

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Virulencia de aislados de *Leishmania infantum* procedentes
del brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de
Madrid: caracterización y evaluación en células de
reservorios mamíferos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia Mas Zubiri

Directores

Gustavo Ramón Domínguez Bernal
Francisco Javier Carrión Herrero

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Virulencia de aislados de *Leishmania infantum* procedentes del brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid: caracterización y evaluación en células de reservorios mamíferos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Alicia Mas Zubiri

DIRECTORES

Gustavo Ramón Domínguez Bernal

Francisco Javier Carrión Herrero



FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

D. **Gustavo Ramón Domínguez Bernal**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y D. **Francisco Javier Carrión Herrero**, Profesor Contratado Doctor Interino en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral que lleva por título "**Virulencia de aislados de *Leishmania infantum* procedentes del brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid: caracterización y evaluación en células de reservorios mamíferos**" ha sido realizada por la graduada en Veterinaria Dña. **Alicia Mas Zubiri** bajo nuestra dirección, y estimamos reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor con mención Internacional por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 4 de mayo de 2021.

Fdo.: Gustavo Ramón Domínguez Bernal

Fdo.: Francisco Javier Carrión Herrero

FINANCIACIÓN

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:

La financiación de un contrato predoctoral por el Programa de Financiación de la Universidad Complutense de Madrid – Banco Santander, mediante un contrato de Personal Investigador en Formación (CT27/16 - CT28/16), y de una estancia de movilidad internacional dentro del programa “Ayudas para estancias breves en España y el extranjero” de la Universidad Complutense de Madrid (EB14/19).

La financiación de todas las investigaciones mediante las ayudas obtenidas del Ministerio de Economía y Competitividad, Competitividad/Ciencia e Innovación/Agencia Estatal de Investigación (AGL2013-44100R y PID2019-106487RB-I00), de la Plataforma Tecnológica de Sanidad Animal de la Comunidad de Madrid (PLATESA) (P2018/BAA-4370) y de la Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM) (PR75/18-21558).



A mis padres

**“El resultado de cualquier investigación sería solo puede ser
que crezcan dos preguntas donde antes solo crecía una”.**

Thorstein Veblen.

Cuando decidí que quería ser veterinaria nunca pensé que acabaría haciendo un doctorado. Llegar hasta aquí ha sido posible gracias al apoyo y la ayuda de muchas personas a las que no puedo más que estar mil veces agradecida.

A mis directores, Javier y Gustavo. Javier, gracias por abrirme la puerta a la investigación y guiarme desde los primeros pasos; por tu dedicación, tus consejos y todas tus aportaciones, pero también por todos esos buenos momentos que hemos pasado. Me siento muy afortunada por haber podido formar parte de este grupo, gracias por confiar en mí y darme la primera oportunidad. Gustavo, gracias por ser un referente todos estos años; has conseguido ser a la vez jefe, mentor y amigo, lo que es muy complicado. Por todo tu apoyo y tus lecciones de vida (aunque me las des incluso cuando no te las pido), pero sobre todo por ayudarme a crecer en todos los aspectos, profesionales y personales. No sé si algún día saldré del cascarón, pero gracias a ti ahora al menos tiene ventanas.

A Maite, Mar, Toño y Ricardo, gracias por enseñarme que hay muchas formas de ser docente e investigador, todas diferentes, pero todas con algo en común, la vocación y la pasión que poneis por vuestro trabajo. No quiero olvidarme del resto de personas que son o han sido parte del grupo INMIVET, gracias a Lucía, Katrin, Sara y Clara, por confiar en nosotros y aportar esa alegría al laboratorio que en momentos de mucho trabajo a veces se nos olvida. Muchas gracias Dani, porque aunque soy yo la que debería enseñarte, aprendemos juntos; por aguantar todos mis cambios de opinión y ajustes de última hora y por estar siempre dispuesto a ayudar con una sonrisa.

Gracias a todas las personas que han colaborado en este proyecto y sin las que no habría sido posible. A Maribel y Ricardo, por donarnos los aislados de *Leishmania* con los que hemos llevado a cabo todos los ensayos. A Luis, por traernos bolsas de sangre siempre que las necesitamos y ayudarnos en todo lo que ha estado en su mano para obtener células de conejo. A Juan, gracias por el análisis bioinformático de los estudios transcriptómicos y por su gran ayuda en todas las dudas que nos han ido surgiendo.

Quiero agradecerse también, a todos los miembros del departamento de Sanidad Animal. En especial a los integrantes del Grupo Saluвет, por ser los mejores vecinos, por vuestro compañerismo y por estar ahí siempre que os he necesitado. A Marta y Alex, que en estos últimos meses me han ayudado incluso desde la distancia, muchas gracias por todos vuestros consejos. Gracias a Esther, Gema, Iván, Lola, Pilar y Vanesa, por acogerme como una más en el “grupo de comidas”, por todas las risas y conversaciones que hemos tenido. Echo mucho de menos esos momentos y espero que podamos recuperarlos en el futuro. Gracias con mayúsculas a Pilar, porque sin tu apoyo el último capítulo de esta tesis doctoral no habría salido adelante; por dedicarme tu tiempo y sacarme de todos mis bloqueos.

One of the most exciting parts of this period has been my stay in Switzerland, I was lucky enough to enjoy a few months in a beautiful country and with wonderful people to whom I am very grateful. To Fabienne for giving me the opportunity to be part of her group and for all her contributions to this doctoral thesis. To Katuska, Borja, Yazmin, Maeva, Oaklyne, Luan, Michiel and Melissa, for making me feel at home despite being so far away; for all the laughs and good moments, you are without a doubt the best thing I brought back from Switzerland.

Una parte importante de esta tesis pertenece también a todas esas personas que han estado ahí desde siempre, a mi familia y a mis amigos.

A Eu, Silvia, Lara, Nacho, Irene, Sergio, Andrés y Clara, porque decir que sois mis amigos sería mentir, sois ya parte de mi familia. Gracias por todos los momentos que hemos pasado, por los ratos en clase o en las prácticas, pero también por las noches de pizza y juegos que tanto echo de menos. Habéis sido un apoyo fundamental durante esta etapa y aunque cada uno hallamos escogido un camino diferente estoy segura de que seguiréis siéndolo en el futuro. Ya nos estoy viendo de viejunos (unos más que otros) jugando y haciendo el tonto como siempre.

A Silvia, Jeni y Eva, muchas gracias por mantenerme cuerda en medio de la locura. Por apoyarme y animarme a seguir otro camino, aunque eso implicara no veros a diario. Por todos los tratamientos (si son por necesidad se consideran tratamiento) de cervezas y risas, puede que mi hígado ya no sea el que era, pero yo no puedo estar más feliz de teneros en mi vida. Todas mis catastróficas aventuras y mis momentos de pollo sin cabeza merecen la pena solo por poder compartirlos con vosotras.

Gracias a Marta y Marina porque si pienso en mi vida antes de vosotras casi no encuentro un momento en el que no estuvieseis. Porque ha llovido mucho desde que saltábamos al arbusto y nos pintábamos los morros con ceras Manley, pero seguimos juntas. Porque habéis estado ahí incluso para traerme guarrerías cuando estaba triste o decorarme los apuntes (en contra de mi voluntad) y porque sé que cuento con vosotras para siempre.

A mi familia, a toda. No puedo mencionar cada nombre porque no habría páginas suficientes, pero no puedo sentirme más agradecida de saber que cuento con tanta gente. Gracias por apoyarme y quererme incondicionalmente. Gracias en especial a mi abuela, por confiar en mí y a mi tía que habría venido hasta Suiza solo para traerme “bichitos” nuevos si yo se lo hubiese pedido.

Gracias a mis padres, que me lo han dado todo. Por protegerme sin cortarme las alas, por apoyarme en mis decisiones, hasta cuando no estaban de acuerdo. Por guiar cada uno de mis pasos con paciencia (a veces infinita) y cariño y por convertirme en la persona que soy ahora. No habría llegado a donde estoy si no hubiese sido por vosotros. Gracias por ayudarme en todo lo que habéis sido capaces, ¡hasta en la escritura de la tesis!, los padres no se eligen, pero si pudiera os elegiría mil veces.

No puedo dejar de nombrar a mi familia de cuatro patas, gracias a Rufo, Luna, Trufa y Dream por enseñarme que hay pocas cosas importantes en la vida: comer, dormir y estar con la gente que más quieres.

Y por último gracias Abel, por ser tú. Por ser mi compañero, mi amigo y mi familia. Por estar ahí siempre, en los momentos buenos y también en los malos y por ser capaz de sacarme una sonrisa hasta cuando parece imposible. Por hacerme feliz. Por crecer a mi lado. No tengo palabras para demostrar lo afortunada que me siento de compartir mi vida contigo. Decir que parte de esta tesis es tuya es quedarme demasiado corta.

0



ÍNDICE



ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	21
1. ASPECTOS GENERALES DE LA LEISHMANIOSIS	21
1.1. DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA Y MORFOLÓGICA	21
1.2. DISTRIBUCIÓN, VECTORES Y HOSPEDADORES.....	23
1.3. TAXONOMÍA, CICLO BIOLÓGICO Y FASES DEL DESARROLLO DE <i>LEISHMANIA</i>	26
1.4. SINTOMATOLOGÍA Y CUADROS CLÍNICOS	29
1.4.1. Leishmaniosis humana	29
1.4.2. Leishmaniosis canina (CanL).....	31
1.5. DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL.....	31
1.5.1. Diagnóstico.....	31
1.5.2. Tratamiento.....	33
1.5.3. Prevención y Control	34
2. INTERACCIÓN <i>LEISHMANIA</i>-HOSPEDADOR.....	36
2.1. RESPUESTA INMUNITARIA INDUCIDA	36
2.1.1. Respuesta inmunitaria innata	36
2.1.2. Respuesta inmunitaria adaptativa	39
2.2. FACTORES DE VIRULENCIA Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL HOSPEDADOR.....	41
2.2.1. Factores de virulencia relacionados con la fisiología y resistencia parasitarias	41
2.2.2. Factores de virulencia relacionados con la invasión celular	42
2.2.3. Factores de virulencia relacionados con la modulación y evasión de la respuesta inmunitaria	42
3. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y ESTATUS DE LA LEISHMANIOSIS	43
4. BROTE DE LEISHMANIOSIS HUMANA EN LA COMUNIDAD DE MADRID.....	48
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	55
1. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS DE LA TESIS DOCTORAL	55
2. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL	56



2.1. OBJETIVO GENERAL	56
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. AISLADOS Y CEPAS DE <i>L. INFANTUM</i>	61
1.1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CEPAS Y AISLADOS DE <i>L. INFANTUM</i>	61
1.2. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO SOLUBLE DE <i>LEISHMANIA</i>	61
1.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> Y METACICLOGÉNESIS DE <i>L. INFANTUM</i>	61
1.4. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD PARASITARIA EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO	62
2. MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE VL	62
2.1. ENSAYO DE INFECCIÓN <i>IN VIVO</i> CON <i>L. INFANTUM</i>	62
2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA	62
2.3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA MEDIR LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A <i>L. INFANTUM</i>	63
2.3.1. Análisis del metabolismo enzimático y la producción de citoquinas <i>in vivo</i>	63
2.3.2. Cuantificación de la respuesta humoral	63
2.4. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL HÍGADO DE LOS ANIMALES INFECTADOS	63
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	64
3.1. AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS	64
3.1.1. Obtención de DC murinas derivadas de médula ósea	64
3.1.2. Obtención de monocitos y macrófagos caninos a partir de sangre periférica	64
3.2. INMUNOFENOTIPADO DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	65
3.3. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	65
3.4. INFECCIÓN <i>IN VITRO</i>	65
3.5. ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE INFECCIÓN	66
3.6. ANÁLISIS DEL METABOLISMO ENZIMÁTICO Y LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN CULTIVOS CELULARES	66
4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	66
4.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS	66
4.2. CUANTIFICACIÓN DEL METABOLISMO ENZIMÁTICO	66
4.3. MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS	67
5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	67
5.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO	67
5.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS, TLR, NO Y ARGINASA POR QPCR	67
5.3. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS DE CDNA Y SECUENCIACIÓN DEL RNA	68
5.4. CONTROL DE CALIDAD, MAPEO Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA	69



5.5	ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES	70
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	70
7.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	71
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
OBJETIVO 1: CARACTERIZAR EL PERFIL DE VIRULENCIA <i>IN VIVO</i> DE LOS AISLADOS DE <i>L. INFANTUM</i> BOS1FL1 Y POL2FL7, EN COMPARACIÓN CON LA CEPA BCN150, EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE VL.....		
1.	CONTEXTO CIENTÍFICO.....	77
2.	RESULTADOS.....	78
2.1.	VARIABILIDAD EN EL GRADO DE VISCERALIZACIÓN EN FUNCIÓN DEL AISLADO O CEPA DE <i>L. INFANTUM</i> .	78
2.2.	INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA FRENTE A <i>L. INFANTUM</i>	79
2.3.	PREDOMINIO DE LA ACTIVIDAD ARGINASA TRAS LA INFECCIÓN POR POL2FL7 Y BOS1FL1.....	79
2.4.	MODULACIÓN DIFERENCIAL DE LA DEFENSA INMUNOLÓGICA DEL HOSPEDADOR BASADA EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN	80
2.5.	DIFERENCIAS EN LA AFECTACIÓN HEPÁTICA DE LOS RATONES EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN	81
3.	DISCUSIÓN	83
OBJETIVO 2: ANALIZAR EL PERFIL DE VIRULENCIA <i>EX VIVO</i> Y EL TROPISMO DIFERENCIAL DEL AISLADO DE <i>L. INFANTUM</i> BOS1FL1, EN COMPARACIÓN CON LA CEPA BCN150, TRAS LA INFECCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS DE ORIGEN CANINO.		
1.	CONTEXTO CIENTÍFICO.....	89
2.	RESULTADOS.....	90
2.1.	CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>L. INFANTUM</i> BOS1FL1 Y BCN150.....	90
2.2.	DIFERENCIAS EN LA INTERACCIÓN DE <i>L. INFANTUM</i> CON M α N Y M α CANINOS EN FUNCIÓN DEL AISLADO O CEPA.....	91
2.3.	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA OXIDATIVA DESARROLLADA TRAS LA INFECCIÓN CON <i>L. INFANTUM</i>	92
2.4.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ARGINASA E INOS	94
2.5.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS Y TLRs TRAS LA INFECCIÓN CON BCN150 Y BOS1FL1.....	94
2.6.	PREDOMINIO DE UN PERFIL TH2 DE SUSCEPTIBILIDAD EN LAS CÉLULAS CANINAS INFECTADAS CON <i>L. INFANTUM</i> BCN150	96
3.	DISCUSIÓN	96
OBJETIVO 3: ESTUDIAR EL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DESARROLLADO EN LA INTERACCIÓN PARÁSITO-CÉLULA HOSPEDADORA, EMPLEANDO EL AISLADO DE <i>L. INFANTUM</i> BOS1FL1 EN COMPARACIÓN CON LA CEPA BCN150, Y LA LÍNEA CELULAR DH82 DE MACRÓFAGOS CANINOS.		
1	CONTEXTO CIENTÍFICO.....	103



2. RESULTADOS.....	104
2.1. EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE <i>L. INFANTUM</i> BCN150 Y BOS1FL1	104
2.2. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CÉLULAS DH82 TRAS SU INFECCIÓN POR <i>L. INFANTUM</i>	105
2.2.1. Secuenciación, control de calidad y mapeo frente al genoma del perro.....	105
2.2.2. Diferencias en la expresión génica de las células DH82.....	105
2.2.3. Identificación de los procesos y rutas biológicas moduladas en las células tras su infección por <i>L. infantum</i>	108
2.2.4. Diferencias en la modulación de la vía de señalización PI3K-Akt.....	110
2.2.5. Expresión diferencial de receptores TLR y NLR en las células infectadas	111
2.3. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>L. INFANTUM</i> BCN150 Y BOS1FL1 TRAS LA INFECCIÓN DE CÉLULAS DH82	111
3. DISCUSIÓN	115
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO	155
ANEXO II: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL	193



LISTADO DE ABREVIATURAS

4E-BP1	Proteína 1 de unión al factor de inicio de la traducción 4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
ACL	Leishmaniosis cutánea americana	American cutaneous leishmaniosis
Akt	Proteína quinasa B	Protein kinase B
ANOVA	Análisis de la varianza	Analysis of variance
APC	Célula presentadora de antígeno	Antigen-presenting cell
BCN	Células DH82 infectadas por <i>L. infantum</i> BCN150	<i>L. infantum</i> BCN150-infected DH82 cells
BCN150	MCAN/ES/96/BCN150	MCAN/ES/96/BCN150
BOS	Células DH82 infectadas por <i>L. infantum</i> BOS1FL1	<i>L. infantum</i> BOS1FL1-infected DH82 cells
BOS1FL1	IPER/ES/2012/BOS1FL1	IPER/ES/2012/BOS1FL1
C/S	Crónico o estéril	Chronic/sterile
CAI	Centro de ayuda a la investigación	Research Support Centre
CAMs	Moléculas de adhesión celular	Cell adhesion molecules
CanL	Leishmaniosis canina	Canine leishmaniosis
CD	Antígenos de diferenciación	Cluster of differentiation
cDNA	DNA complementario	Complementary DNA
CL	Leishmaniosis cutánea	Cutaneous leishmaniosis
CM	Medio completo	Complete medium
CO₂	Dióxido de carbono	Carbon dioxide
CR1	Receptor del complemento tipo 1	Complement receptor type 1
CR3	Receptor del complemento tipo 3	Complement receptor type 3
DAT	Test de aglutinación directa	Direct agglutination test
DC	Célula dendrítica	Dendritic cell
DCL	Leishmaniosis cutánea difusa	Diffuse cutaneous leishmaniosis
DEG	Gen diferencialmente expresado	Differentially expressed gene
DHE	Dihydroethidium	Dihydroethidium
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Tampón fosfato salino	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTH	Respuesta de hipersensibilidad retardada	Delayed-type hypersensitivity
ECM	Matriz extracelular	Extracellular matrix
EDO	Enfermedad de Declaración Obligatoria	Notifiable disease
EE.UU.	Estados Unidos de América	United States of América
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Suero fetal bovino	Fetal bovine serum
FC	Tasa de variación	Fold change
FDR	Tasa de descubrimientos falsos	False discovery rate



