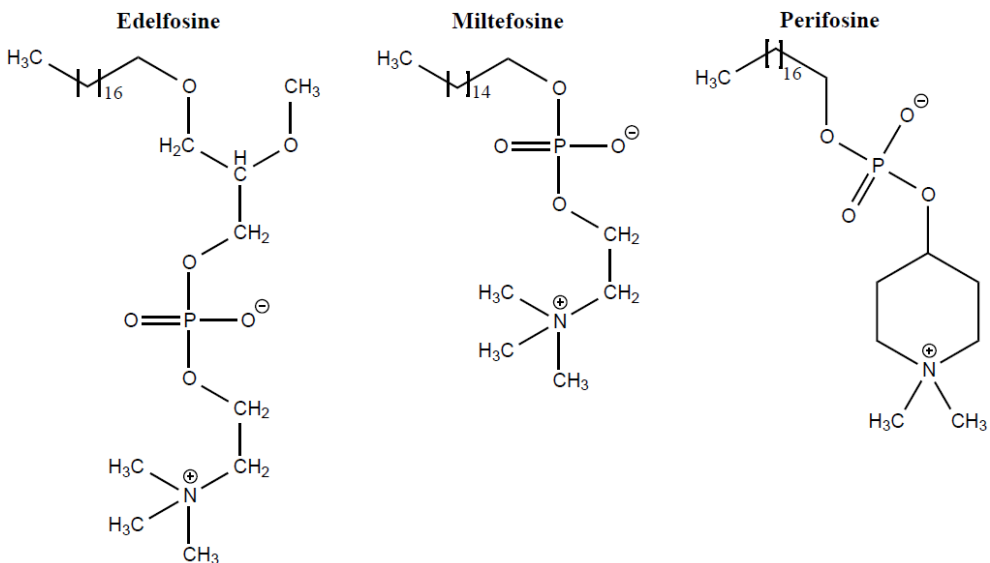
- Osei-Atweneboana, M.Y., Awadzi, K., Attah, S.K., Boakye, D.A., Gyapong, J.O., Prichard, R.K., 2011. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. PLoS Negl Trop Dis. 5, e998. doi: 10.1371/journal.pntd.0000998.
- Panic, G., Duthaler, U., Speich, B., Keiser, J., 2014. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 4, 185-200. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.07.002.
- Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., Parsons, J.L., Risbood, P.A., Barbera, W.A., 1988. The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. J Heterocyclic Chem. 25, 911 - 914.
- Pitisuttithum, P., Supanaranond, W., Chindanond, D., 1995. A randomized comparative study of albendazole and thiabendazole in chronic strongyloidiasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 26, 735-738.
- Polat, Z.A., Obwaller, A., Vural, A., Walochnik, J., 2012. Efficacy of miltefosine for topical treatment of *Acanthamoeba keratitis* in Syrian hamsters. Parasitol Res. 110, 515-520. doi: 10.1007/s00436-011-2515-0.
- Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J., Chen, X., 2014. Strongyloidiasis--an insight into its global prevalence and management. PLoS Negl Trop Dis. 8, e3018. doi: 10.1371/journal.pntd.0003018.
- Rocha, D.A., de Andrade Rosa, I., de Souza, W., Benchimol, M., 2014. Evaluation of the effect of miltefosine on *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res. 113, 1041-1047. doi: 10.1007/s00436-013-3738-z.
- Ruano, A.L., Lopez-Aban, J., Gajate, C., Mollinedo, F., De Melo, A.L., Muro, A., 2012. Apoptotic mechanisms are involved in the death of *Strongyloides venezuelensis* after triggering of nitric oxide. Parasite Immunol. 34, 570-580. doi: 10.1111/pim.12004.
- Sanchez-Blanco, A., Rodriguez-Matellan, A.G., Reis-Sobreiro, M., Saenz-Narciso, B., Cabello, J., Mohler, W.A., Mollinedo, F., 2014. *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. Cell Cycle. 13, 3375-3389. doi: 10.4161/15384101.2014.952183.
- Sato, Y., Toma, H., 1990. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. Int J Parasitol. 20, 57-62.
- Schar, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., Odermatt, P., 2013. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. PLoS Negl Trop Dis. 7, e2288. doi: 10.1371/journal.pntd.0002288.
- Shalaby, H.A., 2013. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? Iran J Parasitol. 8, 18-32.

- Sharifdini, M., Kia, E.B., Ashrafi, K., Hosseini, M., Mirhendi, H., Mohebbali, M., Kamranrashani, B., 2014. An Analysis of Clinical Characteristics of *Strongyloides stercoralis* in 70 indigenous patients in Iran. *Iran J Parasitol.* 9, 155-162.
- Stuart, M.C., Kouimtzis, M., Hill, S.R., 2009. WHO Model Formulary. World Health Organization. Geneva, 644.
- Suputtamongkol, Y., Premasathian, N., Bhumimuang, K., Waywa, D., Nilganuwong, S., Karuphong, E., Anekthananon, T., Wanachiwanawin, D., Silpasakorn, S., 2011. Efficacy and safety of single and double doses of ivermectin versus 7-day high dose albendazole for chronic strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 5, e1044. doi: 10.1371/journal.pntd.0001044.
- Tritten, L., Silbereisen, A., Keiser, J., 2011. *In vitro* and *in vivo* efficacy of Monepantel (AAD 1566) against laboratory models of human intestinal nematode infections. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1457. doi: 10.1371/journal.pntd.0001457.
- Varela, M.R., Villa-Pulgarin, J.A., Yepes, E., Muller, I., Modolell, M., Munoz, D.L., Robledo, S.M., Muskus, C.E., Lopez-Aban, J., Muro, A., Velez, I.D., Mollinedo, F., 2012. *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 6, e1612. doi: 10.1371/journal.pntd.0001612.
- Vercruyse, J., Albonico, M., Behnke, J.M., Kotze, A.C., Prichard, R.K., McCarthy, J.S., Montresor, A., Levecke, B., 2011. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 1, 14-27. doi: 10.1016/j.ijpddr.2011.09.002.
- von Samson-Himmelstjerna, G., 2012. Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol.* 185, 2-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.10.010.
- Yasuda, K., Matsumoto, M., Nakanishi, K., 2014. Importance of Both Innate Immunity and Acquired Immunity for Rapid Expulsion of *S. venezuelensis*. *Front Immunol.* 5, 118. doi: 10.3389/fimmu.2014.00118.
- Yepes, E., Varela, M.R., Lopez-Aban, J., Dakir el, H., Mollinedo, F., Muro, A., 2014. *In vitro* and *in vivo* anti-schistosomal activity of the alkylphospholipid analog edelfosine. *PLoS One.* 9, e109431. doi: 10.1371/journal.pone.0109431.
- Yepes, E., Varela, M.R., Lopez-Aban, J., Rojas-Caraballo, J., Muro, A., Mollinedo, F., 2015. Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis.* 9, e0003893. doi: 10.1371/journal.pntd.0003893.