FPKM	Fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas	Fragments per kilo base per million mapped reads
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	Contenido de guanina-citosina	Guanine-cytosine content
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GO	Ontología génica	Gene Ontology
GP63	Glicoproteína de superficie GP63	Surface glycoprotein GP63
GPI	Glicosilfosfatidilinositol	Glycosylphosphatidylinositol
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	Hydrogen peroxide
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	Hanks' Balanced Salt Solution
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1	Hypoxia-inducible factor 1
HRP	Peroxidasa de rábano picante	Horseradish peroxidase
iC3b	Factor del complemento C3b inactivado	Inactivated factor complement C3b
ICT	Test de inmunocromatografía	Immunochromatographic test
IFAT	Inmunofluorescencia indirecta	Inmunofluorescence antibody test
IFN	Interferón	Interferon
IL	Interleuquina	Interleukin
IM	Inmaduro	Immature
iNOS	Óxido nítrico sintasa	Nitric oxide synthase
ISCIH	Instituto de Salud Carlos III	Institute of Health Carlos III
IV	Intravenoso	Intravenous
JAK	Proteínas de la familia Janus quinasa	Janus kinase proteins
JPCM5	MCAN/ES/98/LLM-877	MCAN/ES/98/LLM-877
Kb	Kilobase	Kilobase
kDNA	DNA del kineoplasto de <i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i> kinetoplast DNA
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCF	Factor quimiotáctico de <i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i> chemotactic factor
LDA	Ensayo de dilución límite	Limiting dilution assay
LIT1	Transportador de hierro de <i>Leishmania</i> 1	<i>Leishmania</i> iron transporter 1
LIT2	Transportador de hierro de <i>Leishmania</i> 2	<i>Leishmania</i> iron transporter 2
LLL	Linfadenopatía leishmanial localizada	Localized leishmanial lymphadenopathy
LPG	Lipofosfoglicano	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharide
M	Maduro	Mature
MAC	Complejo de ataque a membrana	Membrane attack complex
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos	Mitogen-activated protein kinases
MCL	Leishmaniosis mucocutánea	Mucocutaneous leishmaniosis
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	Major histocompatibility complex
MIP-1β	Proteína inflamatoria del macrófago 1 β	Macrophage inflammatory protein 1 β
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus	Multilocus enzyme electrophoresis
Mϕ	Macrófago	Macrophage



Mon	Monocito	Monocyte
mRNA	RNA mensajero	Messenger RNA
Msr	Metionina-sulfóxido reductasas	Methionine sulfoxide reductases
mTOR1	Complejo 1 del receptor de la rapamicina	Mammalian target of rapamycin complex 1
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazolio	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NaCl	Cloruro sódico	Sodium chloride
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	Elastasa	Neutrophil elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Factor nuclear kappa B	Nuclear factor kappa B
NI	Células DH82 no infectadas	Uninfected DH82 cells
NK	Célula Natural killer	Natural killer cell
NLR	Receptor tipo NOD	NOD-like receptor
NO	Óxido nítrico	Nitric oxide
NTD	Enfermedades Tropicales Desatendidas	Neglected Tropical Diseases
PCA	Análisis de componentes principales	Principal component analysis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
PI	Postinfección	Post-infection
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteína quinasa C	Protein kinase C
PKDL	Leishmaniosis dérmica Post-Kala-Azar	Post-Kala-Azar dermal leishmaniosis
PKR	Proteína quinasa R	Protein kinase R
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF	Floruro de fenilmetilsulfonilo	Phenylmethylsulfonyl fluoride
POL2FL6	IPER/ES/2012/POL2FL6	IPER/ES/2012/POL2FL6
POL2FL7	IPER/ES/2012/POL2FL7	IPER/ES/2012/POL2FL7
PPG	Proteofosfoglicano	Proteophosphoglycan
PSG	Gel secretado por promastigotes	Promastigote secretory gel
PV	Vacuola parasitófora	Parasitophorous vacuole
Q	Índice de calidad Phred	Phred quality score
qPCR	PCR cuantitativa	Quantitative PCR
qRT-PCR	PCR cuantitativa de transcripción inversa	Quantitative reverse transcription PCR
RCL	Leishmaniosis cutánea recidivante	Leishmaniosis recidivans
RNA	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
RNA-seq	Secuenciación masiva de RNA	RNA sequencing
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Error estándar de la media	Standard error of the mean
AIDS	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	Acquired immune deficiency syndrome
SLA	Antígeno soluble de <i>Leishmania</i>	Soluble <i>Leishmania</i> antigen
STAT	Proteínas activadoras de la transcripción	Activator of transcription proteins
Tc	Linfocito T citotóxico	Cytotoxic T cell
TGF	Factor de crecimiento transformante	Transforming growth factor
Th	Linfocito T colaborador	Helper T cell
TLR	Receptor tipo toll	Toll-like receptor



TNF	Factor de necrosis tumoral	Tumor necrosis factor
Treg	Linfocito T regulador	Regulatory T Cell
Tris-Hcl	Tris-ácido clorhídrico	Tris-hydrochloride
tRNA	RNA de transferencia	Transfer RNA
UCM	Universidad Complutense de Madrid	Complutense University of Madrid
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	Vascular endothelial growth factor
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana	Human immunodeficiency virus
VL	Leishmaniosis visceral	Visceral leishmaniosis
WB	Western Blot	Western Blot
WER	Registro Epidemiológico Semanal	Weekly Epidemiological Record
WHO	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
ZVL	Leishmaniosis visceral zoonótica	Zoonotic visceral leishmaniosis



ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Representación esquemática de las características morfológicas más importantes de *Leishmania spp.* pág. 22
- Figura 2.** Ciclo biológico de *Leishmania spp.* pág. 27
- Figura 3.** Representación esquemática de la respuesta inmunitaria innata desencadenada tras la infección por *Leishmania spp.* en el hospedador mamífero pág. 37
- Figura 4.** Representación esquemática de la respuesta inmunitaria adaptativa desencadenada tras la infección por *Leishmania spp.* en el hospedador mamífero pág. 40
- Figura 5.** Evolución en el número de casos de CL y VL entre 1998 y 2016 pág. 44
- Figura 6.** Distribución espacial del número de casos de CL y VL en función del lugar de residencia. Brote de leishmaniosis de la Comunidad de Madrid pág. 49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO 1

- Figura 7.** Determinación de la carga parasitaria en el hígado y el bazo de los animales infectados por *L. infantum* pág. 78
- Figura 8.** Respuesta humoral frente a SLA pág. 79
- Figura 9.** Producción de citoquinas en los animales infectados por *L. infantum* pág. 81
- Figura 10.** Afectación hepática en los ratones infectados por *L. infantum* pág. 81
- Figura 11.** Porcentaje de granulomas hepáticos en función de fase de maduración pág. 82

OBJETIVO 2

- Figura 12.** Cinética de crecimiento y metacicloogénesis de los parásitos *in vitro* pág. 90
- Figura 13.** Viabilidad de los promastigotes en condiciones de estrés oxidativo pág. 91
- Figura 14.** Capacidad de infección de BCN150 y BOS1FL1 en Mon y Mø caninos pág. 92
- Figura 15.** Determinación de la producción de ROS en los Mon y Mø caninos infectados por BCN150 y BOS1FL1 pág. 93
- Figura 16.** Efecto de ROS sobre la capacidad de infección de BCN150 y BOS1FL1 pág. 94



Figura 17. Análisis de la expresión de IL-1 β , IL-10, TNF- α , TLR2 y TLR4 pág. 95

Figura 18. Producción de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en el cocultivo de Mon y M ϕ caninos con linfocitos autólogos pág. 96

OBJETIVO 3

Figura 19. Infectividad de BCN150 y BOS1FL1 en células DH82 pág. 104

Figura 20. Expresión diferencial de genes en las células DH82 infectadas por BCN150 y BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas pág. 106

Figura 21. Diagrama de Venn de la expresión diferencial de genes pág. 106

Figura 22. Términos GO enriquecidos en las células DH82 tras la infección por BCN150 y BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas pág. 107

Figura 23. *Heatmap* o mapa de intensidad de los genes diferencialmente expresados en las células DH82 pág. 109

Figura 24. Representación esquemática de los genes implicados en la vía de señalización PI3K – Akt pág. 113

Figura 25. Representación esquemática de los genes implicados en la vía de señalización de los receptores NLR pág. 114



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de las principales especies de <i>Leishmania</i> causantes de enfermedad en seres humanos	pág. 25
Tabla 2. Condiciones de infección <i>in vitro</i> en cultivos celulares	pág. 65
Tabla 3. Cebadores empleados en las reacciones de qRT-PCR	pág. 68
Tabla 4. Evaluación del metabolismo de la L-arginina en los ratones infectados por BCN150, POL2FL7 y BOS1FL1.....	pág. 80
Tabla 5. Ratios de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en los ratones infectados por BCN150, POL2FL7 y BOS1FL1	pág. 80
Tabla 6. Efecto de la inducción de ROS sobre el índice de infección de BCN150 y BOS1FL1 en Mon y Mø caninos	pág. 93
Tabla 7. Índice de infección de BCN150 y BOS1FL1 en células DH82	pág. 105
Tabla 8. Rutas biológicas enriquecidas seleccionadas en BCN-NI	pág. 110
Tabla 9. Rutas biológicas enriquecidas seleccionadas en BOS-NI	pág. 110

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla S1. Resultados del mapeo de las lecturas frente al genoma de referencia del perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	pág. 155
Tabla S2. Análisis de calidad de las lecturas mapeadas frente al genoma del perro	pág. 155
Tabla S3. Genes diferencialmente expresados en las células DH82 infectadas por BCN150 con respecto al control de células no infectadas	pág. 156
Tabla S4. Genes diferencialmente expresados en las células DH82 infectadas por BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas	pág. 163
Tabla S5. Términos GO enriquecidos en la categoría de procesos biológicos en las células DH82 infectadas por BCN150 con respecto al control de células no infectadas	pág. 173
Tabla S6. Términos GO enriquecidos en la categoría de procesos biológicos en las células DH82 infectadas por BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas	pág. 177
Tabla S7. Rutas biológicas enriquecidas en las células DH82 infectadas por BCN150 con respecto al control de células no infectadas	pág. 189



Tabla S8. Rutas biológicas enriquecidas en las células DH82 infectadas por BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas	pág. 190
Tabla S9. Resultados del mapeo de las lecturas frente al genoma de referencia de <i>L. infantum</i> JPCM5	pág. 191
Tabla S10. Análisis de calidad de las lecturas mapeadas frente al genoma de referencia de <i>L. infantum</i> JPCM5	pág. 191
Tabla S11. Genes diferencialmente expresados al comparar <i>L. infantum</i> BCN150 y BOS1FL1 tras la infección de células DH82	pág. 192



1

RESUMEN



RESUMEN

Título: Virulencia de aislados de *Leishmania infantum* procedentes del brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid: caracterización y evaluación en células de reservorios mamíferos.

La leishmaniosis visceral zoonótica (ZVL) producida por *L. infantum*, es una enfermedad parasitaria que constituye un gran reto para la salud pública al afectar tanto a seres humanos como a perros, siendo estos últimos el principal reservorio. Su transmisión, fundamentalmente vectorial, se lleva a cabo mediante insectos denominados flebotomos pertenecientes al género *Lutzomyia* en América Central y del Sur y *Phlebotomus* en la Cuenca Mediterránea, Oriente Medio y Asia. Se trata de una enfermedad que cursa con cuadros clínicos de gravedad variable en los hospedadores, con manifestaciones tanto cutáneas como viscerales, que pueden incluso llegar a producir la muerte de los pacientes si no se recibe el tratamiento adecuado.

En España, la ZVL se presenta de forma endémica y afecta fundamentalmente a los cánidos. Tradicionalmente el número de casos en la población humana ha sido siempre muy bajo y ha estado ligado a situaciones de inmunosupresión. Sin embargo, en los últimos años su incidencia ha aumentado a consecuencia del brote de leishmaniosis acontecido en el suroeste de la Comunidad de Madrid. Este es, hasta la fecha, el mayor brote de leishmaniosis humana declarado en Europa y ha despertado el interés de la comunidad científica al presentar importantes particularidades, entre las que se encuentra el elevado número de pacientes inmunocompetentes afectados. No obstante, al investigar los aislados responsables no se halló un nuevo genotipo emergente de *L. infantum*, sino que presentaron el mismo genotipo que la cepa MHOM/ES/87/LOMBARDI, aislada en diferentes localizaciones de la Comunidad de Madrid desde el año 1992. Además, ante la ausencia de un incremento de la prevalencia de la leishmaniosis canina, mediante estudios de xenodiagnóstico, se confirmó el papel ejercido por las liebres y los conejos como reservorios alternativos, hallándose por primera vez en la Cuenca Mediterránea un ciclo de transmisión silvestre independiente de los cánidos.

Las dimensiones ecoepidemiológicas de este brote hicieron que en el grupo de investigación INMIVET, en colaboración con otros grupos, nos planteásemos la posibilidad de que se hubiese producido un cambio en el perfil de virulencia de los aislados parasitarios responsables que pudiera explicar parte de lo acontecido. En ese contexto, centramos el objetivo general de la presente tesis doctoral que consistía en la caracterización funcional de la virulencia y tropismo diferencial de dos de estos aislados, inicialmente en un modelo murino experimental y posteriormente en un modelo de infección *ex vivo* en células de origen canino.

En primer lugar, basándonos en los resultados obtenidos en estudios previos de interacción *Leishmania*-hospedador, llevamos a cabo un ensayo de infección *in vivo* en ratones BALB/c en el que comparamos los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7, procedentes del brote, con



la cepa tradicional BCN150. Estudiamos la capacidad metastásica de los parásitos y la respuesta inmunitaria desencadenada en los animales infectados. Los resultados apuntaron a una mayor virulencia de los aislados procedentes del brote, en términos de carga parasitaria en los órganos diana (hígado y bazo) y capacidad para modular en su beneficio la respuesta inmunitaria de los hospedadores, originando un aumento de la actividad arginasa, de la respuesta humoral y un predominio de citoquinas características de un perfil antiinflamatorio. Al comparar ambos aislados procedentes del brote, BOS1FL1 presentó un fenotipo de mayor agresividad que el aislado POL2FL7.

Posteriormente, estudiamos el comportamiento del aislado BOS1FL1 y la cepa BCN150 en su interacción con células de origen canino. Para ello, caracterizamos el desarrollo *in vitro* de los parásitos estudiando su cinética de crecimiento y metacicloogénesis, sin hallar importantes diferencias entre ambos. Además, evaluamos su resistencia en condiciones de estrés oxidativo, encontrando una menor susceptibilidad del aislado BOS1FL1 al efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS). A continuación, llevamos a cabo la infección de monocitos y macrófagos derivados de sangre periférica de perro con promastigotes de ambos parásitos para estudiar su capacidad infectiva y la respuesta defensiva de las células. Los resultados mostraron una menor capacidad de infección del aislado BOS1FL1 en comparación con la cepa BCN150 en las células caninas, sin embargo, apenas se encontraron diferencias en la producción de citoquinas o compuestos con actividad leishmanicida como ROS. En función de estos resultados, el aislado BOS1FL1 mostró una menor virulencia que la cepa BCN150 en las células caninas, siendo aún necesarios más estudios para investigar en detalle los mecanismos implicados en este cambio de comportamiento.

En este contexto, llevamos a cabo un análisis del perfil transcripcional desarrollado tras la infección de la línea celular DH82 de macrófagos tumorales caninos con el aislado BOS1FL1 y la cepa BCN150 mediante secuenciación masiva del RNA. Los resultados obtenidos mostraron que la infección con *L. infantum* no inducía una importante modificación en los patrones de expresión génica celular o parasitaria. No obstante, sí se observaron algunas diferencias en la respuesta desencadenada por cada cepa o aislado parasitario como la diferente modulación de la vía de señalización PI3K-Akt. Esta vía se encuentra implicada en la supervivencia celular y, ante una infección por *Leishmania*, puede influir en la producción de citoquinas antiinflamatorias y compuestos leishmanicidas. Esto podría justificar, en parte, las diferencias observadas en la capacidad infectiva de ambos parásitos en células caninas. En su conjunto, los resultados derivados de esta tesis doctoral suponen el inicio en la caracterización de la virulencia de los aislados de *L. infantum* responsables del brote de leishmaniosis humana de la Comunidad de Madrid, sin embargo, es indispensable continuar investigando cual es el verdadero papel de la adaptación y coevolución de distintos aislados de *L. infantum* en la interacción de este protozoo con sus diferentes hospedadores.



SUMMARY

Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) caused by *L. infantum* is a parasitic disease that constitutes a major public health challenge as it affects both humans and dogs, the main reservoir. The transmission is carried by insects called phlebotomine sandflies belonging to the genus *Lutzomyia* in Central and South America and *Phlebotomus* in the Mediterranean Basin, the Middle East and Asia. It is a disease that causes a wide spectrum of clinical presentations, with both cutaneous and visceral manifestations, which can even lead to death if not adequately treated.

In Spain, ZVL is endemic and mainly affects canids. Traditionally, the number of cases in the human population has always been low and has been linked to immunosuppression states. However, in the last years, its incidence has increased due to the leishmaniasis outbreak in the southwest of the Community of Madrid. This is, to date, the largest outbreak of human leishmaniasis reported in Europe and has attracted the interest of the scientific community as it has important particularities, including the high number of immunocompetent patients affected. Nevertheless, when investigating the responsible isolates, no new emerging genotype of *L. infantum* was found, presenting the same genotype as the MHOM/ES/87/LOMBARDI strain, which has been found in different locations in the Community of Madrid since 1992. Moreover, in the absence of an increase in the prevalence of canine leishmaniasis, xenodiagnostic studies confirmed the role of hares and rabbits as alternative reservoirs, finding a novel wild transmission cycle in the Mediterranean basin independent of canids.

The ecoepidemiological features of this outbreak led the INMIVET research group, in collaboration with other groups, to consider the possibility of a change in the virulence profile of the parasite isolates from the outbreak, that could explain part of its different behaviour. In this context, we focused the general objective of this doctoral thesis on the functional characterisation of the virulence and differential tropism of two of these isolates, initially in an experimental murine model and subsequently in an *ex vivo* infection model with canine cells.

First, based on the results obtained in previous *Leishmania*-host interaction studies, we performed an *in vivo* infection assay in BALB/c mice in which we compared *L. infantum* isolates BOS1FL1 and POL2FL7 from the outbreak with the traditional BCN150 strain. We studied the metastatic capacity of the parasites and the immune response triggered in infected animals. The results showed a higher virulence of the isolates from the outbreak than BCN150, in terms of parasite load in the target organs (liver and spleen) and the ability to modulate the host immune response to their benefit, causing an increase in arginase activity, humoral response and a prevalence of cytokines characteristic of an anti-inflammatory profile. When comparing the two isolates from the outbreak, BOS1FL1 showed a more aggressive phenotype than POL2FL7.



Subsequently, we studied the behaviour of BOS1FL1 and BCN150 in their interaction with canine cells. We characterised the *in vitro* development of the parasites by studying their growth kinetics and metacyclogenesis. No significant differences were found between them. In addition, we evaluated their resistance under oxidative stress conditions, finding a lower susceptibility of BOS1FL1 to the effect of reactive oxygen species (ROS). Then, we carried out the infection of dog peripheral blood-derived monocytes and macrophages with promastigotes of both parasites to study their infective capacity and the defensive response of the cells. The results showed a lower infectivity of BOS1FL1 compared to BCN150 in canine cells, however, few differences were found in the production of cytokines or compounds with leishmanicidal activity such as ROS. Based on these results, BOS1FL1 showed lower virulence than BCN150 in canine cells, although further studies are still needed to investigate in detail the mechanisms involved in its behavioural change.

In this context, we analysed the transcriptional profile developed after infection of the canine tumour macrophage cell line DH82 with BOS1FL1 and BCN150 by RNA sequencing. The results showed that infection with *L. infantum* did not induce a significant change in cellular or parasitic gene expression patterns. However, some differences were observed in the response triggered by each parasite strain or isolate, such as the different modulation of the PI3K-Akt signalling pathway, which is involved in cell survival and response to *Leishmania* by affecting the production of anti-inflammatory cytokines and leishmanicidal compounds. This could partially explain the differences observed in both parasites when infecting canine cells. Taken together, the results obtained in this doctoral thesis represent the beginning of the virulence characterisation of the *L. infantum* isolates responsible for the human leishmaniasis outbreak in the Community of Madrid. However, it is essential to continue investigating the true role of adaptation and co-evolution of different *L. infantum* isolates in terms of the interaction of this protozoan with its different hosts.



2

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales de la leishmaniosis

1.1. Descripción biológica y morfológica

Leishmania spp. es un protozoo englobado en el subreino protozoa (Akhoundi *et al.*, 2016) y el orden kinetoplastida (Honigberg, 1963), cuyos miembros se caracterizan por presentar en todas sus formas una estructura circular de ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, denominada kinetoplasto (Filardy *et al.*, 2018). Dentro de este orden se encuentra la familia Tripanosomatidae (Doflein, 1901), compuesta por protozoos patógenos que, a su vez, se dividen en dos categorías: los tripanosomátidos monoxenos, que desarrollan su ciclo biológico completo en un único hospedador y cuyo interés científico está creciendo en los últimos años (Yurchenko *et al.*, 2014), y los tripanosomátidos heteroxenos que, por el contrario, requieren de al menos dos hospedadores distintos. Estos últimos están representados por dos géneros diferenciados, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Wheeler *et al.*, 2013), ambos de gran relevancia sanitaria al ser responsables de enfermedades que presentan una alta incidencia en el ser humano (Barrett and Croft, 2012).

Estos parásitos tienen en su ciclo biológico distintas fases morfológicamente bien diferenciadas. *Leishmania*, en concreto, es un parásito dimórfico con una fase infectiva extracelular denominada promastigote y una fase intracelular denominada amastigote (Kaufer *et al.*, 2017).

La estructura celular de los tripanosomátidos comparte importantes características con el resto de células eucariotas, pero también posee rasgos distintivos como por ejemplo la presencia de orgánulos específicos. Estas estructuras les permiten realizar funciones esenciales, resultando su estudio muy interesante para la búsqueda de dianas terapéuticas (Rodrigues *et al.*, 2014). Entre las características morfológicas diferenciales más importantes de los tripanosomátidos se encuentran (**Figura 1**):

La **membrana plasmática**, formada por un conjunto de proteínas y lípidos anclados a grupos glicosilfosfatidilinositol (GPI) (McConville and Ferguson, 1993). Su composición específica varía en función del género, de modo que en *Leishmania spp.* la proporción de glicofosfolípidos es mayor que en otros tripanosomátidos, siendo el más abundante de los mismos el lipofosfoglicano (LPG) (McConville and Ferguson, 1993; Ilgoutz and McConville, 2001). Éste, junto con otros componentes de la membrana como el proteofosfoglicano (PPG) o la glicoproteína de superficie GP63, actúan como importantes factores de virulencia para el parásito (Forestier *et al.*, 2014). La membrana plasmática recubre a los protozoos delimitando el cuerpo celular y el flagelo, invaginándose alrededor de este último para crear el bolsillo flagelar (Rodrigues *et al.*, 2014), lugar donde se llevan a cabo procesos de tráfico vesicular



(endocitosis y exocitosis), determinantes de la patogenicidad (Gadelha *et al.*, 2009; Sunter *et al.*, 2019).

El **flagelo**, una estructura formada por microtúbulos que se organizan dando lugar a un axonema cuya longitud y disposición varía en función del género y el estadio parasitario (Wheeler *et al.*, 2015). De esta manera los tripanosomátidos se pueden dividir en dos clases morfológicas: “yuxtaforme”, que son aquellos que presentan el flagelo adherido lateralmente al cuerpo celular y están representados por el género *Trypanosoma*; y “liberoforme” que son los que presentan un flagelo libre que no se adhiere al cuerpo celular, salvo en su base, y están representados por el género *Leishmania* (Kaufer *et al.*, 2017). En la forma intracelular de amastigote, el flagelo presenta una longitud muy reducida, pero sin llegar a desaparecer. En la forma libre extracelular de promastigote, el flagelo desempeña funciones fundamentales para su mantenimiento tanto en el hospedador vertebrado como invertebrado, relacionadas con la motilidad, la adhesión y la capacidad sensorial (Sunter and Gull, 2017).

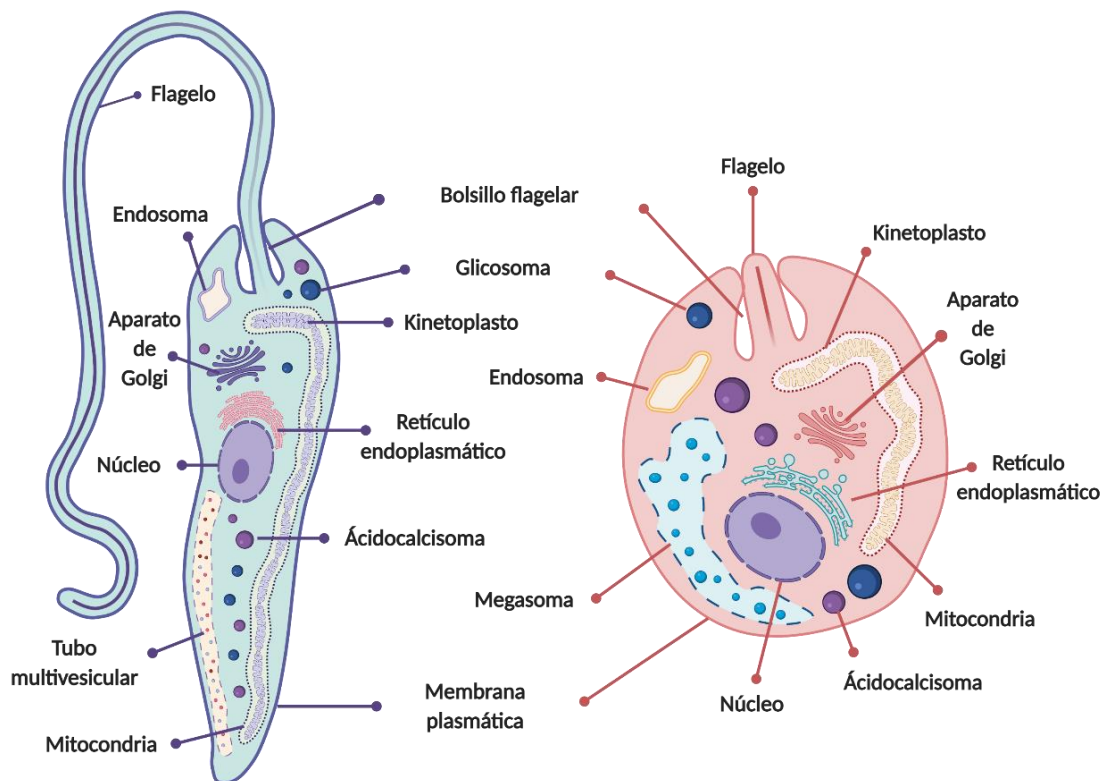


Figura 1. Representación esquemática de las características morfológicas más importantes de *Leishmania spp.* Figura creada con *BioRender*.

El **kinetoplasto**, localizado en el extremo basal de la mitocondria, que en el caso de los tripanosomátidos es única y se encuentra distribuida a lo largo de todo el cuerpo celular (Menna-Barreto and de Castro, 2014). Éste, aparece como una masa de DNA mitocondrial extranuclear “kDNA” organizado en estructuras circulares denominadas maxicírculos y minicírculos; y constituye cerca del 25% del total del material genético parasitario (Kaufer *et al.*,



2019). En los maxicírculos se codifican diferentes genes relacionados con el metabolismo energético y la respuesta oxidativa, mientras que los minicírculos contienen el material genético no codificante que actúa como guía para la transcripción de los maxicírculos (Menna-Barreto and de Castro, 2014).

Los **glicosomas**, orgánulos citoplasmáticos característicos de los tripanosomátidos relacionados con el metabolismo energético (Bakker *et al.*, 2000).

1.2. Distribución, vectores y hospedadores

La organización mundial de la salud (WHO) define las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD) como un grupo de enfermedades transmisibles que prevalecen en las regiones tropicales y subtropicales afectando a más de mil millones de personas cada año. Se denominan desatendidas u olvidadas porque no han recibido la atención necesaria al afectar, de manera general, a países en vías de desarrollo y poblaciones que viven en condiciones de pobreza, sin un adecuado acceso a los sistemas sanitarios (WHO). Dentro de este grupo, la leishmaniosis ha adquirido una especial relevancia al experimentar un importante incremento en su incidencia. Su **distribución** geográfica mundial, presente en los cinco continentes, y su notable expansión en los últimos años hasta hacerse endémica en 98 países con 350 millones de personas viviendo en áreas de riesgo, son claros ejemplos de ello (Alvar *et al.*, 2012; Akhoundi *et al.*, 2016).

Del total de 53 especies reconocidas dentro del género *Leishmania*, 29 se encuentran distribuidas en el Viejo Mundo (Europa meridional, África, Oriente Medio, Asia central y el Subcontinente Indio), 20 en el Nuevo Mundo (América central y del Sur), 3 están presentes en ambos y solamente una se encuentra en Australia. Además, de entre todas ellas, 31 resultan patógenas para los mamíferos y 20 son responsables de las diferentes formas clínicas de la enfermedad en los humanos (Akhoundi *et al.*, 2016).

Leishmania infantum es una de las especies de mayor relevancia, ya que, no sólo se encuentra presente tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, sino que además es el agente causal de la leishmaniosis visceral zoonótica (ZVL) (Quinnell and Courtenay, 2009). Afecta fundamentalmente a seres humanos y perros, siendo éstos el reservorio más importante de la enfermedad. Los cuadros clínicos desencadenados en los seres humanos varían desde la leishmaniosis cutánea (CL) hasta cuadros mucho más graves de leishmaniosis visceral (VL) (Leveque *et al.*, 2020).

La amplia distribución de la leishmaniosis está directamente relacionada con su **transmisión vectorial**, que depende de la alimentación de hembras hematófagas de insectos denominados flebotomos. Taxonómicamente estos vectores están clasificados en el orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae (Akhoundi *et al.*, 2016). Además, dentro de esta familia, se encuentran distintos géneros que se distribuyen geográficamente, de modo que el género *Phlebotomus* es el principal responsable de la transmisión de la



leishmaniosis en el Viejo Mundo y el género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Pace, 2014). El género *Sergentomyia* ha cobrado relevancia en los últimos años al encontrarse evidencias de su relación con *Leishmania spp.*, si bien su posible papel como vector aún tiene que ser evaluado en profundidad (Maia and Depaquit, 2016).

En concordancia con las áreas de presentación de la leishmaniosis, estos dípteros se encuentran mayoritariamente distribuidos en las regiones más cálidas de Europa, Asia, África y América Central y del Sur (Killick-Kendrick, 1999). Sin embargo, impulsados por el cambio climático y el calentamiento global, están en continua expansión pudiendo llegar a encontrarse, en la actualidad, en países del centro de Europa como Alemania o Bélgica e, incluso, en regiones del suroeste de Canadá. Únicamente están ausentes en Nueva Zelanda y las islas del Pacífico (Killick-Kendrick, 1999; Aspöck *et al.*, 2008).

El ciclo completo de desarrollo de los flebotomos requiere de 35 - 69 días y atraviesa cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras deben ingerir al menos una vez sangre para llevar a cabo la oviposición, que realizan en hábitats húmedos y cálidos con un alto contenido orgánico, lo que proporciona a las formas inmaduras refugio y nutrición. Las formas adultas son muy pequeñas (en torno a 3,5 mm de longitud) y sus periodos de actividad se concentran en las primeras y últimas horas del día. Presentan una marcada estacionalidad, condicionada principalmente por la temperatura y humedad ambientales, en los meses más cálidos (Maroli *et al.*, 2013). Existen estudios que demuestran que los flebotomos no sólo actúan como vectores en la transmisión de la leishmaniosis, sino que modulan y condicionan la interacción del parásito con los hospedadores vertebrados. La saliva de estos insectos contiene componentes anticoagulantes, antiplaquetarios, vasodilatadores y moléculas inmunomoduladoras que influyen directamente sobre la respuesta inmunitaria desarrollada en el hospedador y el establecimiento de la infección (Andrade *et al.*, 2007).

Existen otras vías de transmisión, independientes de la vía vectorial, como la transmisión venérea y la transmisión vertical transplacentaria (Boggiatto *et al.*, 2011; Boechat *et al.*, 2020), pero son mucho más infrecuentes y su conocimiento, especialmente en la especie humana, está mucho más limitado.

Los parásitos del género *Leishmania* necesitan al menos dos elementos para el mantenimiento de su ciclo biológico: vectores y **hospedadores**. Existe un gran abanico de especies vertebradas (carnívoros, marsupiales, lagomorfos, roedores, primates y murciélagos) que pueden ser infectadas y actuar como hospedadores mamíferos (Maia, 2018; Azami-Conesa *et al.*, 2020), sin embargo, no todas ellas pueden ser consideradas reservorio de la enfermedad. La figura del reservorio se define como aquella especie que resulta fundamental para garantizar la supervivencia de este protozoo a largo plazo y su transmisión a nuevos vectores y hospedadores (Ashford, 1996).



A menudo diferentes hospedadores toman partido en el ciclo de transmisión de una misma especie de *Leishmania*, pudiendo clasificarse en: reservorios primarios, principales responsables del manteniendo del parásito; reservorios secundarios, capaces de mantener la circulación del mismo al transmitirlo a otros hospedadores y vectores, requiriendo para ello del reservorio primario; y hospedadores accidentales, que pueden resultar infectados sin desempeñar ninguna función clave en el ciclo de transmisión (Quinnell and Courtenay, 2009; Maia, 2018).

Basándonos en el reservorio principal, las distintas especies del género *Leishmania* se pueden dividir en dos categorías epidemiológicas: antroponóticas, que desarrollan su ciclo utilizando al ser humano como único reservorio y son las que tienen una menor representación; y zoonóticas, las que tienen como reservorio principal a los mamíferos domésticos y salvajes, pero también infectan al ser humano (**Tabla 1**) (Gramiccia and Gradoni, 2005).

Tabla 1. Principales especies de *Leishmania* causantes de enfermedad en seres humanos

Subgénero	Especie	Ciclo de transmisión	Distribución	Forma clínica
<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i>	Zoonótico	NW	CL
	<i>L. mexicana</i>	Zoonótico	NW	CL
	<i>L. pifanoi</i>	Zoonótico	NW	CL
	<i>L. aethiopica</i>	Zoonótico	OW	CL
	<i>L. major</i>	Zoonótico	OW	CL
	<i>L. tropica</i>	Antroponótico	OW	CL
	<i>L. donovani</i>	Antroponótico	OW	VL
	<i>L. infantum</i>	Zoonótico	NW, OW	VL, CL
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	Zoonótico	NW	CL, MCL
	<i>L. panamensis</i>	Zoonótico	NW	CL, MCL
	<i>L. guyanensis</i>	Zoonótico	NW	CL
	<i>L. peruviana</i>	Zoonótico	NW	CL

L. infantum (también conocida como *L. chagasi*) es una especie zoonótica cuya transmisión vectorial depende de *Lutzomyia longipalpis* en América central y del Sur; mientras que es vectorizada por distintas especies del género *Phlebotomus* en la Cuenca Mediterránea, Oriente Medio y Asia (Maroli *et al.*, 2013), constituyendo un gran reto al que se enfrenta la salud pública. Los cánidos domésticos han sido tradicionalmente el reservorio más importante de esta especie parasitaria, convirtiéndola en el principal agente causal de leishmaniosis canina (CanL) (Moreno and Alvar, 2002). No obstante, *L. infantum* es capaz de infectar a otras especies de mamíferos, como los lepóridos (liebres y conejos), que han demostrado su capacidad para ejercer como reservorios secundarios, desempeñando un papel muy importante tanto en la aparición de nuevos brotes como en la expansión de la enfermedad (Molina *et al.*, 2012; Jimenez *et al.*, 2014).



Por otro lado, en el contexto epidemiológico y de control, existen otras especies como los gatos que adquieren especial relevancia al encontrarse en contacto estrecho con el hombre y los cánidos, aunque se desconoce su papel exacto (Maia and Campino, 2011).

1.3. Taxonomía, ciclo biológico y fases del desarrollo de *Leishmania*

A lo largo de la historia se ha intentado clasificar taxonómicamente el género *Leishmania* en diferentes subgéneros y especies atendiendo a distintos criterios. Uno de lo más acertados resultó ser el de Laison *et al.* en 1979, basado en la localización del desarrollo parasitario dentro del tubo digestivo del insecto vector. Se diferenciaron tres porciones del tubo digestivo: la región hipopilórica (detrás del píloro), que dio lugar al subgénero *L. (Sauroleishmania)*, la región peripilórica y la región suprapilórica. Unos años más tarde, en 1987, Laison y Shaw asignaron el subgénero *L. (Viannia)* a los protozoos desarrollados en las zonas adyacentes al píloro y el subgénero *L. (Leishmania)* a los que se desarrollaban con anterioridad al mismo (Lainson *et al.*, 1979; Akhoundi *et al.*, 2016; Kaufer *et al.*, 2017). Sin embargo, con el estudio de nuevos parámetros como la distribución geográfica o diferentes aspectos intrínsecos del parásito, bioquímicos, inmunológicos y moleculares, esta clasificación se ha ido revisando y adaptando para dar lugar a una nueva (Akhoundi *et al.*, 2016). En la actualidad se distinguen dos líneas filogenéticas bien diferenciadas: Euleishmania, formada por los subgéneros *L. (Leishmania)*, *L. (Sauroleishmania)*, *L. (Viannia)* y el complejo *L. enrietti*; y Paraleishmania que está formada por el subgénero *L. (Endotrypanum)*, si bien su naturaleza resulta mucho más controvertida (Cupolillo *et al.*, 2000).

El ciclo biológico de *Leishmania* se divide en tres etapas relacionadas con cambios en su morfología: amastigogénesis, promastigogénesis y metaciclogénesis (**Figura 2**).