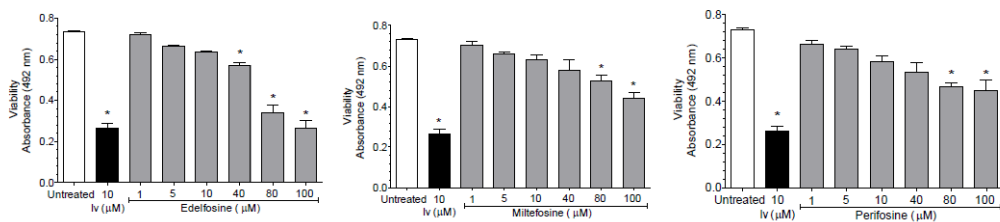
**Table 1.** Cytotoxic effects of alkylphospholipids edelfosine, miltefosine and perifosine on mouse-derived macrophages cell line J774.2 using the XTT assay (mean  $\pm$ standard deviation).

Concentration ( $\mu$ M)	Edelfosine (OD)	Miltefosine (OD)	Perifosine (OD)	Ivermectin (OD)
Untreated	1.699 $\pm$ 0.013	1.635 $\pm$ 0.023	1.681 $\pm$ 0.031	1.639 $\pm$ 0.025
1	1.551 $\pm$ 0.010	1.578 $\pm$ 0.068	1.575 $\pm$ 0.081	0.844 $\pm$ 0.038*
5	1.540 $\pm$ 0.022	1.557 $\pm$ 0.025	1.542 $\pm$ 0.023	0.747 $\pm$ 0.039*
10	1.474 $\pm$ 0.097	1.098 $\pm$ 0.338*	1.320 $\pm$ 0.225	0.662 $\pm$ 0.058*
40	0.930 $\pm$ 0.060*	0.765 $\pm$ 0.086*	0.922 $\pm$ 0.027*	0.575 $\pm$ 0.075*
80	0.792 $\pm$ 0.074*	0.694 $\pm$ 0.021*	0.864 $\pm$ 0.200*	0.324 $\pm$ 0.002*
100	0.611 $\pm$ 0.021*	0.490 $\pm$ 0.053*	0.419 $\pm$ 0.035*	0.282 $\pm$ 0.047*
ANOVA	$F_{(5, 28)} = 162.6$ $P < 0.001$	$F_{(5, 28)} = 29.3$ $P < 0.001$	$F_{(5, 28)} = 36.8$ $P < 0.001$	$F_{(5, 28)} = 65.4$ $P < 0.001$

OD: Optical density at 492 nm. \* Significant toxicity compared to untreated control group *post-hoc* Tukey's honest significance test  $P < 0.001$ .

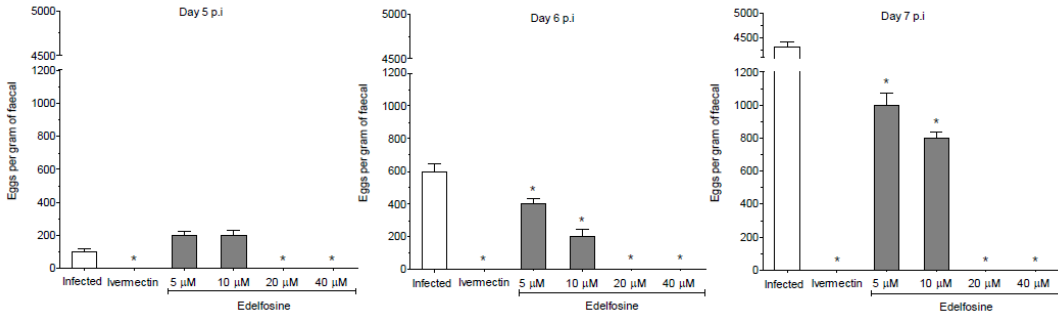


**Fig. 1.** The chemical structure of the alkylphospholipids edelfosine, miltefosine and perifosine.

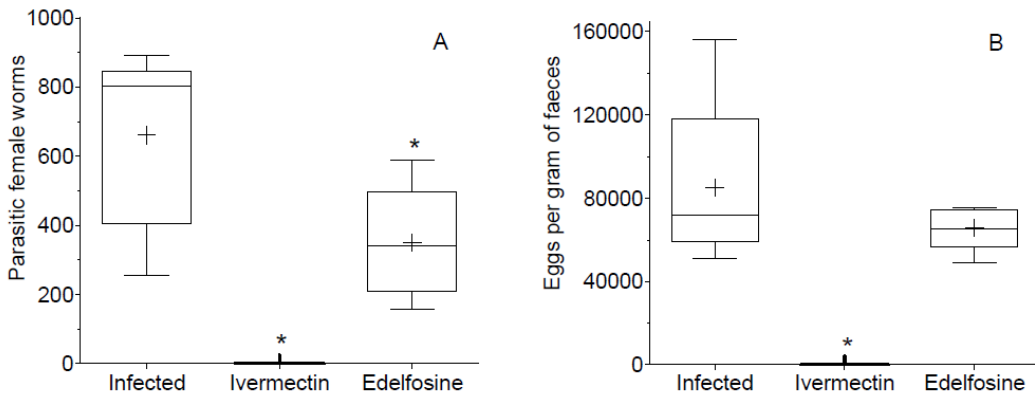


**Fig. 2.** *In vitro* effects of edelfosine, miltefosine and perifosine on the viability of *S. venezuelensis* third stage larvae by the XTT assay (mean  $\pm$  SD) cultured for 72 h. ANOVA: edelfosine  $F_{(7, 40)} = 294.0$ ,  $P < 0.001$ ; miltefosine  $F_{(7, 40)} = 99.3$ ,  $P < 0.001$ ; perifosine  $F_{(7, 40)} = 85.6$   $P < 0.001$  \* Significant reduction compared to untreated control group post-hoc Tukey's honest significance test  $P < 0.001$