La amastigogénesis comienza cuando, durante la ingesta de sangre, la hembra infectada del flebotomo regurgita la fase infectiva del parásito, promastigotes metacíclicos, en el hematoma dérmico del hospedador (**Figura 2, punto 1**), desencadenando así una respuesta inflamatoria local (Cojean *et al.*, 2020). Entre las células inmunitarias del sistema fagocitario, los neutrófilos y macrófagos son los primeros en entrar en contacto con *Leishmania* a través de diferentes receptores de superficie, como los receptores tipo Toll (TLR) o del complemento (CR1 y CR3), y llevan a cabo su fagocitosis (**Figura 2, punto 2**) (Conceicao-Silva and Morgado, 2019). Una vez en el interior del fagosoma los promastigotes se diferencian en amastigotes (**Figura 2, punto 3**), que son las formas parasitarias intracelulares y tienen un tamaño aproximado de 2-4 μm . Éstos permanecen en el interior de la vacuola parasitófora (PV), en un proceso mediado por el aumento de la temperatura, el descenso del pH y la ausencia de nutrientes (De Pablos *et al.*, 2016). En función de la especie de *Leishmania*, los amastigotes pueden residir en una gran vacuola comunal o, como en el caso de *L. infantum*, en vacuolas individualizadas que les proporcionan el ambiente adecuado para su desarrollo y multiplicación (**Figura 2, punto 4**)



(Young and Kima, 2019). Para ello, los amastigotes cuentan con mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Podinovskaia and Descoteaux, 2015; Alves *et al.*, 2018).

Cuando se alcanza una alta carga de amastigotes en el interior de la célula fagocítica, esta se lisa y son liberados al torrente sanguíneo (**Figura 2, punto 5**). En caso de permanecer en la dermis infectando células próximas, se desencadenan cuadros clínicos locales característicos de la CL. Por el contrario, si se produce una diseminación sistémica de los amastigotes, estos metastatizan a órganos diana (bazo, hígado, médula ósea y nódulos linfáticos), desencadenando cuadros de VL de gravedad variable que pueden causar la muerte del hospedador (Kima, 2007; Steverding, 2017).

El ciclo biológico parasitario continua cuando un nuevo flebotomo ingiere sangre infectada al alimentarse del hospedador (**Figura 2, punto 6**), comenzando así la etapa de promastigogénesis que tiene una duración de 24 - 48h (De Pablos *et al.*, 2016). En ella, los amastigotes se convierten en promastigotes procíclicos (Bates, 1994), capaces de escapar de la matriz peritrófica, una envoltura de carácter glicoproteico que forma el sistema inmunitario del vector a modo de barrera protectora para las células epiteliales del intestino medio abdominal (**Figura 2, punto 7**) (Shao *et al.*, 2001). Los promastigotes procíclicos se caracterizan por adoptar una morfología elipsoidal con un flagelo y cuerpo celular reducidos, con un tamaño de entre 6 y 8 μm , y se multiplican de forma activa, aumentando la carga parasitaria en el insecto vector (Bates and Rogers, 2004).

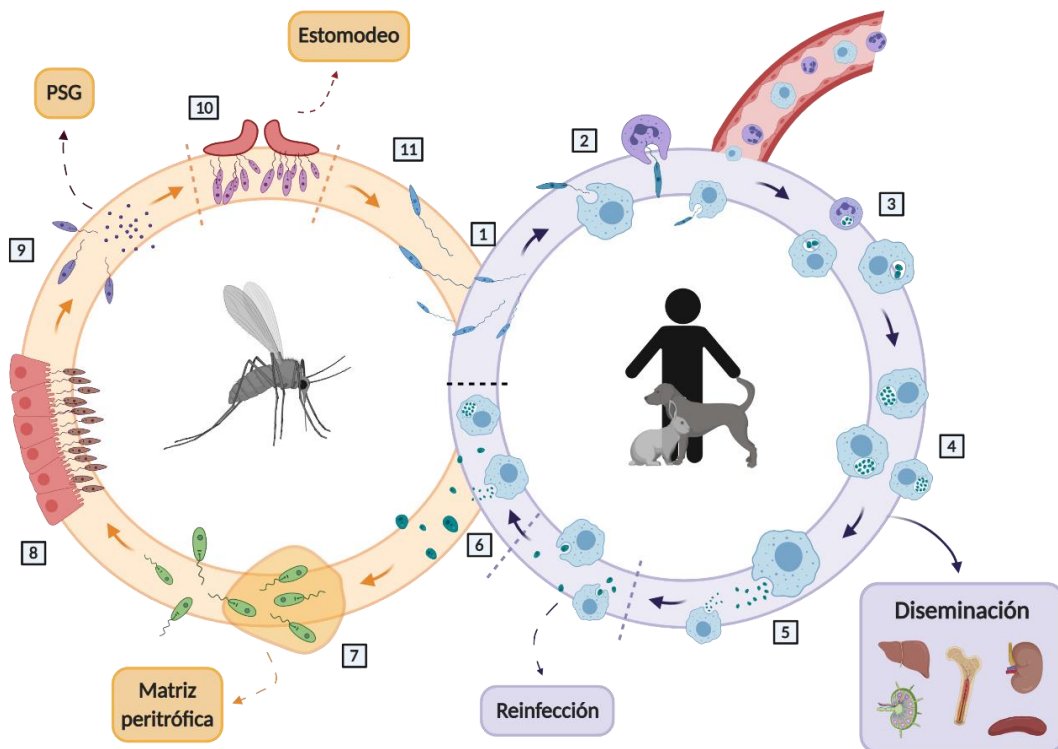


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania spp.* Figura creada con BioRender.



La metacicloogénesis constituye la última etapa del ciclo de desarrollo biológico del parásito (De Pablos *et al.*, 2016), durante la cual los promastigotes procíclicos adquieren diferentes morfologías intermedias, con funciones específicas, hasta alcanzar la forma definitiva e infectiva de promastigotes metacíclicos (Bates, 1994).

La primera diferenciación se lleva a cabo entre 2 y 3 días después de la alimentación del vector y da lugar a la forma de promastigotes *nectomonas* (Bates and Rogers, 2004). El cuerpo y el flagelo de los promastigotes procíclicos incrementan su longitud hasta alcanzar un tamaño de entre 12 y 20 μm , dotando a estas nuevas formas de una gran capacidad móvil que favorece su migración hacia las zonas anteriores del tubo digestivo (**Figura 2, punto 8**). Una vez en la región torácica, estas formas se adhieren con su flagelo entre las microvellosidades intestinales (Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Esta diferenciación se produce en respuesta a la disminución de los niveles de nutrientes, pH y óxido nítrico. Cuando se reproduce el desarrollo de *Leishmania in vitro*, esta etapa del ciclo coincide con la fase exponencial tardía de cultivo (Bates and Rogers, 2004).

A partir de los promastigotes *nectomonas* se diferencian los promastigotes *leptomonas* que, al igual que los procíclicos, son una fase multiplicativa (**Figura 2, punto 9**). Presentan un tamaño ligeramente inferior, en torno a 7 μm , y se localizan en el lumen intestinal. Su principal función es la de producir una sustancia rica en proteofosfoglicanos, denominada gel secretado por promastigotes (PSG), que favorece la transmisión y el desarrollo de las fases infectivas (Rogers *et al.*, 2002).

Los promastigotes *haptomonas* son una forma intermedia caracterizada por presentar prolongaciones con las cuales se adhieren a la superficie de la válvula estomodeal del vector (**Figura 2, punto 10**). Su origen, posiblemente a partir de los promastigotes *nectomonas*, genera controversia, pero su función parece estar relacionada con favorecer la transmisión al hospedador vertebrado (Bates and Rogers, 2004).

Por último, los promastigotes *leptomonas* sufren una modificación en la composición de las moléculas de LPG que recubren su superficie, lo que disminuye su adhesión al epitelio intestinal, quedando libres en la parte anterior del tubo digestivo y dando lugar a los promastigotes metacíclicos (Sacks *et al.*, 1994; Coelho-Finamore *et al.*, 2011). Éstos se caracterizan por presentar una morfología alargada (5–8 μm), con un flagelo que duplica la longitud del cuerpo celular, adaptada para su motilidad, y constituyen la fase infectiva para los hospedadores vertebrados (**Figura 2, punto 11**). Cuando se reproduce su desarrollo *in vitro* su diferenciación coincide con la fase estacionaria de cultivo (Bates and Rogers, 2004).

El ciclo se completa cuando el flebotomo se alimenta de un nuevo hospedador mamífero sano al que infecta con promastigotes metacíclicos.



1.4. Sintomatología y cuadros clínicos

1.4.1. Leishmaniosis humana

Los diferentes cuadros clínicos y formas de presentación de la leishmaniosis dependen en gran medida de las especies implicadas en el binomio protozoo/vector. Sin embargo, como ocurre en el caso de *L. infantum*, en ocasiones un mismo binomio puede dar lugar a distintos cuadros clínicos en función de cómo se desarrolle la respuesta inmunitaria en el hospedador (Lauthier, 2018).

Leishmaniosis cutánea (CL)

La CL es la forma de presentación más habitual, con una incidencia de entre 700.000 y 1,2 millones de casos anuales en todo el mundo (Alvar *et al.*, 2012). Es producida por un amplio abanico de especies, entre las que se encuentran *L. major* y *L. tropica* en el Viejo Mundo y *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. mexicana* en América central y del Sur (McGwire and Satoskar, 2014). *L. infantum*, a pesar de ser una especie fundamentalmente viscerotrópica, también puede dar lugar a este tipo de presentación (**Tabla 1**) (Barkati *et al.*, 2019).

Las manifestaciones cutáneas suelen ser de tipo leve y se caracterizan por la aparición de lesiones papulares o nodulares, generalmente asociadas al punto de inoculación del parásito en la dermis del hospedador, que pueden evolucionar hasta lesiones ulcerativas (Dos Santos Meira and Gedamu, 2019). La progresión de la enfermedad está estrechamente relacionada con el tipo de respuesta inmunitaria desencadenada en el hospedador. Cuando se desencadena una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) de tipo celular, caracterizada por la producción de interferón (IFN)- γ , se favorece el control de la infección (Scott and Novais, 2016). Los hospedadores capaces de desarrollar esta respuesta presentan cuadros de CL localizados con un escaso número de lesiones que pueden llegar a resolverse sin necesidad de tratamiento (Scorza *et al.*, 2017). Por el contrario, cuando la respuesta inmunitaria del hospedador no es eficaz, puede incluso aparecer un cuadro mucho más grave de leishmaniosis cutánea difusa (DCL), caracterizada por la diseminación de las lesiones que ocupan toda la superficie corporal con una intensa proliferación de los parásitos (Dos Santos Meira and Gedamu, 2019).

Leishmaniosis mucocutánea (MCL)

La MCL es una forma de leishmaniosis menos frecuente, que concentra su mayor incidencia en América del Sur, concretamente en Brasil, Bolivia y Perú, y es producida fundamentalmente por *L. braziliensis* (Desjeux, 2004; Dos Santos Meira and Gedamu, 2019). Se desencadena como consecuencia de una CL en la que los parásitos persisten en las cicatrices de las lesiones, desencadenando una respuesta inmunitaria exagerada que, en lugar de resultar positiva para el control de la infección, da lugar a una intensa inflamación y a la destrucción de los tejidos (Dos Santos Meira and Gedamu, 2019). Esto lleva a la aparición de lesiones que metastatizan, por vía



hematógena o linfática, hasta las superficies mucosas del tracto respiratorio y digestivo superiores, desfigurando el rostro de los pacientes afectados (Scorza *et al.*, 2017).

Leishmaniosis cutánea recidivante (RCL)

Este cuadro clínico es consecuencia de la elevada capacidad que tiene *Leishmania* para sobrevivir en el organismo del hospedador infectado de forma silente a pesar de que este haya logrado la curación sintomatológica (Marovich *et al.*, 2001). Se presenta en pacientes que han sufrido un cuadro de CL con anterioridad y se caracteriza por la aparición de nuevas lesiones, en las mismas localizaciones o adyacentes a las cicatrices del cuadro primario, que son indoloras y no ulcerativas. Puede presentarse en intervalos de tiempo muy amplios con respecto al cuadro primario y su tratamiento, al igual que en la MCL, resulta muy complejo (McGwire and Satoskar, 2014; Scorza *et al.*, 2017).

Leishmaniosis visceral (VL)

La VL, también conocida como “Kala-azar”, es la forma más grave de leishmaniosis. Ocupando el segundo lugar en mortalidad y cuarto en morbilidad entre las enfermedades tropicales, es responsable de entre 20.000 y 40.000 muertes anuales (McCall *et al.*, 2013). En el Viejo Mundo existen fundamentalmente dos especies implicadas: *L. donovani*, en las regiones de India, Pakistán, China y África, y *L. infantum* en la Cuenca Mediterránea (**Tabla 1**). En el Nuevo Mundo únicamente ésta última es responsable de su incidencia (McGwire and Satoskar, 2014). Se desencadena cuando la respuesta inmunitaria del hospedador no logra impedir la diseminación de los amastigotes libres o las células infectadas, que alcanzan órganos diana como el hígado o el bazo (Zijlstra, 2016). Cursa con un cuadro clínico muy amplio que puede incluir desde pérdida de peso; distensión y dolor abdominal, como consecuencia del aumento del tamaño del hígado y el bazo; y fiebre, entre los signos más habituales, hasta manifestaciones neurológicas y autoinmunes (Zijlstra, 2016).

En la Cuenca Mediterránea la incidencia de la VL ha sido siempre baja y ha estado tradicionalmente ligada a situaciones de inmunosupresión, encontrándose una mayor susceptibilidad en mujeres embarazadas, niños y pacientes con enfermedades concomitantes como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS) (McGwire and Satoskar, 2014). Sin embargo, esta situación está cambiando y prueba de ello es el brote de leishmaniosis acontecido en la Comunidad de Madrid que no solo incluye casos de CL sino también de VL, implicando un alto número de pacientes (Horrillo *et al.*, 2019).

Leishmaniosis dérmica Post-Kala-Azar (PKDL)

La PKDL es una forma de enfermedad que se presenta de manera secundaria a un cuadro de VL en pacientes infectados por *L. donovani*. La mayor parte de los casos se concentran en el sur de Asia y en África y se caracteriza por la presencia de lesiones dérmicas maculares o papulares. Se puede desencadenar en los hospedadores una vez la VL ha remitido por completo o cuando aún



se está recibiendo el tratamiento, y en escasas ocasiones se presenta en pacientes que no han sido nunca diagnosticados de VL. No implica un riesgo para la vida del hospedador, pero sí tiene un gran interés epidemiológico, debido al potencial papel de reservorio que ejercen los pacientes como consecuencia de la gran carga parasitaria presente en sus lesiones (Mukhopadhyay *et al.*, 2014; Zijlstra, 2016).

1.4.2. Leishmaniosis canina (CanL)

Tanto la ZVL como la CanL comparten un mismo agente causal, *L. infantum*. Los cánidos actúan como principal reservorio, manteniendo la transmisión de la enfermedad entre ellos mismos y la especie humana, convirtiéndola en una zoonosis de gran relevancia sanitaria (Gramiccia and Gradoni, 2005). La CanL es endémica en 50 países distribuidos en el Nuevo y Viejo Mundo y su incidencia varía entre las distintas regiones, siendo especialmente elevada en la Cuenca Mediterránea y Brasil (Campino, 2018).

Al igual que en la especie humana, el establecimiento de la enfermedad en los cánidos está muy relacionado con distintos factores genéticos del hospedador, el vector y el aislado parasitario, así como otros aspectos relacionados con la edad, el sexo, la raza y la naturaleza de la respuesta inmunitaria desarrollada en el animal (Alvar *et al.*, 2004; Maia and Campino, 2018).

Los signos clínicos de la CanL no se agrupan en cuadros bien diferenciados, como en el caso de la leishmaniosis humana, sino que originan cuadros mixtos en los que la afectación puede ser local y sistémica al mismo tiempo (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Entre los signos clínicos más habituales se encuentran: linfadenopatía generalizada, pérdida de peso progresiva, atrofia muscular, hepatoesplenomegalia, poliuria, polidipsia, epistaxis, cojera, vómitos y diarrea (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A nivel cutáneo los animales presentan cuadros de dermatitis no pruriginosa, que pueden ser localizados o generalizados, acompañados a menudo de hiperqueratosis nasal y onicogrifosis (Ribeiro *et al.*, 2018). Los cuadros más severos implican la afectación sistémica de órganos vitales entre los que el más afectado es el riñón, siendo la insuficiencia renal la principal causa de muerte en los cánidos infectados (Campino, 2018). No obstante, existen otras manifestaciones clínicas menos habituales como las alteraciones oftalmológicas o neurológicas (Maia *et al.*, 2015). Además, existe un elevado porcentaje de animales que desarrollan cuadros asintomáticos que pueden resolverse o dar lugar a la aparición de sintomatología cuando se produce un desequilibrio en su sistema inmunitario (Campino, 2018).

1.5. Diagnóstico, tratamiento y control

1.5.1. Diagnóstico

La gran variedad de cuadros clínicos de la leishmaniosis humana y canina, que a menudo comparten sintomatología o se presentan de forma simultánea a otras enfermedades, y la



presencia de portadores asintomáticos dificultan mucho su diagnóstico e influyen directamente en su control (Thakur *et al.*, 2020).

Para lograr un diagnóstico fiable y temprano se debe emplear un enfoque transversal que tenga en cuenta los aspectos clínicos y epidemiológicos y que se apoye en diferentes técnicas laboratoriales parasitológicas, moleculares y/o serológicas (Gramiccia, 2018).

El diagnóstico parasitológico consiste en la observación directa de las formas parasitarias en los individuos infectados mediante microscopía. Permite tanto la detección de los amastigotes intracelulares, a partir de biopsias de los órganos diana en el caso de la VL o de lesiones cutáneas en el caso de a CL y MCL; como la detección de los promastigotes flagelados tras su adecuado cultivo. Este tipo de diagnóstico tiene una gran especificidad, pero requiere de tiempo y la toma de muestras puede ser muy invasiva (Elmahallawy *et al.*, 2014). En este sentido, se han desarrollado algunos kits de detección de antígenos de *Leishmania* en orina que facilitan y reducen el tiempo de diagnóstico, pero cuya sensibilidad es muy variable (Vogt *et al.*, 2018).

El diagnóstico molecular basado en técnicas de amplificación del material genético de *Leishmania*, como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) o cuantitativa (qPCR), se ha impuesto en los últimos años como método de elección por su elevada especificidad y sensibilidad (Gramiccia, 2018). Utilizando el kDNA presente en los maxicírculos y minicírculos y el DNA ribosomal, las técnicas moleculares permiten incluso la identificación del agente causal a nivel de especie y cepa (Cruz *et al.*, 2002; Buitrago *et al.*, 2011). Sin embargo, tiene un elevado coste y resulta de difícil aplicación en las regiones más desfavorecidas (Elmahallawy *et al.*, 2014).

El diagnóstico serológico es de tipo indirecto y se basa en la inmunodetección de anticuerpos específicos frente al parásito mediante ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFAT), Western Blot (WB), test de aglutinación directa (DAT) o inmunocromatografía (ICT). Tiene una mayor utilidad en los cuadros de VL que presentan una mayor respuesta inmunitaria humoral (Thakur *et al.*, 2020). Este tipo de diagnóstico resulta rápido y económico, pero tiene importantes limitaciones. La imposibilidad de distinguir entre individuos que han tenido contacto con el parásito en el pasado y los que tienen una infección activa, o la presencia de anticuerpos en pacientes clínicamente sanos en las zonas endémicas, hacen que sean técnicas que deben ser complementadas con el análisis clínico (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Por último, existe una técnica de diagnóstico basada en la evaluación de la respuesta inmunitaria de DTH desarrollada ante una infección por *Leishmania* conocida como Reacción de Montenegro. Sin embargo, es una técnica que da lugar a resultados variables en función de la cepa parasitaria y su estandarización resulta muy compleja (Gramiccia, 2018).



En ausencia de un método diagnóstico de elección, en la actualidad, se están haciendo avances incorporando herramientas novedosas como la citometría de flujo o los estudios proteómicos a las técnicas disponibles (De Brito *et al.*, 2020). No obstante, el uso de distintas técnicas combinado con el análisis de la situación clínico-epidemiológica de cada caso sigue siendo necesario.

Los métodos diagnósticos de la CanL no difieren en gran medida de los empleados en la especie humana y se basan en criterios epidemiológicos y clínicos que se combinan con las técnicas laboratoriales anteriormente descritas (Alvar *et al.*, 2004). Detectar de manera temprana los casos de enfermedad en los cánidos permite la implementación de tratamientos específicos que reducen la carga parasitaria en los animales infectados y mejoran el pronóstico y la calidad de vida de los mismos.

1.5.2. Tratamiento

Existe un amplio repertorio de herramientas terapéuticas para las distintas formas de leishmaniosis. La elección de una u otra depende de múltiples factores como la naturaleza de la especie parasitaria, el área geográfica, el cuadro desencadenado o el estado inmunitario del hospedador (Croft *et al.*, 2006).

De manera general, el tratamiento se debe basar en el uso de moléculas con capacidad leishmanicida, entre las que se encuentran los antimoniales pentavalentes (Frezard *et al.*, 2009), la anfotericina-B (de aplicación directa o en formulación lipídica) (Sundar *et al.*, 2007), la miltefosina (Sundar *et al.*, 2002) o la paramomicina (Kim *et al.*, 2009). Estos fármacos, a su vez, se combinan con otras terapias adyuvantes y de soporte en función de cada caso. En la progresión de la enfermedad la respuesta inmunitaria del hospedador es determinante por lo que incluir terapias inmunomoduladoras, que favorezcan un perfil inmunitario protector, resulta muy interesante, especialmente en los casos de VL y en las coinfecciones con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Roatt *et al.*, 2020).

Además, en los cuadros localizados de CL y MCL se puede recurrir al uso de tratamientos locales intralesionales, como la crioterapia o el dióxido de carbono (CO₂), que favorezcan la reducción de la carga parasitaria y la curación de las lesiones (Asilian *et al.*, 2004).

La escasez de moléculas leishmanicidas, los elevados costes, la larga duración de los tratamientos y la aparición de resistencias parasitarias son limitaciones que hay que tener en cuenta (Hendrickx, 2018). Por tanto, es recomendable aplicar terapias combinadas que de forma sinérgica puedan reducir los efectos adversos y mejorar los resultados (Thakur *et al.*, 2020).

Salvo algunas variaciones, el tratamiento de la CanL se basa en las mismas herramientas terapéuticas diseñadas para su uso en medicina humana. Si la anfotericina-B es uno de los fármacos más utilizados en la especie humana, en los cánidos se recurre con mayor frecuencia



a los antimoniales pentavalentes o la miltefosina (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Además, estos tratamientos se administran siempre en conjunto con alopurinol, una molécula análoga de las purinas que, a pesar de ser utilizada en medicina humana en escasas situaciones (Husein-EIAhmed *et al.*, 2020), ha demostrado tener un efecto positivo en la mejoría clínica de la CanL y en la reducción de la carga parasitaria de los animales infectados (Yasur-Landau *et al.*, 2016).

1.5.3. Prevención y Control

La gran variedad de agentes implicados y formas de presentación de la leishmaniosis, hacen necesario para su control un enfoque multidisciplinar con medidas que se apliquen simultáneamente sobre los vectores, hospedadores y reservorios, en el caso de las formas zoonóticas (Boelaert, 2018).

Su transmisión, fundamentalmente vectorial, permite la aplicación de medidas de prevención que minimicen la exposición de los hospedadores al contacto con los flebotomos. En zonas endémicas se pueden utilizar insecticidas en las viviendas o aplicados sobre redes en los puntos de acceso a las mismas. Además, existen formulaciones tópicas de estos mismos compuestos para su uso directo sobre la piel de las personas, pero la corta duración de su efecto hace necesario aplicarlos de forma repetida (Boelaert, 2018). El uso de insecticidas como la deltametrina o permetrina para la prevención de la CanL está mucho más extendido, con estudios que avalan su eficacia cuando son vehiculados en collares o sistemas de tipo “Spot-on” (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Miro *et al.*, 2007).

El diagnóstico y tratamiento tempranos de los casos de leishmaniosis, tanto humana como canina, junto con la detección de los portadores asintomáticos, repercuten directamente en la potencial transmisión de la enfermedad, adquiriendo una enorme importancia clínica y epidemiológica (Ribeiro *et al.*, 2018).

Lograr una reducción global de la carga parasitaria circulante entre vectores y hospedadores vertebrados es uno de los pilares fundamentales en el control de esta enfermedad. En este contexto, la vacunación es una herramienta de control esencial. La administración de vacunas persigue prevenir o mitigar la infección por *Leishmania* de manera que el hospedador desarrolle una respuesta eficiente cuya memoria inmunológica permita el control de la infección incluso ante infecciones posteriores (Requena *et al.*, 2004).

El desarrollo histórico de vacunas frente a la leishmaniosis permite diferenciar vacunas de primera, segunda y tercera generación (Palatnik-de-Sousa, 2008). Su uso comenzó con la denominada “leishmanización” que consistía en la inoculación de formas parasitarias, obtenidas a partir de lesiones cutáneas, en zonas no expuestas de la dermis de los pacientes. En la actualidad es una técnica que se encuentra en desuso al considerarse poco ética y de riesgo, ya que puede desencadenar cuadros clínicos de leishmaniosis de gravedad variable, especialmente en situaciones de inmunosupresión (Dunning, 2009).



Las vacunas de primera generación se basan en el uso de formulaciones antigénicas fraccionadas o muertas capaces de activar la respuesta inmunitaria del hospedador, sin embargo, presentan un importante inconveniente ya que, en muchas ocasiones, como consecuencia de los procedimientos empleados para inactivar o fraccionar los antígenos se destruyen sus proteínas disminuyendo en gran medida su inmunogenicidad (Thomaz-Soccol *et al.*, 2018).

Las vacunas de segunda generación se basaron inicialmente en la utilización de formas parasitarias atenuadas, en las que se deleccionaban genes esenciales (Souza *et al.*, 1994) o se insertaban genes de sensibilidad a medicamentos (Muyombwe *et al.*, 1998), con el objetivo de permitir a los parásitos desencadenar la respuesta inmunitaria sin dar lugar a la enfermedad. No obstante, al igual que en la leishmanización, estas vacunas pueden desencadenar cuadros clínicos de sintomatología variable en función del estado inmunológico del hospedador (Thomaz-Soccol *et al.*, 2018). Dentro de esta generación, se encuentran, también, las vacunas recombinantes que se basan en la utilización de proteínas de diferentes especies de *Leishmania* vehiculadas en organismos celulares. Estas vacunas son más seguras que las anteriores, pero tienen un elevado coste de producción (Thomaz-Soccol *et al.*, 2018).

La tercera generación de vacunas frente a *Leishmania*, la constituyen las vacunas de DNA que se basan en secuencias del material genético del parásito que se expresan en células eucariotas (Requena *et al.*, 2004). Este tipo de vacunas cuentan con importantes ventajas como su estabilidad o su reducido coste económico, sin embargo, su uso no está del todo extendido al existir preocupación acerca de la posible inserción de este material genético en el del hospedador (Thomaz-Soccol *et al.*, 2018).

A pesar de que no existen vacunas comercializadas para su uso en medicina humana (Thomaz-Soccol *et al.*, 2018), sí existen tres vacunas para el control de la CanL y por tanto de la ZVL: Leish-Tec[®], vacuna recombinante que utiliza la proteína A2 de los amastigotes de distintas especies de *Leishmania*, cuya administración únicamente está aprobada en América del Sur (Grimaldi *et al.*, 2017); CaniLeish[®], que se basa en un purificado de distintas proteínas secretadas y excretadas de *L. infantum* administrado junto a saponina como adyuvante (Moreno *et al.*, 2012); y LetiFend[®], vacuna recombinante cuya formulación es una proteína quimera que contiene cinco determinantes antigénicos de un total de cuatro proteínas de *L. infantum* (H2A, Lip2a, Lip2b, y LiP0) (Fernandez Cotrina *et al.*, 2018). Actualmente solo LetiFend[®] puede formar parte del calendario vacunal habitual de los perros en Europa, ya que la comercialización de CaniLeish[®] se suspendió en el año 2020. Los estudios de eficacia de estas vacunas la estiman en torno al 68 - 72% por lo que aún deben ser mejoradas (Moreno, 2019).

Por último, para el control de la leishmaniosis se hace imprescindible el empleo de medidas de vigilancia epidemiológica que permitan la detección y notificación de nuevos casos de la enfermedad con el consiguiente seguimiento y manejo de los mismos (Boelaert, 2018). Identificar brotes activos permite estudiar los factores y cambios epidemiológicos implicados,



como por ejemplo la aparición de nuevos reservorios, e implementar medidas adaptadas tanto al área geográfica como a la población de riesgo.

2. Interacción *Leishmania*-hospedador

2.1. Respuesta inmunitaria inducida

En la leishmaniosis, infección y enfermedad no siempre están ligadas. Cuando los promastigotes son inoculados por el vector en la dermis de los hospedadores mamíferos se desencadena una interacción patógeno-hospedador que puede derivar hacia el control de la infección o, por el contrario, hacia una progresión de la misma con la aparición de patología asociada. Esta interacción puede alterar el equilibrio homeostático existente entre la respuesta inmunitaria inducida en el hospedador y la capacidad de *Leishmania* para evadirla y modularla, lo que a su vez está condicionado por distintos factores genéticos tanto del parásito como del hospedador, así como la carga infectiva, el punto de inoculación y la saliva del propio vector (Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2017).

En líneas generales, una respuesta inmunitaria eficaz frente a la leishmaniosis depende de la acción coordinada de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, que favorezca el predominio de una respuesta celular parasito-específica basada en la diferenciación mayoritaria de linfocitos T colaboradores (Th) de tipo Th1. Así, se genera un ambiente de citoquinas proinflamatorias producidas por estos linfocitos que actúan controlando la respuesta antiinflamatoria asociada a los linfocitos de tipo Th2 y favoreciendo la producción de compuestos con actividad leishmanicida como el óxido nítrico (NO) o las especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, es necesario que esta respuesta sea regulada y mantenida dentro de unos límites adecuados ya que, un exceso de respuesta proinflamatoria puede contribuir a la patogenia de la enfermedad dando lugar a la destrucción de los tejidos y a la aparición de determinados cuadros clínicos (Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2017).

En la respuesta inmunitaria intervienen diferentes componentes celulares y moléculas, cada uno de los cuales desempeña distintas funciones esenciales.

2.1.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata es la que se desencadena de forma más temprana y de manera inespecífica. Constituye una herramienta defensiva necesaria para iniciar el control de la infección frente a *Leishmania* e incluye una serie de elementos de diferente naturaleza que se describen a continuación:

El sistema del complemento consiste en un conjunto de proteínas solubles, presentes en el plasma sanguíneo, que en contacto con los promastigotes se activan por distintas vías (**Figura 3**). Sintetizan moléculas como el factor del complemento C3b, que favorece la unión del complejo



de ataque a membrana C5-C9 (MAC) a la superficie de los parásitos induciendo su lisis (Gurung and Kanneganti, 2015). La fase de maduración de los promastigotes influye en su vulnerabilidad a la lisis mediada por el complemento, siendo los promastigotes metacíclicos los más resistentes (Puentes *et al.*, 1990). Además, este sistema desencadena la quimiotaxis de células inflamatorias al foco de infección y actúa como una opsonina facilitando la fagocitosis de los patógenos (Jacobs *et al.*, 2005).

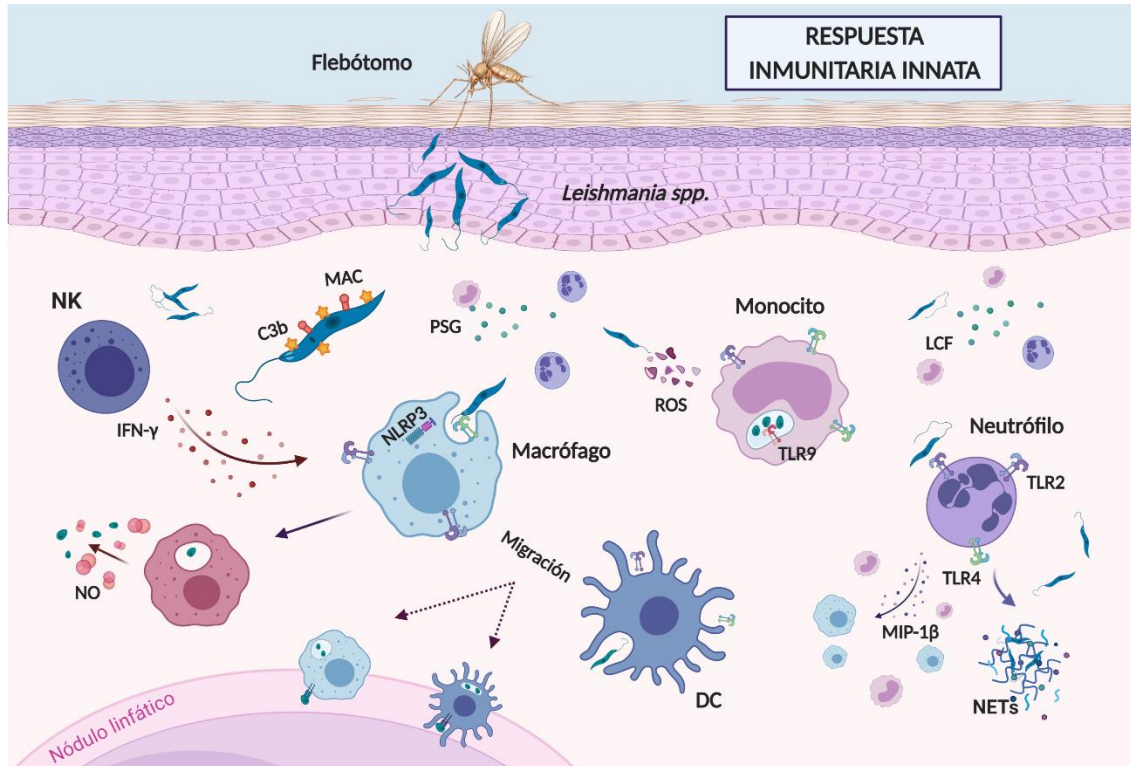


Figura 3. Representación esquemática de la respuesta inmunitaria innata desencadenada tras la infección por *Leishmania spp.* en el hospedador mamífero. Figura creada con BioRender.

Los neutrófilos y monocitos constituyen los primeros elementos celulares en entrar en contacto con los parásitos de *Leishmania*, para lo que cuentan con una serie de receptores de superficie capaces de reconocer antígenos específicos de patógenos e inducir su fagocitosis (Gurung and Kanneganti, 2015; Scott and Novais, 2016). Entre ellos, se encuentran los receptores tipo Toll (TLR) y tipo Nod (NLR) (**Figura 3**). Los TLR, en especial TLR2, TLR4 y TLR9, reconocen secuencias del LPG, las glicoproteínas de membrana y el DNA parasitario, modulando la respuesta inmunitaria del hospedador a través de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α o el IFN- γ . Así mismo, promueven la activación de la respuesta oxidativa celular, favoreciendo la producción de NO y ROS (Ashour, 2015). Por su parte, el receptor NLRP3, perteneciente al grupo de NLR, participa en la activación de los inflamosomas, unas estructuras formadas por complejos de proteínas que contribuyen directamente a la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL)-1 β o la IL-18 (Davis *et al.*, 2011; Dos-Santos *et al.*, 2016). No obstante, la enorme diversidad de respuesta puede determinar que



estos receptores alteren su función dependiendo de la especie parasitaria implicada (Rossi and Fasel, 2018).

Los neutrófilos son atraídos hasta el foco de infección gracias a la acción de quimiocinas. Éstas pueden ser sintetizadas por el parásito, como el PSG y el denominado factor quimiotáctico de *Leishmania* (LCF), o por los propios neutrófilos tras su activación como la IL-8 (Hurrell *et al.*, 2016). Esta estirpe celular posee tres mecanismos de defensa implicados en la eliminación parasitaria: la síntesis de proteínas leishmanicidas como la elastasa (NE), la activación de la respuesta oxidativa tras la fagocitosis y la liberación de “*Neutrophil extracellular traps*” (NETs) (**Figura 3**) (Oualha *et al.*, 2019). Los NETs son una malla estructural compuesta por DNA de doble cadena asociado a proteínas con actividad antimicrobiana (Rossi and Fasel, 2018), pero su eficacia varía en función de la especie de *Leishmania*, siendo inefectivos frente a *L. infantum* (Hurrell *et al.*, 2016). Además de la eliminación directa de los parásitos, los neutrófilos contribuyen al control de la infección atrayendo al foco inflamatorio a otras estirpes celulares, como los macrófagos, mediante la síntesis de la proteína inflamatoria del macrófago 1 β (MIP-1 β) (Laskay *et al.*, 2003). Sin embargo, los neutrófilos también pueden ejercer un papel perjudicial en el progreso de la leishmaniosis. Una vez infectados, pueden actuar como “Caballo de Troya”, entrando en apoptosis y emitiendo señales que facilitan su fagocitosis por los macrófagos, lo que permite la invasión silenciosa de estos últimos por parte de los parásitos (Laskay *et al.*, 2003; Rossi and Fasel, 2018).

Leishmania tiene como diana las células del sistema mononuclear fagocitario, principalmente monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC) (**Figura 3**). Los monocitos inflamatorios, al igual que los neutrófilos, son rápidamente atraídos al foco de infección gracias a la síntesis de quimiocinas y factores del complemento (Ikeogu *et al.*, 2020). Son uno de los elementos clave en el control de la infección inicial, con una vida media más prolongada que la de los neutrófilos y con capacidad de diferenciación en macrófagos o DC, tras su activación (Goncalves *et al.*, 2011). Los monocitos son capaces de desencadenar su respuesta oxidativa, sin necesidad de ser previamente estimulados vía IFN- γ , lo que los convierte en la principal fuente de ROS (Scott and Novais, 2016).

Los macrófagos son las células diana más importantes en el establecimiento y la persistencia de los parásitos (Podinovskaia and Descoteaux, 2015). Una vez infectados actúan como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T, activando la respuesta inmunitaria adaptativa. En función del ambiente de citoquinas en el que se encuentran, se pueden diferenciar en macrófagos de tipo M1 o M2 (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). Si las citoquinas son de tipo proinflamatorio, como el IFN- γ o el TNF- α , se diferencian en macrófagos M1, que se caracterizan por una mayor actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), implicada en el metabolismo de la L-arginina para producir compuestos con actividad leishmanicida como el NO y la citrulina. Por el contrario, si las citoquinas son de tipo antiinflamatorio como la IL-4, la IL-10 o la IL-13 se diferencian en macrófagos M2. En este caso se caracterizan por una mayor actividad de la



enzima arginasa, que utiliza la L-arginina para producir poliaminas, compuestos que favorecen la supervivencia parasitaria (**Figura 4**) (Iniesta *et al.*, 2001; Iniesta *et al.*, 2002; Rath *et al.*, 2014).