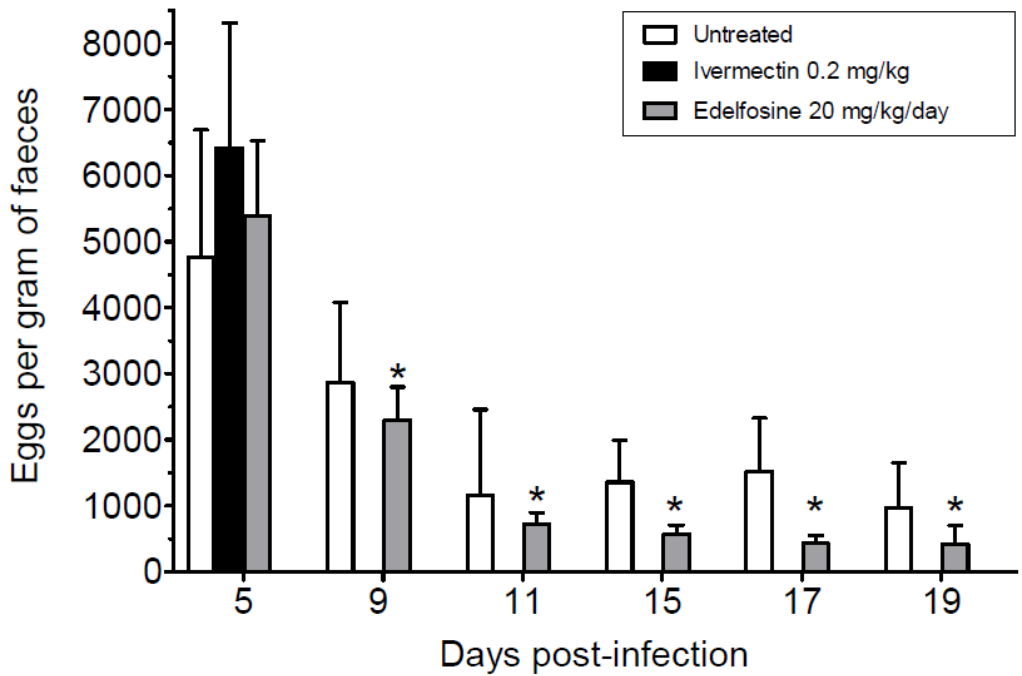




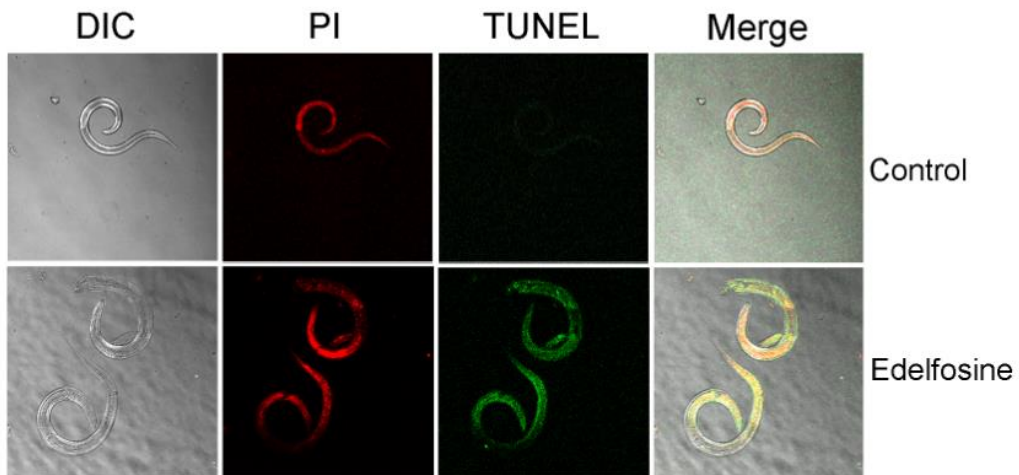
**Fig. 3.** Faecal egg production (mean  $\pm$  SD) in mice infected with third stage larvae treated with increasing concentrations of edelfosine. ANOVA: edelfosine  $F_{(5, 29)} = 92.1$ ,  $P < 0.001$ ; miltefosine  $F_{(5, 29)} = 69.1$ ,  $P < 0.001$ ; perifosine  $F_{(5, 29)} = 49.5$ ,  $P < 0.001$  \* Significant reduction compared to untreated control group *post-hoc* Tukey's honest significance test  $P < 0.05$ .



**Fig. 4.** Box-plots plus means (+) showing effects of the treatment with edelfosine and ivermectin in mice infected with 3000 *S. venezuelensis* L3 on day 7 post-infection in (A) parasitic females recovered from the intestine and (B) faecal egg count. ANOVA: parasitic females  $F_{(2, 12)} = 17.5$ ,  $P < 0.001$ ; faecal egg count  $F_{(2, 12)} = 16.7$ ,  $P < 0.001$ . \*Significant reduction compared to untreated control group *post-hoc* Tukey's honest significance test  $P < 0.01$ .



**Fig. 5.** Faecal egg emission (mean  $\pm$ SD) in mice infected with 3000 *S. venezuelensis* and treated with edelfosine and ivermectin on days 5, 9, 11, 15, 17 and 19 post-infection. ANOVA: day 9 p.i.  $F_{(2, 15)} = 24.2$ ,  $P < 0.001$ ; day 11 p.i.  $F_{(2, 15)} = 3.7$ ,  $P = 0.049$ ; day 15 p.i.  $F_{(2, 15)} = 19.8$ ,  $P < 0.001$ ; day 17 p.i.  $F_{(2, 15)} = 16.6$ ,  $P < 0.001$ ; day 19 p.i.  $F_{(2, 15)} = 7.5$ ,  $P = 0.005$ . \* Significant reduction in edelfosine treated mice compared to untreated control group *post-hoc* Tukey's honest significance test  $P < 0.05$ .



**Figure 6. Assessing the apoptotic effect of edelfosine using the TUNEL assay.** *S. venezuelensis*-L3 were treated with 100  $\mu$ M edelfosine for 72 h, and then analysed by confocal microscopy for propidium iodide staining (PI), visualizing in red all the parasite cells (A), TUNEL assay, staining in green the cells with disrupted DNA, and differential interference contrast (DIC). Merged images of PI and TUNEL panels show the apoptotic nuclei in yellow. Data shown are representative of four experiments performed.



# CAPÍTULO 4

---

## ANEXO METODOLÓGICO

---

### 4.1 Compuestos

#### 4.1.1 Síntesis de aminoalcanoles y alcanodiaminas

El grupo de investigación QF-CIETUS tiene una amplia experiencia en la obtención de derivados de 2-aminoalcan-1-oles y alcano-1,2-diamina (del Olmo et al., 2002, 2006). Procedimiento aplicado para la obtención de algunos de los compuestos ensayados en este trabajo de Tesis Doctoral. En la figura 4.1 se resume el proceso de síntesis de estos compuestos.

La síntesis de los compuestos comienza con la obtención de los alquil-aminoácidos **I** con tres largos de cadena (dodecil n= 9, hexadecil n= 13 y octadecil n= 15). El grupo amino se protege en forma de *tert*-butilcarbamato (*Boc*), compuestos **II**, y el grupo ácido se reduce a alcohol, previa formación de un anhídrido mixto y reducción con borohidruro sódico para dar los compuestos **III** (del Olmo et al., 2002). La retirada del grupo protector *Boc* con ácido trifluoroacético da lugar a las aminas libres (compuestos **1-3**). El alcohol primario se convierte en un éter bencílico, compuestos **IV**, después se retira el grupo protector *Boc*, compuestos **V** y la amina libre se alquila (etilo: Et, butilo: Bu, hexilo: Hex) compuestos **VI**. La hidrogenación catalizada con paladio (Pd) del grupo éter bencílico proporciona los alcoholes primarios libres **VII**.

Las alcano1,2-diaminas se obtienen a partir de los alcoholes *Boc*-aminoalcoholes **III**, por transformación del alcohol en un mesil derivado, luego en una azida y su reducción genera las *Boc*-diaminas **VIII**. La amina libre se alquila (Et, Bu ó Hex) para dar los compuestos **IX**. La eliminación de carbamato por hidrólisis en medio ácido genera las diaminas **X**.