Las DC cumplen un papel esencial como células presentadoras de antígeno (APC), siendo un nexo entre la respuesta inmunitaria innata y la adquirida. Pueden encontrarse como células residentes en los tejidos del hospedador o diferenciarse a partir de los monocitos inflamatorios y migrar a los nódulos linfáticos, donde presentan los antígenos a los linfocitos. Son las principales células productoras de IL-12, una citoquina que resulta clave en la diferenciación de los linfocitos Th1 (Soong, 2008; Ikeogu *et al.*, 2020).

Otra estirpe celular implicada en la respuesta inmunitaria innata son las células “*Natural Killer*” (NK). Estas células son reclutadas, al igual que los monocitos y neutrófilos, hacia el foco de infección, y contribuyen a la eliminación directa de los parásitos gracias a su actividad citotóxica (**Figura 3**). Son una fuente de IFN- γ , por lo que participan en la activación de los macrófagos para producir NO, la diferenciación de los linfocitos Th1 y la activación de la respuesta adaptativa (Bogdan, 2012).

2.1.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

A diferencia de la respuesta innata, la de tipo adaptativo se genera de forma específica, por lo que requiere de tiempo para un adecuado reconocimiento del patógeno y su posterior activación. Es la responsable en último término del control o progresión de la leishmaniosis a largo plazo, así como de su cronificación.

El éxito en la respuesta adaptativa frente a *Leishmania* se basa en el predominio de la respuesta celular mediada por linfocitos Th ($CD4^+$) (Ikeogu *et al.*, 2020). Cuando las APC, presentan el antígeno a una población de linfocitos Th0, éstos se diferencian en linfocitos Th1 o Th2. Si las APC secretan IL-12, se produce una mayor diferenciación de linfocitos Th1 productores de citoquinas proinflamatorias y se favorece el control de la infección. Si, por el contrario, no hay una suficiente producción de IL-12, se favorece la diferenciación de linfocitos Th2 productores de citoquinas antiinflamatorias y la progresión de la enfermedad (**Figura 4**). Ambas vías de diferenciación tienen como consecuencia la inhibición de la vía contraria (Alexander and Bryson, 2005).

En los últimos años, se ha descrito un tercer subtipo de linfocitos T $CD4^+$, los linfocitos Th17, cuya diferenciación se favorece en un ambiente de citoquinas como la IL-6, la IL-1 β o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2017). Los linfocitos Th17 son productores de IL-17, una citoquina que actúa atrayendo neutrófilos al foco de infección e incrementado la respuesta oxidativa de los macrófagos (**Figura 4**). Estas células participan en la defensa frente a bacterias extracelulares y hongos, así como en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, y pueden contribuir tanto al control como a la progresión de la leishmaniosis, dependiendo de la especie de *Leishmania* implicada. En el caso de *L. infantum*,



se han relacionado con fenotipos de resistencia frente a la infección (Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2017).

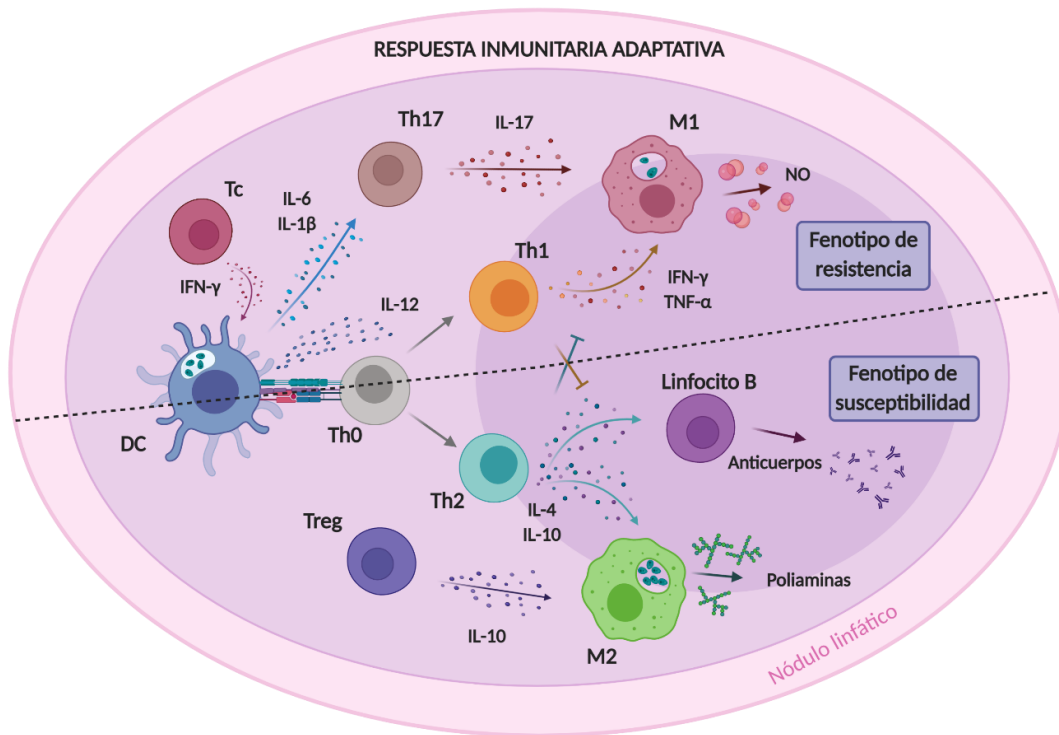


Figura 4. Representación esquemática de la respuesta inmunitaria adaptativa desencadenada tras la infección por *Leishmania spp.* en el hospedador mamífero. Figura creada con BioRender.

Los linfocitos T reguladores (Treg) constituyen otra subpoblación de linfocitos T. Estos, son productores de IL-10 y ejercen un papel regulador de gran interés en algunas formas de leishmaniosis en las que se hace necesario evitar un exceso de la respuesta proinflamatoria (Belkaid *et al.*, 2002). Además, permiten la supervivencia a largo plazo de algunos parásitos, lo que favorece la respuesta de memoria inmunológica frente a posibles reinfecciones (Mandell and Beverley, 2017; Bunn *et al.*, 2018).

No sólo los linfocitos T CD4⁺ resultan determinantes en el control de la infección. Los linfocitos T CD8⁺, también denominados citotóxicos (Tc), actúan produciendo IFN-γ y favoreciendo la diferenciación de los linfocitos Th1. Tienen un efecto importante en el control de la infección temprana gracias a su acción citotóxica que favorece la destrucción de los parásitos. Al igual que la de los linfocitos CD4⁺, su acción está regulada por la síntesis de IL-10 (Campos *et al.*, 2017).

Por último, cuando la respuesta adaptativa conduce a la diferenciación mayoritaria de linfocitos Th2, se favorece la activación de los linfocitos B (**Figura 4**). Éstos, al reconocer los antígenos de *Leishmania*, se diferencian en células plasmáticas responsables de la producción de anticuerpos, que constituyen los principales mediadores de la respuesta humoral (Silva-Barrios *et al.*, 2018). Los anticuerpos resultan ineficientes frente a parásitos intracelulares como *Leishmania* y



pueden formar inmunocomplejos que contribuyen a la progresión de la enfermedad, induciendo la producción de IL-10 por parte de los macrófagos (Miles *et al.*, 2005).

2.2. Factores de virulencia y modulación de la respuesta del hospedador

El control de la leishmaniosis por parte del hospedador se basa en su capacidad para desarrollar una respuesta inmunitaria mixta Th1-Th2 orientada hacia un perfil proinflamatorio que favorezca la eliminación de los parásitos, manteniéndose dentro de unos niveles controlados, y sin desembocar en la destrucción tisular (Boggiatto *et al.*, 2010). Existen diferentes factores que pueden influir directamente en este delicado equilibrio, como la herencia genética o el estado inmunitario del hospedador. No obstante, *Leishmania* cuenta con sus propias estrategias de evasión defensiva para favorecer su supervivencia (Rossi and Fasel, 2018).

Las herramientas o factores de virulencia de las que dispone el protozoo varían en función de la especie y la cepa y pueden clasificarse en: las que afectan a su fisiología y resistencia, las que influyen en su capacidad de invasión celular y las que modulan el efecto de los mecanismos de defensa del hospedador (Bifeld and Clos, 2015).

2.2.1. Factores de virulencia relacionados con la fisiología y resistencia parasitarias

El éxito de *Leishmania* para establecer la infección en el hospedador y su posterior transmisión se basa en su capacidad para adaptar su fisiología y desarrollar mecanismos de defensa que garanticen su supervivencia en los ambientes más hostiles (Podinovskaia and Descoteaux, 2015).

Leishmania desarrolla su ciclo biológico en dos escenarios con temperaturas muy diferentes, lo que ha determinado a lo largo del curso de la evolución una selección de dos formas de vida adaptadas bien al hospedador vertebrado (36°C), bien al vector invertebrado (27°C) (Hassani *et al.*, 2011). Los amastigotes, al ser la forma intracelular presente en los mamíferos, están adaptados a temperaturas más elevadas que los promastigotes y, dentro de éstos, las especies viscerotrópicas, al estar localizadas en los órganos internos, aún mayores que las productoras de CL (Berman and Neva, 1981).

La principal herramienta de control del sistema inmunitario del hospedador es la activación de la respuesta oxidativa y la producción de NO o ROS. Por ello, muchos de los mecanismos defensivos del protozoo se basan en disminuir la producción de estos reactivos por parte de los hospedadores (Kima, 2007). No obstante, *Leishmania* posee herramientas propias, como las enzimas metionina-sulfóxido reductasas (Msr), que actúan disminuyendo los efectos directos de estos compuestos sobre los parásitos e incrementando su resistencia al estrés oxidativo (Sansom *et al.*, 2013).



2.2.2. Factores de virulencia relacionados con la invasión celular

Uno de los puntos críticos en la infección es lograr la invasión de las células diana sin desencadenar la activación de sus mecanismos de defensa. Para ello, *Leishmania* cuenta con distintos factores de virulencia. Uno de los más importante es el LPG, que es el principal componente de la membrana parasitaria, cuya cantidad y composición se modifica durante la metacicloogénesis del parásito (Pimenta *et al.*, 1992; Bifeld and Clos, 2015). En el caso de los promastigotes metacíclicos, la modificación de la composición de las moléculas de LPG de su superficie les confieren resistencia frente a la lisis mediada por el complemento, al evitar la unión del complejo de ataque a membrana C5-C9 (Puentes *et al.*, 1990).

Otro componente de membrana que actúa como un factor de virulencia es la GP63, una metaloproteasa dependiente de zinc presente en la superficie de los promastigotes. Actúa confiriendo protección a los parásitos frente al sistema del complemento al interactuar con el factor C3b para dar lugar a su forma inactiva (iC3b), lo que impide la unión del complejo de ataque C5-C9 y favorece que los promastigotes sean reconocidos a través del receptor CR3, promoviendo su fagocitosis (Gabriel *et al.*, 2019).

2.2.3. Factores de virulencia relacionados con la modulación y evasión de la respuesta inmunitaria

Una vez que los promastigotes se encuentran en el interior del fagosoma de las células diana, cuentan con mecanismos de virulencia que les permiten modular la respuesta inmunitaria del hospedador, diferenciarse en amastigotes y utilizar la maquinaria celular para sobrevivir y multiplicarse (Kima, 2007). Estos factores de virulencia pueden actuar sólo a un nivel o modulando simultáneamente diferentes aspectos.

Para garantizar la presencia en el interior del fagosoma de los nutrientes necesarios para su desarrollo, *Leishmania* interactúa con las moléculas del retículo endoplasmático del hospedador o sintetiza sus propias permeasas y proteasas y recluta poliaminas y aminoácidos (Podinovskaia and Descoteaux, 2015). Así mismo, en el momento de la infección, otros factores como el PSG secretado por los vectores, pueden modular la respuesta inmunitaria y favorecer la polarización de los macrófagos en el tipo M2, induciendo una mayor síntesis de poliaminas (Rogers *et al.*, 2009). Además, otro nutriente esencial en la replicación de los parásitos es el hierro, por ello, *Leishmania* es capaz de sintetizar sus propias moléculas transportadoras de hierro (LIT1 y LIT2), contrarrestando los mecanismos defensivos del hospedador que tratan de impedir su llegada al interior de la PV (Kaye and Scott, 2011).

El principal mecanismo de defensa del hospedador se basa en la activación de distintas rutas de señalización que tienen como resultado final la producción de compuestos con actividad leishmanicida y citoquinas proinflamatorias. Es por esto que muchos de los factores de virulencia de *Leishmania* actúan a este nivel para paliar sus efectos (Podinovskaia and Descoteaux, 2015).



Es el caso del LPG y la GP63, que además de facilitar la invasión celular, interactúan con la ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), disminuyendo la producción de IL-12 (Soares-Silva *et al.*, 2016) e impiden la unión al fagosoma de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa implicada en la síntesis de ROS (Lodge *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2013). Ambos factores de virulencia pueden actuar, también, modulando el reconocimiento de *Leishmania* a través de receptores celulares, como los receptores TLR2 y TLR4 en el caso del LPG (Ibraim *et al.*, 2013) y el receptor NLRP3 en el caso de la GP63 (Gurung and Kanneganti, 2015) e influyen en la activación de las células del sistema inmunitario y la producción de citoquinas como el TNF- α o la IL-1 β (Ibraim *et al.*, 2013; Gurung and Kanneganti, 2015).

Otra forma de modulación de la defensa del hospedador ejercida por los parásitos es la activación de enzimas como la fosfotirosina fosfatasa SHP-1. Esta enzima inhibe la vía de señalización JAK/STAT, que es una vía que se activa en respuesta al IFN- γ y da lugar a la síntesis de NO para controlar la infección (Blanchette *et al.*, 1999). Así mismo, los parásitos son capaces de modular la acción de enzimas como la proteína quinasa C (PKC) o la proteína quinasa R (PKR) para favorecer el establecimiento de un ambiente de citoquinas que garantice su supervivencia (Olivier *et al.*, 1992; Pingel *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2010).

A su vez, estos factores de virulencia pueden expresarse directamente en superficie o, por el contrario, ser englobados en el interior de exosomas, unas estructuras vesiculares que sirven como vehículo permitiendo su liberación de la PV y su acceso al citosol de las células hospedadoras (Silverman *et al.*, 2010).

La naturaleza de la interacción entre *Leishmania* y el hospedador debe ser todavía estudiada en detalle. En los últimos años las herramientas de secuenciación masiva han abierto un nuevo campo de investigación basado en el análisis transcriptómico. Esto ha permitido llevar a cabo distintos estudios para analizar los cambios inducidos por los parásitos, tanto en su propia expresión como en la de las células infectadas, haciendo posible la identificación de nuevos mecanismos implicados en su virulencia (Aoki *et al.*, 2017; Shadab *et al.*, 2019; Kalavi *et al.*, 2021).

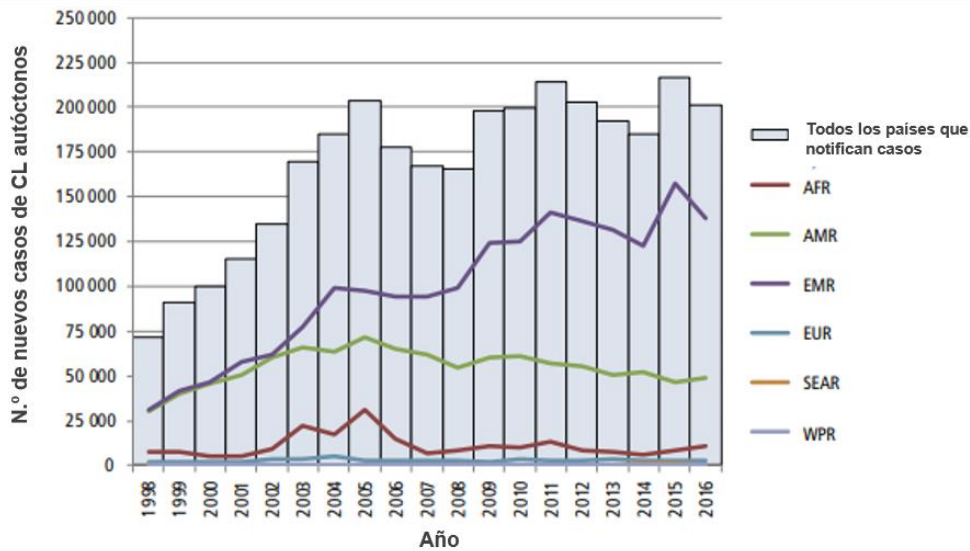
3. Situación epidemiológica y estatus de la leishmaniosis

La leishmaniosis está considerada entre las Enfermedades Tropicales Desatendidas de mayor relevancia y su control es una de las principales preocupaciones de la WHO (WHO). La determinación de su prevalencia resulta muy compleja debido a su gran dispersión y a su incidencia tan heterogénea, que fluctúa mucho en función del año y la región (Bern *et al.*, 2008). A esto hay que añadirle un elevado número de casos sin notificar, bien porque se den en portadores asintomáticos o bien porque escapan a los mecanismos de vigilancia sanitaria establecidos. De hecho, existen estudios diferentes que comparan la incidencia de la



leishmaniosis en una misma región y un mismo periodo de tiempo, cuyos datos pueden no ser siempre coincidentes (Wamai, 2020). La necesidad de disponer de información fiable y actualizada impulsó a la WHO a establecer el Registro Epidemiológico Semanal (WER), que reúne los datos de los sistemas de vigilancia de todas las regiones que notifican la incidencia de distintas enfermedades (WHO) (Figura 5). Esta herramienta ha permitido analizar las tendencias generales e investigar la aparición de nuevos brotes y focos de leishmaniosis (WHO, 2018).