Todos los compuestos se obtienen en forma de mezclas racémicas y son caracterizados mediante sus propiedades físico-químicas y espectroscópicas; de infrarrojos (IR), espectrometría de Masas (MS), espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN).

En la figura 4.1 se indica el esquema de obtención de los aminoalcoholes y las alcanodiaminas, en **fucsia** están indicados los números de los compuestos del artículo 1 y en **verde** los del artículo 3.

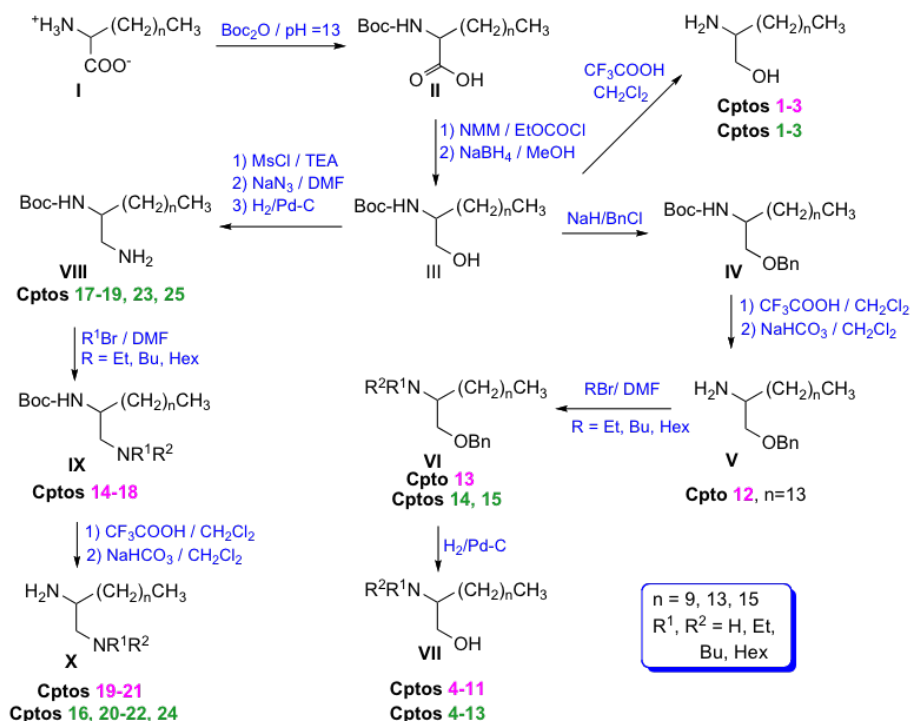
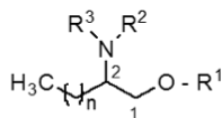
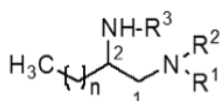


Figura 4.1: Esquema de obtención de aminoalcoholes y diaminas.

#### 4.1.2 Alquilfosfolípidos

La edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) se obtuvo de R. Berchtold (Biochemisches Labor, Bern, Switzerland), miltefosina (hexadecilfosfocolina) de Calbiochem (Cambridge, MA) y perifosina (octadecil-(1,1-dimetil-piperidinio-4-il)-fosfato) de Zentaris (Frankfurt, Alemania). Se prepararon soluciones estándar de estos compuestos en medio de cultivo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute* medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB - Sigma-Aldrich) inactivado por calor, 2 mM glutamina (Gibco-Invitrogen), 100 IU/mL penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomicina (Sigma-Aldrich).



Diaminas	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	Aminoalcoholes	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n
14 [17]	H	H	Boc	9	1 [1]	H	H	H	9
15 [18]	H	H	Boc	13	2 [2]	H	H	H	13
16 [19]	H	H	Boc	15	3 [3]	H	H	H	15
17 [23]	Hex	H	Boc	13	4 [8]	H	H	Hex	9
18 [25]	Hex	Hex	Boc	13	5 [4]	H	H	Et	13
19 [16]	H	H	H	13	6 [6]	H	H	Bu	13
20 [22]	Hex	H	H	13	7 [9]	H	H	Hex	13
21 [24]	Et	Et	H	13	8 [10]	H	H	Hex	15
[20]	Et	H	H	13	9 [12]	H	Bu	Bu	9
[21]	Bu	H	H	13	10 [11]	H	Et	Et	13
					11 [13]	H	Bu	Bu	13
					12 [14]	Bn	H	H	13
					13 [15]	Bn	H	Bu	9
					[5]	H	H	Bu	9
					[7]	H	H	Bu	15
					[8]	H	H	Hex	9

Tabla 4.1: Aminoalcoholes y alcanodiaminas ensayadas en este trabajo. En **fucsia** están indicados los números de los compuestos del artículo 1, y en **verde** los del artículo 3.

Para los ensayos con *T. cruzi* se utiliza nifurtimox, como control positivo de mortalidad y en los experimentos con *S. venezuelensis* se utiliza ivermectina, fármaco de elección para el tratamiento de la estrongiloidosis.

## 4.2 Material biológico

### 4.2.1 Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

En este trabajo se utilizan tres cepas de epimastigotes de *T. cruzi*. Dos cepas provienen de aislamientos de casos humanos infectados con *T. cruzi* de distinta procedencia biológica y geográfica (Tabla 4.2). La otra cepa de epimastigotes utilizada es la denominada CL Brener, clon B5 (CL-B5) con el gen de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (*lacZ*) (Le-Senne et al., 2002). Los epimastigotes se mantienen a 28 °C en medio de cultivo Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado con SFB inactivado por calor al 10% v/v,

penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (0,1 mg/mL). Los epimastigotes se recuperan durante la fase logarítmica de crecimiento para los ensayos *in vitro*. La viabilidad de los epimastigotes se determina mediante tinción con azul de tripán y conteo en cámara de Neubauer. Todas las cepas de epimastigotes fueron cultivadas bajo las mismas condiciones.

Código Internacional	País	Ciudad	Hospedador	Fase	Grupo / Haplotipo
MHOM/CO/04/MG	Colombia	Saravena	<i>Homo sapiens</i>	Aguda	I / Ib
MHOM/CO/05/JEM	Colombia	Mocoa	<i>Homo sapiens</i>	Aguda	I / Ia

Tabla 4.2: Principales características de las cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en este estudio.

#### 4.2.2 Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Los cultivos de epimastigotes de la cepa CL-B5 y en fase estacionaria de crecimiento (a los 14 días de cultivo) se usan para infectar fibroblastos de ratón NCTC-929 para obtener tripomastigotes derivados de cultivo (Saraiva et al., 2007). Después de 24h de cultivo a 33 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, los cultivos infectados se lavan con tampón fosfato salino 1X (PBS) para eliminar los epimastigotes que no infectaron fibroblastos. Los tripomastigotes derivados de cultivo se recuperan del sobrenadante después de una semana de incubación bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura.