A



B

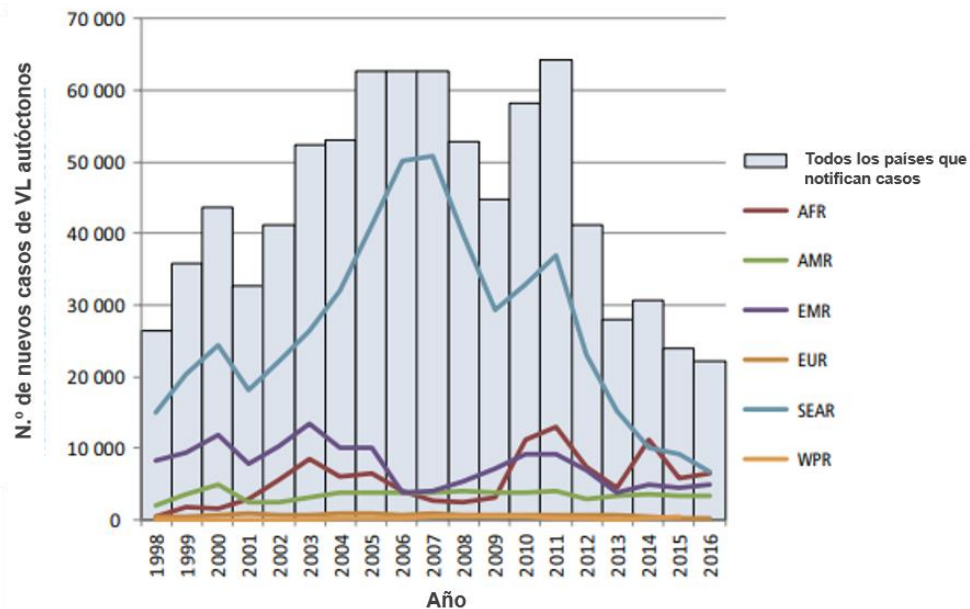


Figura 5. Evolución en el número de casos de CL (A) y VL (B) entre 1998 y 2016. Figura modificada a partir de WHO, *Surveillance of Leishmaniasis in the WHO European Region, 2016 and Global leishmaniasis surveillance update, 1998-2016*. AFR, región de África; AMR, región de América; EMR, región del Mediterráneo Oriental; EUR, región de Europa; SEAR, región del Sudeste Asiático; WPR, región del Pacífico Occidental.



Al ser la ZVL, producida por *L. infantum*, una de las formas de enfermedad más relevantes, la WHO también recomienda la monitorización de la prevalencia de la CanL. De esta forma, se podrían entender mejor sus dinámicas y adaptar las medidas de control (WHO, 2018).

África y Oriente Medio

El continente africano y la región de Oriente Medio son unos de los más damnificados por la leishmaniosis. Las condiciones de malnutrición, hacinamiento y escaso acceso a los recursos sanitarios hacen que estas zonas sean muy susceptibles a la infección (Gradoni, 2018). Así mismo, la explosión de conflictos armados en estos mismos territorios tiene como consecuencia la destrucción de las viviendas, con la consiguiente sobrexposición de la población a los vectores y su desplazamiento masivo hacia otras áreas, favoreciendo la dispersión de grandes epidemias (Reithinger *et al.*, 2007). Más del 90% de los casos de VL reportados proceden de únicamente siete países (Brasil, India, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía, Kenia y Somalia), cinco de los cuales se encuentran en el continente africano (Boelaert, 2018). Sin embargo, en muchas de estas regiones, especialmente África occidental, los casos de leishmaniosis se reportan solo de forma esporádica (Kone *et al.*, 2019; Cisse *et al.*, 2020), lo que lleva a pensar que la incidencia de la enfermedad es mucho mayor de la que se encuentra registrada (Tabbabi, 2019).

En ambas regiones se establecen ciclos de transmisión de VL y CL antroponóticos y zoonóticos, con una amplia incidencia de ZVL, en más de la mitad de los países del norte de África y Oriente Medio (Tabbabi, 2019). Además, en estas regiones se concentra una gran parte de los casos de CL (WHO). Se está haciendo un gran esfuerzo por llevar a cabo estudios epidemiológicos que permitan analizar y describir los brotes de leishmaniosis acontecidos en estas regiones con el objetivo de mejorar las actuales estrategias de vigilancia y control (Kweku *et al.*, 2011; Sunyoto *et al.*, 2017; El Hamouchi *et al.*, 2019; Kanyina, 2020).

Asia y el Pacífico occidental

El sur del continente asiático, y más concretamente el subcontinente Indio, es el que presenta una mayor incidencia de VL a nivel mundial, englobando el 67% del total de casos (Abdullah *et al.*, 2017). En esta región, la principal especie responsable de la VL es *L. donovani*, que desarrolla un ciclo antroponótico en el que la transmisión se lleva a cabo entre seres humanos (Sundar *et al.*, 2018). En 2005, los gobiernos de India, Nepal y Bangladés pusieron en marcha un plan de contingencia conjunto, que tenía como principal objetivo lograr la eliminación de esta enfermedad en una década (Zijlstra *et al.*, 2017). Implementando medidas basadas en la detección y diagnóstico temprano de los casos, la administración de tratamientos adecuados en los pacientes y el control de vectores, se logró una reducción del 59% de los casos de VL (Bhattacharya and Dash, 2017). Sin embargo, su incidencia sigue siendo elevada y su presentación todavía se considera endémica (WHO, 2018). En esta nueva fase, las medidas están encaminadas a consolidar los resultados obtenidos e introducir nuevas estrategias como la monitorización y control de casos de PKLD y de coinfección con el virus HIV, que son esenciales



para controlar el papel de reservorio que pueden desarrollar los individuos infectados (Zijlstra *et al.*, 2017; Boelaert, 2018). Además, resulta especialmente interesante la investigación en posibles reservorios animales y nuevos brotes (Bhattarai *et al.*, 2010; Sundar *et al.*, 2018). Como ejemplo, la creciente incidencia de casos producidos por esta misma especie de *Leishmania* en Sri Lanka, un país que se encuentra muy próximo al subcontinente indio, ha hecho saltar las alertas epidemiológicas al poner en grave peligro los éxitos conseguidos hasta la fecha (Karunaweera *et al.*, 2020).

En la región más central de Asia, más concretamente los países que conformaban la antigua Unión Soviética, también se ha incrementado la incidencia de la VL tanto antroponótica como zoonótica a lo largo de los años como resultado del colapso de sus sistemas sanitarios y el detrimento de sus sistemas de vigilancia desde su declarada independencia (Sergiev *et al.*, 2018). Al igual que en el subcontinente indio, en China también se han realizado grandes esfuerzos a lo largo de la historia para controlar los casos de VL (Boelaert, 2018). Sin embargo, en la actualidad, esta forma de presentación sigue siendo endémica en determinadas regiones del país (Qian *et al.*, 2019)

En cuanto a la región del Pacífico Occidental, a lo largo de los años se han reportado casos de VL y CL de forma ocasional en diferentes regiones, como Tailandia. Producidos por distintas especies de *Leishmania*, entre ellas *L. infantum*, parecían estar asociados con el movimiento de viajeros desde zonas endémicas. Sin embargo, su prevalencia está aumentando, extendiéndose hacia nuevas zonas e implicando especies de *Leishmania* autóctonas (Leelayoova *et al.*, 2017).

América

La leishmaniosis está ampliamente extendida en el continente americano con una gran variedad de especies parasitarias, vectores y reservorios implicados (Boelaert, 2018). Como ejemplo, únicamente en Brasil se han aislado hasta ocho especies diferentes de *Leishmania* causantes de enfermedad en seres humanos, algunas de las cuales comparten nicho ecológico (Anversa *et al.*, 2018).

La VL, fundamentalmente producida por *L. infantum*, se distribuye desde el sur de Estados Unidos de América (EE. UU.), afectando la mayoría de los países Latinoamericanos, hasta el norte de Argentina, Uruguay y Paraguay. Es de especial relevancia en Brasil, donde se recogen el 90% de los casos de VL de todo el continente, que, además, presentan una preocupante mortalidad, alcanzando el 8% de los mismos un desenlace fatal (Boite *et al.*, 2019; Servadio *et al.*, 2020). Aunque los casos reportados de VL no han experimentado un incremento de su incidencia en los últimos años (Boelaert, 2018), se está produciendo un cambio en su epidemiología que, anteriormente ligada a las zonas más rurales, ahora se encuentra más relacionada con los nichos urbanos con el consiguiente aumento en el riesgo de exposición de la población (Boite *et al.*, 2019). El principal reservorio de VL en esta región, al igual que en la Cuenca Mediterránea, es el perro, por lo que muchas de las medidas implementadas para su control han ido enfocadas al



control de la CanL. En este contexto, en las últimas décadas países como Brasil han practicado el sacrificio masivo de animales seropositivos con el fin de reducir la incidencia de la enfermedad (Dantas-Torres *et al.*, 2019). Además del gran problema ético y moral que plantea esta medida, los resultados de diferentes estudios han demostrado su ineficacia (Costa, 2011). La falta de sensibilidad y especificidad en los sistemas de diagnóstico empleados en los animales, la existencia de reservorios alternativos y la posible infección cruzada con otras especies, que no tienen en el perro su principal reservorio, han llevado a los expertos a recomendar otras medidas más encaminadas a la prevención de la infección y el tratamiento de los animales infectados (Dantas-Torres *et al.*, 2019).

Las formas cutáneas de leishmaniosis en esta región se agrupan en la denominada leishmaniosis cutánea americana (ACL), producida por diferentes especies de *Leishmania* (Pinart *et al.*, 2020). Su incidencia también se ha visto incrementada en los últimos años en determinadas zonas, extendiéndose incluso con brotes atípicos en países como EE. UU. y Argentina (Clarke *et al.*, 2013; Acosta-Soto *et al.*, 2020).

Europa

La leishmaniosis, tanto humana como canina, sigue siendo una enfermedad relativamente desconocida en Europa, si bien su incidencia ha crecido mucho en los últimos años en la Cuenca Mediterránea (Giancetti and Montomoli, 2020). Existen varias especies de *Leishmania* circulantes, pero la de mayor relevancia es *L. infantum*, cuya transmisión autóctona se ha descrito en numerosos países de la Cuenca Mediterránea siendo los más afectados Francia, Italia, Grecia y España (Torpiano and Pace, 2015). El principal reservorio es, al igual que en América Latina, el perro. La prevalencia de la CanL, en esta misma región, se estima en 2,5 millones de cánidos afectados y se está extendiendo hacia nuevos territorios (Dumitrache *et al.*, 2016). Entre los factores que contribuyen a la dispersión de esta enfermedad se encuentra el cambio climático, que ha llevado a un aumento global de la temperatura favoreciendo la dispersión de los vectores hasta hacerlos presentes en países del centro de Europa, como Alemania, lo que podría suponer la puerta de entrada para la infección en los mismos (Baylis, 2017). En los países del este europeo los casos de *L. infantum* eran tradicionalmente esporádicos e importados, pero con el crecimiento económico y el turismo de la región, y gracias a su proximidad a los países mediterráneos, en la actualidad se describe su transmisión autóctona en Bulgaria, Hungría y Rumanía (Mihalca *et al.*, 2019). El aumento de personas inmunodeprimidas, bien por la coinfección con otros patógenos como el virus del HIV o por estar sometidos a terapias de inmunomodulación frente a otras patologías, también ha favorecido el incremento de la incidencia de la leishmaniosis (Torpiano and Pace, 2015). Todos estos factores han desencadenado en los últimos diez años importantes brotes de leishmaniosis humana, fundamentalmente en España e Italia (Noguerol Alvarez *et al.*, 2012; Varani *et al.*, 2013; Franceschini *et al.*, 2016; Roth-Damas *et al.*, 2017).



Existen otras especies circulando en Europa como *L. trópica*, que adquiere importancia en Grecia, (Boelaert, 2018) o *L. donovani*, que se ha introducido recientemente en Chipre (Antoniou *et al.*, 2013). En la actualidad, el reciente conflicto en Siria ha dado lugar a un dramático incremento de la población que ha visto mermado su acceso a una vivienda y a un adecuado sistema sanitario, lo que ha llevado a un grave aumento en la incidencia de la CL, producida por *L. major*, en los campamentos de refugiados de países como el Líbano y debido a la migración masiva también en otros países europeos como Turquía (Al-Salem *et al.*, 2016).

4. Brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid

La ZVL en España se presenta de forma endémica, afectando fundamentalmente a los cánidos y en mucha menor medida a los humanos (WHO). Se encuentra incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (EDO) desde 1982; y en 1996 las competencias de vigilancia se transfirieron a las comunidades autónomas (Gil-Prieto *et al.*, 2011). Tradicionalmente, el número de casos en la población humana era relativamente bajo, siendo las áreas más afectadas, aquellas situadas en la Comunidad de Madrid, las Islas Baleares y la costa mediterránea (Gil-Prieto *et al.*, 2011). En los años 90, se observó un incremento significativo de su incidencia, que se asoció a la coinfección con el virus del HIV. La introducción de la terapia con antirretrovirales en 1997 contribuyó a su control, sin embargo, hay que tener en cuenta que la coinfección de ambos patógenos puede darse incluso en pacientes tratados, disminuyendo el éxito de la terapia (Monge-Maillo *et al.*, 2014). Además, cabe destacar que hasta 2009, los principales registros de los casos de leishmaniosis se basaban fundamentalmente en los pacientes hospitalizados por lo que las formas cutáneas y más leves de la enfermedad podían ser subestimadas (Gil-Prieto *et al.*, 2011).

Entre los años 2000 y 2009 en la Comunidad de Madrid se reportaban entre 12 y 25 casos de leishmaniosis humana al año, lo que se traducía en una incidencia media de 0,5 casos por cada 100.000 habitantes (Arce *et al.*, 2013). En 2010 se detectó un brusco aumento de esta incidencia, superándose en hasta 5 veces los datos previos, lo que alertó a los sistemas sanitarios. Se determinó la existencia de un brote activo de leishmaniosis humana cuya fecha de inicio se estableció en junio de 2009 y cuyos casos tenían un asentamiento geográfico común en el suroeste de la comunidad. Entre los años 2009 y 2012, en las localidades de Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Humanes (**Figura 6**) se reportaron 446 casos, lo que supuso una incidencia media de 22,2 casos por cada 100.000 habitantes (Arce *et al.*, 2013), y siguieron aumentando en los años siguientes hasta alcanzar los 733 casos en enero de 2018 (Gonzalez *et al.*, 2018).

Este brote de leishmaniosis humana supuso un aumento muy significativo de la prevalencia de la enfermedad en España y en todo el continente europeo, convirtiéndose en el mayor brote acontecido hasta la fecha en Europa (Arce *et al.*, 2013). Pero, además, despertó el interés de la comunidad científica al presentar importantes particularidades.



A diferencia de lo que había ocurrido hasta ese momento, únicamente un 15% de los casos se dieron en personas con sistemas inmunitarios comprometidos o enfermedades concomitantes, siendo el 85% restante personas sanas e inmunocompetentes. La edad media de presentación se estableció en los 44 años (Arce *et al.*, 2013). A nivel clínico, el 64,1% de los pacientes desarrollaron cuadros de CL, caracterizados por lesiones papulares o nodulares que en muchas ocasiones se presentaron de forma múltiple. El 35,9% de los pacientes desarrollaron cuadros de VL que cursaron principalmente con fiebre, esplenomegalia y pancitopenia (Noguerol Alvarez *et al.*, 2012; Arce *et al.*, 2013). Además, el 19% de los casos de VL estudiados (todos ellos inmunocompetentes) presentaron una forma atípica de linfadenopatía leishmanial localizada (LLL), que hasta ese momento sólo se había descrito de forma esporádica en la cuenca mediterránea (Horrillo *et al.*, 2015).

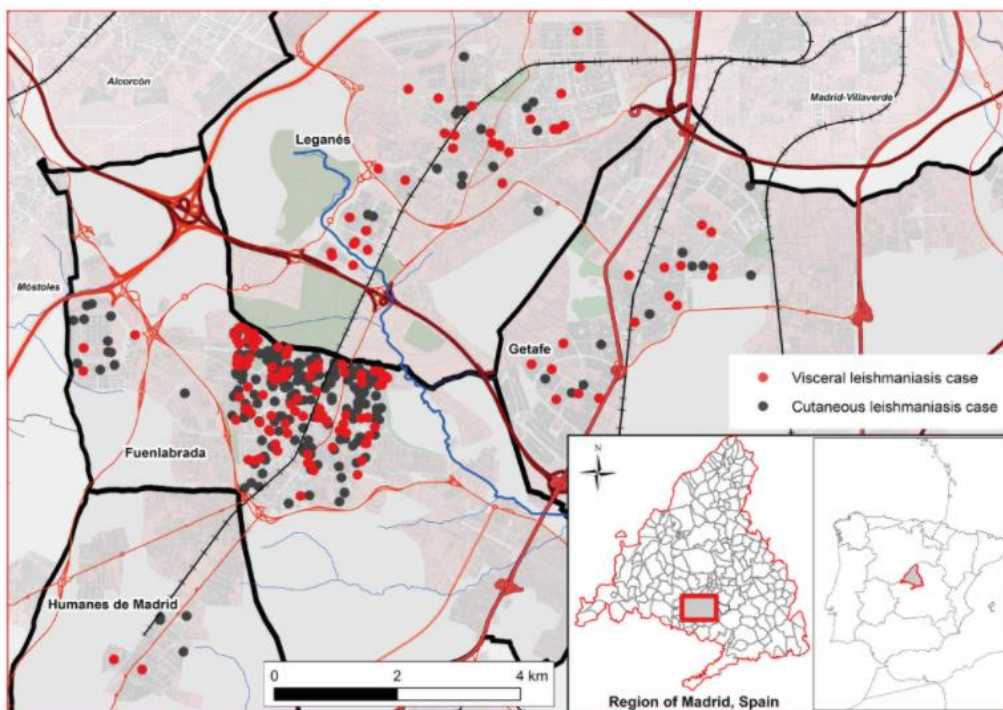


Figura 6. Distribución espacial del número de casos de CL y VL en función del lugar de residencia, brote de leishmaniosis Comunidad de Madrid (2009-2012). Arce, A., *et al.*, *Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012*. Euro Surveill, 2013.

En todos los casos, la especie de *Leishmania* implicada fue *L. infantum* (Horrillo *et al.*, 2019), por lo que se decidió llevar a cabo estudios de tipificación molecular que permitieran esclarecer si existían diferencias genéticas que explicaran su elevada afectación de individuos inmunocompetentes (Chicharro *et al.*, 2013). Se analizaron 73 aislados parasitarios obtenidos entre 2008 y 2012 en diferentes zonas de Madrid, incluidas las áreas afectadas por el brote, que se tipificaron según las regiones genómicas de los espaciadores intergénicos ribosomales ITS1 e ITS2. Veintiún aislados se clasificaron como ITS tipo A, mientras que los 52 aislados restantes no coincidían con ningún tipo de ITS descrito previamente. Por el contrario, se asemejaban a la secuencia incluida en la cepa de *L. infantum* MHOM/ES/87/Lombardi, por lo que esta nueva



clasificación se denominó ITS-Lombardi. Todos los aislados que procedían de las regiones del brote tenían en común estar clasificados dentro de la denominación ITS-Lombardi, que posteriormente también se halló en los aislados obtenidos en los vectores y reservorios de la zona (Chicharro *et al.*, 2013).

Paralelamente, se tipificaron 83 aislados de *L. infantum* obtenidos en Madrid entre los años 1988 y 2005 que se habían clasificado previamente, por medio de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), como zimodema MON-1 o MON-24. De los aislados clasificados como zimodema MON-1, el 80% se incluyeron en la clasificación de ITS tipo A, mientras que el 20% restante, al igual que el 100% de los aislados zimodema MON-24, correspondían con el ITS-Lombardi. En cuanto a su presentación en los pacientes, tanto el ITS-A como el ITS-Lombardi se identificaron en casos de VL y CL y demostraron estar ampliamente distribuidos por toda la Comunidad de Madrid. En definitiva, no podía afirmarse que el brote fuera producido por un nuevo genotipo emergente de *L. infantum* (Chicharro *et al.*, 2013).