#### 4.2.3 Ciclo biológico de *Strongyloides venezuelensis*

La cepa de *S. venezuelensis* que se mantiene en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, procede del Laboratorio de Parasitología de la Universidad Federal de Minas Gerais (Brasil) desde el año 2003.

Para el mantenimiento del ciclo biológico de *S. venezuelensis* se utilizan ratas Wistar macho, con un peso comprendido entre 60 a 120 g procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se alojan en jaulas de policarbonato y alambre, manteniéndose dentro de un aislador con flujo laminar (Pharmatechnik, Emmendingen, Alemania). Los animales tienen acceso libre a comida y agua, con condiciones controladas de luz (12h luz / 12h oscuridad) y la temperatura se mantiene constante entre 24 - 27 °C.

El ciclo se realiza según la técnica descrita por Martins et al. (1999). Las heces de ratas infectadas con *S. venezuelensis* se recogen 5 - 15 días después de la infección y se mezclan con vermiculita para permitir el desarrollo de los



huevos del parásito hasta el tercer estadio larvario (L3). Después de cuatro días de incubación a 28 °C con humedad relativa superior al 80%, se recogen las L3 mediante la técnica de Baermann (Rugai et al., 1954) con algunas modificaciones. Esta técnica se fundamenta en el termo-hidrotropismo característico de esta fase parasitaria. Para obtener las L3 se retira el coprocultivo de la incubadora y se envuelve en gasa. Seguidamente, se colocan las envolturas de gasa en agua a 42 °C dentro de embudos que están conectados a tubos de ensayo por medio de una manguera de silicona durante 45 minutos.

Las larvas L3 se depositan en el fondo del tubo de ensayo (Figura 4.2). Se descarta el sobrenadante dejando 1 mL de agua destilada sobre el sedimento de L3 y se hace la cuantificación de las larvas mediante observación al microscopio. Finalmente, las larvas se ajustan a una concentración de 12.000 L3/mL de PBS 1X y se inyectan por vía subcutánea a otras ratas (6.000 L3/rata) para mantener el ciclo biológico de *S. venezuelensis*.

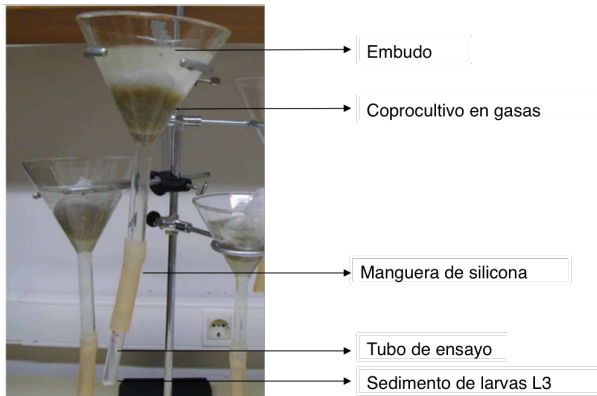


Figura 4.2: Obtención de L3 de *Strongyloides venezuelensis* mediante la técnica de Baermann.

## 4.3 Estudios *in vitro*

### 4.3.1 Cultivo de macrófagos peritoneales y fibroblastos de ratón

Para realizar el cultivo de los macrófagos, se descongela el vial que contiene las células de interés en un baño a 37 °C e inmediatamente se transfiere su contenido a un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de área superficial que contiene 10 mL de medio completo de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% (v/v) de SFB inactivado por calor, 2 mM de glutamina y una mezcla de penicilina (10.000 UI) y

estreptomicina (10 mg/mL), que se incubaba a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en un periodo entre 48 a 72h. Pasado el tiempo, se elimina el sobrenadante de cultivo y los macrófagos adheridos a la superficie del frasco se recuperan por la adición de 5 mL de Versene (Gibco-Invitrogen) e incubación durante 10 minutos a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se recuperan por centrifugación a 1.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante e inmediatamente los macrófagos se resuspenden en 10 mL de medio de cultivo completo. Una alícuota de 5 μL de la suspensión de macrófagos se tiñe con azul de tripán y se cuantifican en cámara de Neubauer (Rojas-Caraballo et al., 2014).

Los fibroblastos de la línea celular NCTC- 929 se cultivan usando Medio Esencial Mínimo (MEM) sin rojo de fenol (Sigma), suplementado con 10% v/v de SFB y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 mg/mL). Los cultivos de células se mantienen a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, realizando pases una vez por semana.

### 4.3.2 Evaluación de la citotoxicidad en macrófagos

El colorante 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) es una sal de tetrazolio que se utiliza para medir la actividad de células vivas y se basa en la reducción del XTT por las células vivas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y en este método existe la relación directa entre la señal colorimétrica y el número de células vivas y representa una técnica de cuantificación de viabilidad para la actividad metabólica (Paull et al., 1988; Meshulam et al., 1995).

Se añaden 2x10<sup>5</sup> macrófagos por cada pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se incuban durante 2h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Después, los compuestos se añaden por triplicado a las siguientes concentraciones: 0,1; 0,5; 3,3; 15,0; 35,0 y 70,0 μM y se incuban durante 72h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a los macrófagos adheridos a la superficie de la placa se adicionan 50 μL por pocillo del colorante XTT y se incubaba durante 24h. Pasado este tiempo se añade 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, se transfiere el sobrenadante a otras placas y se mide la absorbancia a 492 nm, usando un lector Ear400FT ELISA (Instrumentos de Laboratorio STL, Groding, Austria). Como control negativo de mortalidad se utilizaron macrófagos sin ningún tratamiento y como control positivo macrófagos tratados con DMSO. La viabilidad celular se calculó de la siguiente forma:

$$\%viabilidad = \left( \frac{Abs\ Control - Abs\ Muestra}{Abs\ Control} \right) * 100 \quad (4.1)$$

donde,

Abs Control = Absorbancia de macrófagos basales; Abs Muestra = Absorbancia de macrófagos tratados con los compuestos.

### 4.3.3 Ensayo de citotoxicidad inespecífica en fibroblastos

La citotoxicidad inespecífica contra fibroblastos NCTC-929 se evaluó mediante medición de la función de las células en presencia de resazurina (Rolón et al., 2006). Brevemente, 100  $\mu\text{L}$  de medio MEM que contienen  $15 \times 10^3$  células se siembran en placas de 96 pocillos y se incuban durante 3h a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$  para permitir su fijación. Posteriormente, el medio se reemplaza por 200  $\mu\text{L}$  de soluciones que contienen cada uno de los compuestos ensayados en medio fresco. La concentración de cada compuesto se evalúa por triplicado al igual que los controles de crecimiento y medio de cultivo en cada placa. Las células se exponen a los compuestos durante 48 h a 37 °C con 5%  $\text{CO}_2$ . Después, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de resazurina en solución de PBS 1X a cada pocillo y las placas se incuban en las mismas condiciones durante 3h.

Las intensidades de fluorescencia se leen a 535 nm de excitación y 590 nm de emisión. La citotoxicidad no específica (% de C) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%C = \left( \frac{FIE - FIEM}{FIC - FIM} \right) * 100 \quad (4.2)$$

FIE, FIEM, FIC y la FIM son los valores medios de intensidad de fluorescencia para los pocillos experimentales, compuesto en el medio, pocillos de control de crecimiento y medio de cultivo, respectivamente.

### 4.3.4 Ensayo de susceptibilidad en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Se añaden  $1 \times 10^5$  epimastigotes de las cepas MG y JEM en medio LIT y en fase logarítmica de crecimiento a placas de 96 pocillos en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Después, se adicionan los compuestos a ensayar a las siguientes concentraciones: 0,1; 0,5; 3,3; 15,0; 35,0 y 70,0  $\mu\text{M}$ . Como control negativo se utilizan parásitos sin ningún tratamiento y como control positivo de mortalidad se utiliza nifurtimox (Lampit, Bayer) a una concentración final de 10 mg/mL. Las placas se incubaron durante un periodo de 72h a 28 °C. Para determinar la inhibición de crecimiento en los epimastigotes, se empleó tinción con azul de tripán, para lo cual se toma una parte de cada cultivo y se resuspende en solución de azul de tripán 0,4% v/v durante 5 minutos y se determina microscópicamente la viabilidad celular de cada condición

en cámara de Neubauer (Tran et al., 2011). El porcentaje de citotoxicidad para cada compuesto se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%Citotoxicidad = \left( \frac{viabilidad\ controles - viabilidad\ muestra}{viabilidad\ controles} \right) * 100 \quad (4.3)$$

También se utilizó el colorante XTT para medir la actividad tripanocida de los compuestos ensayados, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

La actividad tripanocida contra la cepa CL-B5 se evalúa midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa.  $1 \times 10^5$  epimastigotes se incuban junto con los compuestos a 28 °C durante 72h. Después, se añaden 50  $\mu$ L del sustrato rojo de clorofenol  $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG) (Roche) en Triton X-100 (0,9% v/v) (Panreac) a cada pocillo y se incuba a 37 °C durante 3h. Los porcentajes de actividad anti-epimastigotes (% AE) se obtienen mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm y aplicando la siguiente ecuación:

$$\%AE = 100 - \left[ \left( \frac{AE - AEM}{AC - AM} \right) * 100 \right] \quad (4.4)$$

donde AE, AEM, CA y AM representan el valor medio de absorbancia para pocillos experimentales, compuesto en el medio, pocillos de control de crecimiento y medio solo, respectivamente.

Como control negativo se utilizan parásitos sin ningún tratamiento y como control positivo de mortalidad se utiliza nifurtimox a una concentración final de 10 mg/mL. Cada ensayo se realiza por triplicado.

#### 4.3.5 Ensayo de susceptibilidad en amastigotes

Se siembran 10.000 fibroblastos/pocillo de la línea celular NCTC-929 en placas de 48 pocillos, se fijan e infectan con los tripomastigotes derivados de cultivo en una relación de 1:6 (células:parásitos). Se incuban a 33 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 12h. Después de la infección, los pocillos se lavan con PBS 1X para eliminar tripomastigotes que no penetraron en las células. Se añaden en medio fresco soluciones de cada compuesto y nifurtimox (0,1 a 70,0  $\mu$ M) en un volumen final de 450  $\mu$ L/pocillo y por triplicado. Se incuban en las mismas condiciones de temperatura y humedad durante 12h. A continuación, se añaden 50  $\mu$ L de CPRG en 3% v/v de Triton X-100 (pH 7,4) a cada pocillo en una concentración final de 400  $\mu$ M (Fonseca-Berzal et al., 2014). Después de 3h de incubación a 37 °C con CPRG, se mide la

absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia de 630 nm para estimar la actividad anti-amastigote (AA) de los compuestos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%AA = 100 - \left[ \left( \frac{AE - AEM}{ACI - AM} \right) * 100 \right] \quad (4.5)$$

donde cada valor representa la absorbancia media de los pocillos experimentales (AE), compuesto en un medio (AEM), control de la infección (ACI), y medio solo (AM), respectivamente. La absorbancia de los pocillos no infectados (sólo NCTC-929 células) se restó a ambos grupos (experimental y control de la infección).

#### 4.3.6 Ensayo de susceptibilidad de L3 de *Strongyloides venezuelensis* in vitro

Las larvas de *S. venezuelensis* obtenidas de coprocultivo y necropsias no reúnen las características suficientes para ser cultivadas, debido a que la flora microbiana del medio en el que han sido obtenidas podría contaminar los medios de cultivo, por lo cual se sometió a un proceso de descontaminación para eliminar microorganismos contaminantes con antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 0,1 mg/mL) y antifúngicos (fluconazol 0,8 mg/mL; F-8929, Sigma) en agua destilada estéril siguiendo la técnica de Martins et al., 1999. Se debe realizar seis lavados, cada uno durante 20 minutos. Eliminar el sobrenadante y cultivarlos en los medios específicos.

Se añaden 100 larvas L3/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y después de 2h de adaptación a 28 °C cada compuesto se adiciona en las siguientes concentraciones: 1,0; 5,0; 10,0; 40,0; 80,0 y 100,0  $\mu$ M con los alquilfosfolípidos y las concentraciones 1,0; 10,0; 35,0; 70,0 y 350,0  $\mu$ M con los aminoalcoholes y diaminas. La eficacia de los compuestos frente a las L3 se evalúa después de cada tratamiento mediante la medición de la motilidad durante 24, 48 y 72h de tratamiento. El movimiento de larvas fue determinado previa estimulación de 2 minutos con luz natural mediante la observación en microscopio invertido (CK2, Olympus). Las larvas se consideran muertas cuando no se detecta ningún movimiento durante la observación al microscopio.

Como controles, larvas de *S. venezuelensis* se incubaron en presencia de PBS 1X (control negativo) y también tratadas con ivermectina a una concentración final 10  $\mu$ M (control positivo). Se realizaron grabaciones de vídeo con el software DinoCapture versión AM423 2.0, (microscopio Dino-Lite digital, Naarden, Holanda). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 4.3.7 Test de viabilidad celular mediante XTT en L3 de *Strongyloides venezuelensis*

Se añaden 100 larvas L3 de *S. venezuelensis* por cada pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se incuban durante 2h a 28 °C. Después, los compuestos se añaden por triplicado a las siguientes concentraciones: 1,0; 5; 10,0; 40,0; 80,0 y 100,0  $\mu\text{M}$  para los alquilfosfolípidos, las concentraciones de 1,0; 10,0; 35,0; 70,0 y 350,0  $\mu\text{M}$  en los compuestos aminoalcoholes y diaminas. Se incuban durante 72h a 28 °C. Posteriormente, se adicionan 50  $\mu\text{L}$  por pocillo del colorante XTT y se incuba durante 24h a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$  (Paull et al., 1988). Pasado este tiempo se añade 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Finalmente, se transfiere el sobrenadante a otras placas y se mide la absorbancia a 492 nm, usando un lector Ear400FT ELISA (Instrumentos de Laboratorio STL, Groding, Austria). Como control negativo de mortalidad se utilizaron larvas sin ningún tratamiento y como control positivo de mortalidad se utiliza ivermectina a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . La viabilidad celular se calculó de la siguiente forma:

$$\%viabilidad = \left( \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} \right) * 100 \quad (4.6)$$

donde Abs control representa la absorbancia de las muestras sin tratamiento y Abs muestra representa la absorbancia de las muestras tratadas con los compuestos ensayados.

#### 4.3.8 Técnica de TUNEL para estudio de apoptosis

La técnica de tinción TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling*) permite visualizar la fragmentación del ADN nuclear en células apoptóticas por la agregación de 12-dUTP-fluoresceína a los extremos 3'-OH del ADN fragmentado mediante la enzima desoxinucleotidil transferasa Terminal (rTdT) (Gajate et al., 2009). La 12-dUTP-fluoresceína marca el ADN, y de esta forma puede visualizarse mediante microscopía de fluorescencia. En otro punto, las células se tiñen también con yoduro de propidio, que marca de color rojo el ADN tanto de células apoptóticas como no apoptóticas. La fluorescencia verde debida a la 12-dUTP-fluoresceína sólo se incorporará dentro del núcleo de las células apoptóticas, de forma que el núcleo de las células en apoptosis muestra fluorescencia verde amarillento por la localización de ambos colores.

Para esta técnica, las larvas L3 de *S. venezuelensis* se lavan con PBS 1X, se centrifugan a 1.500 rpm durante 3 minutos y se fijan en portaobjetos de policina (Menzel-Gliser). Se incuban durante 24h a 37 °C. Las larvas se fijan en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante 25 minutos y se

lavan con PBS 1X. Los parásitos adheridos se tratan con tripsina y 0,25% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se tiñen para ADN usando el Kit de TUNEL *Fluorescein Apoptosis Detection System* (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

El yoduro de propidio se añadió durante 15 min para teñir en rojo tanto las células apoptóticas como no apoptóticas, mientras que fluoresceína-12-dUTP se incorpora en el 3'-OH del ADN fragmentado que resulta la fluorescencia verde localizada dentro del núcleo de las células apoptóticas. Finalmente se observan las muestras con microscopio confocal (LSM 310 Laser Scan, Zeiss) con luz de 520 nm de longitud de onda para ver la fluorescencia verde de la fluoresceína y luz de 620 nm para la fluorescencia roja del yoduro de propidio.

## 4.4 Estudios *in vivo*

### 4.4.1 Declaración ética y animales de experimentación

Todos los animales se tratan de acuerdo con la legislación sobre protección animal vigente en España (Ley 32/2007, Ley 6/2013 y Real Decreto 53/2013) y la Unión Europea (Directiva Europea 2010/63/CE) para animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. El estado de salud de los animales se controló a través de los experimentos realizados por un programa de vigilancia de la salud de acuerdo con las directrices de la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento. Se utilizan ratones CD1 de seis semanas de edad y un peso entre 25 a 30 g, y ratas Wistar macho con un peso entre 150 a 200 g; fueron utilizados para experimentos *in vivo* y el mantenimiento del ciclo de vida, respectivamente; libres de patógenos y mantenidos bajo condiciones acordes a la legislación española, bajo ciclos de luz de 12h y de oscuridad de 12h a una temperatura de 20 - 22 °C, con una dieta estándar y agua.

Las instalaciones de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (Número de registro PAE/SA/001) fueron utilizadas para este tipo de procedimientos. El Comité de Ética de la Universidad de Salamanca también aprobó los procedimientos que se utilizaron en este estudio (Número de Permiso:8402).

#### **4.4.2 Actividad de edelfosina frente a *Strongyloides venezuelensis***

Se realizaron dos experimentos diferentes para evaluar la actividad *in vivo* de edelfosina. En el primer experimento, se utilizan ratones CD1 machos distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales (5 ratones por grupo) y se asignan en jaulas de plástico de la siguiente manera: G1, control de infección; G2, infectados y tratados con ivermectina; G3, infectados y tratados con edelfosina. La ivermectina se administró por vía oral a 0,2 mg/kg/día, una vez en el día 5 p.i.; y edelfosina se administró a 20 mg/kg/día desde el día de la infección hasta el día 5 día p.i. para alcanzar la concentración terapéutica (Yepes et al., 2014).

Todos los animales fueron infectados por vía subcutánea con 3.000 L3 de *S. venezuelensis* resuspendidas en PBS 1X utilizando jeringas con aguja de calibre 25. Se recuperan las hembras partenogénicas del intestino del ratón y se realizó recuento de huevos en las heces en el día 7 p.i. En el segundo experimento, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales (seis ratones por grupo) y se asignan en jaulas de plástico con los mismos grupos mencionados anteriormente y se realizó los recuentos de huevos fecales en los días 5, 9, 11, 15, 17 y 19 p.i.

#### **4.4.3 Actividad de aminoalcoholes y diaminas frente a *Strongyloides venezuelensis***

Se utilizaron un total de 64 ratones machos CD1 de seis semanas de edad, distribuidos al azar en grupos de ocho animales. Se realizó dos experimentos con cuatro grupos; control de la infección, infectados y tratados oralmente con ivermectina a dosis estándar 0,2 mg/kg en el día 5 p.i. y dos grupos infectados y tratados oralmente a dosis 20 mg/kg con su respectivo compuesto seleccionado desde el día de la infección y durante los 5 días siguientes a la infección. En el primer experimento se ensayaron los aminoalcoholes 4 y 6 y en el segundo las diaminas 17 y 18. La dosis se determinaron sobre la base de la citotoxicidad y la experiencia previa en nuestro laboratorio en el uso de nuevos compuestos derivados de esfingosina (Yepes Victoria et al., 2012). Todos los animales se infectaron por vía subcutánea con 3.000 L3 de *S. venezuelensis*. La eficacia del tratamiento se determinó mediante la medición parasitológica del número de huevos por gramo en heces (HPG) en los días 5, 6 y 7 después de la infección. También se evaluó la eficacia del tratamiento mediante la cantidad de hembras adultas recuperadas del intestino de los ratones infectados y tratados en el día 7 después de la infección.



#### 4.4.4 Estudio de la viabilidad de larvas tratadas inoculadas en ratones

Las larvas L3 de *S. venezuelensis* se lavan dos veces con PBS 1X, se añaden 100 larvas por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos. Las larvas se incuban a 28 °C durante 2h para permitir la adaptación. Seguidamente las larvas se tratan con 5,0; 10,0; 20,0 y 40  $\mu$ M de edelfosina durante 24h. Treinta y seis ratones CD1 (seis por grupo) se infectan por vía subcutánea. Larvas L3 no tratadas y L3 tratadas con ivermectina 10  $\mu$ M se utilizan como controles. Después de la infección se cuantifica la detección de HPG en heces diariamente durante los días 5, 6 y 7 para evaluar la eficacia del tratamiento.

### 4.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con *T. cruzi* y *S. venezuelensis*, se expresan como media, error estándar de la media (SEM) y desviación estándar (SD). La distribución normal de los datos se estudia mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas se analiza mediante la prueba de Barlett. Para encontrar las diferencias entre los grupos se utiliza el análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey (HSD honest significance test). Se consideran diferencias significativas si el valor de  $p < 0,05$  usando el software estadístico SPSS (v. 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Los valores de IC<sub>50</sub> - LC<sub>50</sub> - LD<sub>50</sub> se calcularon mediante un programa de análisis log-probit usando también SPSS. Todos los gráficos se realizaron con Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) para Mac.



---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- del Olmo, E., Alves, M., López, J. L., Inchausti, A., Yaluff, G., Rojas de Arias, A., & San Feliciano, A. (2002). Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(4), 659–62.
- del Olmo, E., Plaza, A., Muro, A., Martínez-Fernández, A. R., Nogal-Ruiz, J. J., López-Pérez, J. L., & Feliciano, A. S. (2006). Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(23), 6091–5.
- Fonseca-Berzal, C., Escario, J. A., Arán, V. J., & Gómez-Barrio, A. (2014). Further insights into biological evaluation of new anti-trypanosoma cruzi 5-nitroindazoles. *Parasitol Res*, 113(3), 1049–1056.
- 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(4), e5044.
- Le-Senne, A., Muelas-Serrano, S., Fernández-Portillo, C., Escario, J. A., & Gómez-Barrio, A. (2002). Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(8), 1101–5.
- Martins, W., Melo, A., Nicoli, J., de Carvalho, M., Lana, M., Vieira, E., & Farias, L. (1999). The obtaining of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* under axenic conditions. *Microecol Ther*, (pp. 63–70).
- Meshulam, T., Levitz, S. M., Christin, L., & Diamond, R. D. (1995). A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *J Infect Dis*, 172(4), 1153–6.
- Paull, K., Shoemaker, R., Boyd, M., Parsons, J., Risbood, P., Barbera, W., Sharma, M., Baker, D., Hand, E., & Scuderio, D. (1988). The synthesis

- of XTT: a new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J Heterocycl Chem*, 25, 911–914.
- Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Pérez del Villar, L., Vizcaíno, C., Vicente, B., Fernández-Soto, P., del Olmo, E., Patarroyo, M. A., & Muro, A. (2014). In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by fasciola hepatica-derived synthetic peptides containing b- and t-cell epitopes. *PLoS One*, 9(8), e105323.
- Rolón, M., Seco, E. M., Vega, C., Nogal, J. J., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., & Malpartida, F. (2006). Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*, 28(2), 104–9.
- Rugai, E., Mattos, T., & Brisola, A. (1954). Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes-modificação do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 14, 5–8.
- Saraiva, J., Vega, C., Rolon, M., da Silva, R., E Silva, M. L. A., Donate, P. M., Bastos, J. K., Gomez-Barrio, A., & de Albuquerque, S. (2007). In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*, 100(4), 791–5.
- Tran, S.-L., Puhar, A., Ngo-Camus, M., & Ramarao, N. (2011). Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin hlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 6(9), e22876.
- Yepes, E., Varela-M, R. E., López-Abán, J., Dakir, E. H., Dakir, E. L. H., Mollinedo, F., & Muro, A. (2014). In vitro and in vivo anti-schistosomal activity of the alkylphospholipid analog edelfosine. *PLoS One*, 9(10), e109431.
- Yepes Victoria, E., Moreira Terroso, M. T., Perez-Arellano, J. L., & Muro Alvarez, A. (2012). Infecciones difícilmente transmisibles VI: Geohelmintosis. *Manual de Enfermedades Importadas*, (pp. 503).

---

## CONCLUSIONES

---

1. De los 13 aminoalcoholes ensayados frente a epimastigotes de las cepas MG y JEM de *T. cruzi*, se observa una preferencia por una cadena alifática de 14 átomos de carbono, el grupo hidroxilo en lugar de un éter bencílico en C-1 y una amina secundaria en C-2, sustituida por un alquilo de tamaño mediano (butilo), compuesto **6**. El compuesto **6** además presentó baja toxicidad en macrófagos.
2. De las 8 diaminas ensayadas frente a epimastigotes de *T. cruzi*, los compuestos más potentes frente a ambas cepas fueron las 2-*Boc*-diaminas **14**, **15** y **16** con n= 9, 13 y 15, respectivamente. Sin embargo, el compuesto **19**, hexadecan-1,2-diamina fue ligeramente menos potente y el menos tóxico.
3. Se seleccionaron los aminoalcoholes **2**, **5** y **6** y las diaminas **14** y **15** para ensayos en amastigotes de *T. cruzi*, siendo los aminoalcoholes **5** y **6** hexadecanoles con una amina secundaria sustituida con un etilo (compuesto **5**) o un butilo (compuesto **6**), los que mostraron mayor índice de selectividad (citotoxicidad en NCTC-929) actividad en amastigotes.
4. De los 15 aminoalcoholes ensayados *in vitro* frente al estadio L3 de *S. venezuelensis*, los aminoalcoholes **4** y **6**, 2-amino-hexadecanoles con la amina monoalquilada (etilo en **4** y butilo en **6**) fueron los más potentes y los menos tóxicos superando el valor del fármaco de control edelfosina.
5. De las 10 diaminas ensayadas, cinco superaron la potencia del control edelfosina (compuestos **17**, **18**, **19**, **23** y **24**), de ellas las menos tóxicas fueron en **17** y en **18**, 2-*tert*-butoxicarbonilalcano-1,2-diaminas de tamaño 12 y 16, respectivamente.
6. En los ensayos de eficacia frente a infecciones experimentales con *S. venezuelensis* con los aminoalcoholes **4** y **6** y diaminas **17** y **18** a dosis de 20 mg/kg mostraron que solo el aminoalcohol **6** fue capaz de reducir significativamente la carga parasitaria en términos de recuperación de

hembras partenogénicas en el intestino y presencia de huevos del parásito en heces.

7. De los 3 alquilfosfolípidos ensayados en cultivos de larvas de tercer estadio de *S. venezuelensis* se observó mayor actividad estrogiloicida en la edelfosina, mostrando anulación de la actividad mitocondrial, pérdida de la motilidad e imposibilidad de instaurar infecciones activas en ratones.
8. El tratamiento con edelfosina de ratones infectados con *S. venezuelensis* demostró la capacidad de producir reducciones importantes en el número de hembras recogidas del intestino y de huevos presentes en las heces.
9. Un mecanismo de acción probable de la edelfosina frente a *S. venezuelensis* es la inducción de muerte celular tipo-apoptosis dado el fraccionamiento del ADN que se observa en larvas de tercer estadio tras el tratamiento.
10. Tanto en ensayos frente a *T. cruzi* como frente a *S. venezuelensis* se observa, de manera general una mayor actividad para los derivados de los aminoalcoholes frente a las diaminas, destacando el compuesto **6**, 2-*tert*-butilaminohexadecanol. Por lo que se puede decir que hemos encontrado un prototipo para el desarrollo de agentes antiparasitarios que ha de ser refinado en estudios posteriores.