La colaboración de las autoridades sanitarias y los profesionales de distintos ámbitos relacionados con la salud pública permitió el desarrollo de diferentes estudios epidemiológicos que tenían como objetivo investigar las posibles causas del brote. Se relacionó la agregación de casos en estas localidades con la creación de zonas verdes urbanas y parques, que compartían, y en las que confluían los factores necesarios para la transmisión de la enfermedad. Estos espacios verdes fueron creados de forma artificial utilizando terrenos que anteriormente eran de uso agrícola para proporcionar áreas de recreo a la población colindante, lo que favorecía la presencia en ellas de un elevado número de vectores y potenciales reservorios y hospedadores (Gonzalez *et al.*, 2017).

Los cánidos son el reservorio más importante de *L. infantum*, resultando infectivos para los vectores tanto los animales infectados clínicamente sanos como los enfermos (Molina *et al.*, 1994). Un estudio de serodiagnóstico realizado en la Comunidad de Madrid entre los años 2006 y 2007 reveló una seroprevalencia de la enfermedad en los perros de entre el 0 y el 16%, estableciéndose la media en el 8,1% (Galvez *et al.*, 2010). Ante la excepcional incidencia de la enfermedad en humanos, se llevó a cabo otro estudio para analizar la variación de la seroprevalencia en los cánidos entre los años 2009 y 2016. Se analizaron muestras obtenidas de animales en toda la Comunidad de Madrid, incluidas las áreas sanitarias afectadas por el brote de leishmaniosis humana. Se evaluaron, tanto animales con propietario, en los que se implementaban medidas de control y prevención de la leishmaniosis, como animales de alto riesgo al tener una mayor exposición a los vectores. La seroprevalencia de los perros de alto riesgo, en las áreas del brote se estableció en el 4,7%, fuera de estas áreas en el 5,4% y en los animales que utilizaban medidas preventivas entre el 1,4 y el 3,6% (Miro *et al.*, 2017). Estos resultados ponían de manifiesto la ausencia de un incremento de la prevalencia de la enfermedad en los cánidos asociada al brote de leishmaniosis humana, lo que abría la posibilidad de que existiera un ciclo de transmisión independiente de los perros.



Las especies de vectores relacionadas con la transmisión de *L. infantum* en Madrid son *P. perniciosus* y *P. ariasi*, siendo el primero el que ha actuado como vía de infección para los hospedadores en el brote (Jimenez *et al.*, 2013). En relación con el alto número de casos en la población humana, y mediante un sistema de vigilancia entomológica, se observó una elevada densidad de flebotomos en las áreas afectadas, alcanzándose los 143,8 insectos por m² (Arce *et al.*, 2013). Esto, unido a la gran densidad de lagomorfos (conejos y liebres) en las áreas verdes recreativas de los núcleos urbanos afectados por el brote, hizo necesario investigar un posible ciclo silvestre con estas especies como nuevos reservorios.

Mediante estudios entomológicos se evaluaron las preferencias alimenticias de los vectores y se observó que un 60% de la sangre ingerida por los flebotomos procedía de liebres (Jimenez *et al.*, 2013). Además, utilizando estudios de xenodiagnóstico basados en la exposición de liebres naturalmente infectadas a los vectores, se demostró su capacidad para transmitir el patógeno (Molina *et al.*, 2012). A pesar de que existían estudios que describían un riesgo bajo de infección por *L. infantum* para los conejos en el sur de España (Chitimia *et al.*, 2011), también se evaluó el papel de estos mamíferos en la transmisión del brote. Se demostró la presencia de anticuerpos específicos y DNA de *L. infantum* en los conejos de la zona sin que se observara ningún signo clínico en los mismos (Garcia *et al.*, 2014) y mediante estudios de xenodiagnóstico se demostró, también, su papel como reservorios alternativos (Jimenez *et al.*, 2014). Por último, se detectó un cambio en las tendencias alimentarias de los vectores con el tiempo, que parecían preferir la sangre de conejo, probablemente debido a la menor disponibilidad de liebres una vez implementadas las medidas de control (Gonzalez *et al.*, 2017). Esta era la primera vez que los lagomorfos se describían como reservorios de *Leishmania* en la Cuenca Mediterránea y su elevada disponibilidad favorecía la alimentación de los vectores y la presencia de altas cargas parasitarias en los mismos, lo que resultó clave en el desencadenamiento y evolución del brote (Gonzalez *et al.*, 2017).

En el año 2012 se implementaron medidas de control ambiental, enfocadas a la eliminación de la población de vectores y lagomorfos como el uso de trampas e insecticidas o la destrucción de madrigueras. Esto, se tradujo en un descenso gradual del número de casos en la población humana entre los años 2013 y 2015 (Seva *et al.*, 2017).

Aunque, en la actualidad el brote de leishmaniosis humana acontecido en la Comunidad de Madrid parece estar controlado, ha supuesto un antes y un después en la percepción de la leishmaniosis en Europa. Su importancia y sus características diferenciales ponen de manifiesto la necesidad de continuar investigando los mecanismos de interacción de este patógeno con hospedadores y reservorios con el fin de hallar nuevas herramientas que permitan predecir la aparición de nuevos casos y controlar su dispersión. De esta necesidad surge la línea de investigación de la presente tesis doctoral.



3

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. Antecedentes e hipótesis de la tesis doctoral

Los estudios epidemiológicos, entomológicos y de tipificación molecular realizados con aislados de *L. infantum* responsables del brote de leishmaniosis acontecido en la Comunidad de Madrid, han sido esenciales para el manejo de la situación. Sin embargo, aún quedan por encontrar respuestas a algunas de las incertidumbres más importantes de dicho brote. La adaptación a nuevos reservorios, el elevado porcentaje de individuos inmunocompetentes afectados, el predominio del ITS-Lombardi y la aparición de nuevas formas de VL atípicas como la LLL, son características diferenciales a las que todavía hay que dar una explicación. En este contexto, en el grupo de investigación INMIVET, nos planteamos la posibilidad de que se hubiese producido un cambio en los mecanismos de virulencia desarrollados por los aislados parasitarios responsables en comparación con los que se encontraban circulando con anterioridad, lo que podría ayudar a explicar parte de lo acontecido.

En 2014, en colaboración con los investigadores Maribel Jiménez y Ricardo Molina, pertenecientes al Laboratorio de Entomología Médica del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), tuvimos acceso a dos aislados de *L. infantum* procedentes de flebotomos capturados en las áreas sanitarias del brote: IPER/ES/2012/BOS1FL1 (BOS1FL1) y IPER/ES/2012/POL2FL7 (POL2FL7). En un estudio *ex vivo* sobre células derivadas de médula ósea murina (macrófagos y células dendríticas), analizamos diferentes parámetros relacionados con la virulencia de estos aislados, comparando los resultados con los obtenidos tras la infección con la cepa MCAN/ES/96/BCN150 (BCN150), una cepa ampliamente distribuida en España. Tanto BOS1FL1 como POL2FL7 dieron lugar a tasas de infección más elevadas en ambos tipos celulares que BCN150. Esto se correspondía con la inducción por parte de estos aislados de un desequilibrio en la respuesta defensiva de las células, caracterizado por una menor síntesis de NO y una mayor actividad de la enzima arginasa. Además, al estudiar la producción de citoquinas, se observó una modulación de la respuesta inmunitaria celular por parte de los aislados procedentes del brote hacia un perfil fundamentalmente de tipo antiinflamatorio (Dominguez-Bernal *et al.*, 2014). Estos datos indicaban una mayor virulencia para los aislados obtenidos en el brote y supusieron uno de los puntos de partida en el estudio de su comportamiento.

Posteriormente, en el año 2015, en un estudio realizado por Martín-Martín & col. (Martín-Martín *et al.*, 2015), se recreó una infección natural mediante la exposición experimental de hámster a flebotomos infectivos. En esta ocasión, se compararon los aislados BOS1FL1 y IPER/ES/2012/POL2FL6 (POL2FL6) con la cepa MCAN/ES/98/LLM-877 (JPCM5) y se llevaron a cabo análisis de xenodiagnóstico y de afectación clínico-patológica de los animales. La alta virulencia de los aislados procedentes del brote se manifestó no sólo a nivel clínico, sino también en la alta carga parasitaria en los órganos diana de los animales infectados y su elevada



infectividad para los vectores (Martin-Martin *et al.*, 2015). Estos resultados iban en concordancia con lo que se había observado en el ensayo *ex vivo* realizado en 2014 en las células murinas, dejando la puerta abierta al estudio de los mecanismos de interacción parásito-hospedador implicados.

Una de las características diferenciales más importantes del brote de leishmaniosis de la Comunidad de Madrid fue el establecimiento de un ciclo de transmisión, fundamentalmente silvestre, independiente de los cánidos. Los estudios serológicos realizados demostraron que, a pesar de que las preferencias alimentarias de los vectores estaban claramente dirigidas hacia otras especies como liebres y conejos (Jimenez *et al.*, 2013; Gonzalez *et al.*, 2017), los cánidos de las áreas afectadas también estuvieron expuestos a los flebotomos. Prueba de ello son los mayores niveles de anticuerpos frente a la saliva de los vectores encontrados en su sangre con respecto a los de los animales no expuestos, especialmente en aquellos animales en los que no se aplicaban medidas preventivas (Martin-Martin *et al.*, 2014). Sin embargo, los estudios epidemiológicos de seroprevalencia en esta especie no revelaron un aumento significativo de la incidencia de la CanL en asociación con el brote de leishmaniosis detectado en los humanos, ni siquiera en los animales de mayor riesgo (Miro *et al.*, 2017). Más allá del uso de medidas preventivas por parte de los propietarios, en aquellos animales en los que se aplicasen, no existía ninguna razón para entender la discrepancia observada entre la especie humana y la población canina. Por ello en el grupo de investigación INMIVET formulamos la siguiente hipótesis: la infección por *L. infantum* de liebres y conejos, especies hospedadoras atípicas, se ha traducido en una mayor virulencia parasitaria, lo que ha favorecido que incluso seres humanos inmunocompetentes estén padeciendo la enfermedad en el actual brote de Madrid. Este incremento de la virulencia, sin embargo, no se ha reflejado en un aumento de la prevalencia de la enfermedad en el perro, lo que podría estar relacionado con un cambio en el tropismo y la adaptación a nuevos hospedadores de los aislados implicados en el brote.

2. Objetivos de la tesis doctoral

2.1. Objetivo general

En este contexto, se plantea como **objetivo general**: la caracterización funcional de la virulencia y tropismo diferencial de dos aislados de *L. infantum* procedentes del brote de leishmaniosis acontecido en la Comunidad de Madrid al compararlos con la cepa BCN150, inicialmente en un modelo experimental murino *in vivo* de VL y posteriormente en un modelo de infección *ex vivo* en células de origen canino.



2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Caracterizar el perfil de virulencia *in vivo* de los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7, en comparación con la cepa BCN150, en un modelo experimental murino de VL.

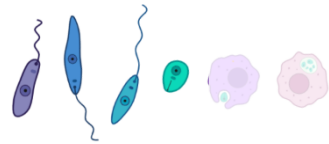
Objetivo 2: Analizar el perfil de virulencia *ex vivo* y el tropismo diferencial del aislado de *L. infantum* BOS1FL1, en comparación con la cepa BCN150, tras la infección de células primarias de origen canino.

Objetivo 3: Estudiar el perfil transcriptómico desarrollado en la interacción parásito-célula hospedadora, empleando el aislado de *L. infantum* BOS1FL1 en comparación con la cepa BCN150, y la línea celular DH82 de macrófagos caninos.



4

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislados y cepas de *L. infantum*

1.1. Obtención y cultivo de cepas y aislados de *L. infantum*

Los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7 se obtuvieron a partir de necropsias realizadas en flebotomos de la especie *P. perniciosus*, capturados durante un estudio entomológico llevado a cabo en 2012 en las áreas afectadas por el brote de leishmaniosis humana de la Comunidad de Madrid. La cepa de *L. infantum* BCN150 se aisló por primera vez en 1996, a partir de un caso de leishmaniosis canina (Fernandez-Cotrina *et al.*, 2013).

Para minimizar el efecto sobre la virulencia de *Leishmania*, derivado del mantenimiento prolongado de los parásitos en condiciones *in vitro*, todos los aislados o cepas fueron inoculados previamente en ratones (Moreira *et al.*, 2012). Se infectaron dos hembras BALB/c (Janvier-Labs, Francia) por cada cepa o aislado, por vía intravenosa (IV) en la vena lateral de la cola con 1×10^6 promastigotes por animal. Los ratones se mantuvieron en el centro de ayuda a la investigación (CAI) animalario de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Cinco semanas después de la infección fueron eutanasiados con CO₂. Se extrajeron los bazos, se homogenizaron y se incubaron a 26°C en medio Schneider (Dutscher, Francia) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 20% (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y una mezcla antibiótica de penicilina (200 U/ml) y estreptomycin (200 µg/ml) (Lonza, Suiza). Transcurridos aproximadamente siete días, se observaron los promastigotes libres por microscopía óptica. Estos parásitos se emplearon en los posteriores ensayos de infección mediante la realización de subcultivos. Para ello, en el momento en el que se alcanzó la fase estacionaria se transfirieron 2×10^6 promastigotes a un nuevo frasco de cultivo con 4 ml de medio fresco para permitir su desarrollo, esto constituiría el subcultivo “uno”. En todos los ensayos se compararon parásitos que procedían del mismo número de subcultivo, sin superar en ningún caso los diez primeros subcultivos.

1.2. Obtención de Antígeno Soluble de *Leishmania*

El antígeno soluble de *Leishmania* (SLA) se obtuvo a partir de cultivos en fase estacionaria de cada aislado o cepa de *L. infantum* siguiendo un protocolo previamente descrito (Scott *et al.*, 1987). Los promastigotes se sometieron a un proceso de lisis celular mediante choque térmico y sonicación. Una vez lisados, se calculó la concentración del antígeno obtenida por el método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales (Bradford, 1976).

1.3. Cinética de crecimiento *in vitro* y metaciclologénesis de *L. infantum*

Las curvas de crecimiento de *L. infantum* se realizaron a partir de cultivos de promastigotes axénicos en una densidad parasitaria inicial de 5×10^5 parásitos/ml, que se incubaron en medio



Schneider completo a 26°C durante 20 días. El recuento diario de los promastigotes viables se llevó a cabo utilizando una cámara Neubauer mejorada (*Brand, Alemania*) hasta que la densidad parasitaria estimada resultó ser inferior a la inicial. La metacicloogénesis se evaluó mediante la observación microscópica de la morfología de los promastigotes tras su fijación con metanol, determinando la relación entre la longitud del cuerpo celular y el flagelo. Siguiendo criterios previamente descritos, se consideraron metacíclicos aquellos promastigotes con una relación superior a dos (*Zakai et al., 1998*).

1.4. Determinación de la viabilidad parasitaria en condiciones de estrés oxidativo

Los promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria se incubaron en una densidad de 1×10^7 promastigotes/ml en una placa de 96 pocillos de fondo plano, utilizando medio Schneider completo suplementado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (*Panreac, España*) en concentraciones crecientes (0-10 mM). Después de 2h a 26°C, se añadió una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (*Thermo Fisher Scientific*) a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó 1h a 37°C. Posteriormente, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) (*Merck, Alemania*) para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm. Los controles de citotoxicidad se hicieron con Triton™ X-100 2% (*Merck*) (*Mosmann, 1983*).

2. Modelo experimental murino de VL

2.1. Ensayo de infección *in vivo* con *L. infantum*

Los ensayos de infección *in vivo* se realizaron utilizando 24 ratones hembra BALB/c de seis semanas de edad (*Janvier-Labs*) que se mantuvieron en el CAI animalario de la UCM. Se constituyeron los grupos experimentales: PBS ($n = 6$), BCN150 ($n = 6$), BOS1FL1 ($n = 6$) y POL2FL7 ($n = 6$). Los animales se inocularon por vía IV en la vena lateral de la cola con 100 μ l de tampón fosfato salino (DPBS) (*MERK*) que contenían 1×10^6 promastigotes en fase estacionaria del aislado o cepa parasitaria correspondiente (BCN150, BOS1FL1 y POL2FL7). Como control negativo se empleó un grupo de seis ratones a los que se administró por la misma vía, únicamente, 100 μ l de DPBS. A las cinco semanas postinfección (PI) los animales fueron eutanasiados y se recogieron muestras de sangre, hígado y bazo.

2.2. Cuantificación de la carga parasitaria

La carga parasitaria presente en los órganos diana de los animales infectados se cuantificó mediante un ensayo de dilución límite (LDA) (*Buffet et al., 1995*). Tras la obtención del hígado y bazo de los ratones, ambos órganos se homogenizaron en 4 ml de DPBS. Posteriormente, se cultivaron 200 μ l de cada homogenizado en medio Schneider completo, en placas de 96 pocillos de fondo plano, haciendo diluciones seriadas por cuadruplicado. Las placas se incubaron a 26°C durante diez días, hasta la detección de promastigotes móviles por microscopía óptica. La



determinación del número de parásitos por órgano se realizó teniendo en cuenta el promedio de la última dilución en la que se observó al menos un promastigote vivo y el peso de cada uno de los órganos (Buffet *et al.*, 1995).

2.3. Técnicas utilizadas para medir la respuesta inmunitaria frente a *L. infantum*

2.3.1. Análisis del metabolismo enzimático y la producción de citoquinas *in vivo*

Las actividades de las enzimas iNOS y arginasa, y la producción de citoquinas se analizaron en el cocultivo de esplenocitos de los animales infectados con DC de ratones “naïve” en una ratio esplenocito-DC de 5:1. Estos cocultivos se mantuvieron durante 96h en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂). Las DC fueron previamente cultivadas en presencia o ausencia de SLA a una concentración de 25 µg/ml durante 12h a 37°C 5% CO₂. Las actividades de ambas enzimas se midieron, siguiendo las técnicas descritas en el apartado 4.2. La producción de IFN-γ, TNF-α e IL-10 se determinó siguiendo las técnicas descritas en el apartado 4.3.

2.3.2. Cuantificación de la respuesta humoral

Transcurridas cinco semanas de infección, y justo en el momento anterior a la eutanasia de los animales, se obtuvieron 50 µl de sangre entera de cada animal para la determinación del título de anticuerpos anti-SLA presentes en el suero mediante la técnica de ELISA estándar. Los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano (MicroWell™) se tapizaron con 100 µl de SLA a una concentración de 10 µg/ml y se incubaron a 4°C durante 12h. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo los sueros de los animales correspondientes haciendo diluciones seriadas. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón IgG de cabra (AB_2619745) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución 1/1000 (*SouthernBiotech, España*). Tras el lavado y la adición del sustrato de la peroxidasa (Ultra TMB-ELISA) (*Thermo Fisher Scientific*) se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2M. La densidad óptica de las muestras se midió por espectrofotometría a 450 nm y el título de cada suero se definió como el inverso del factor de dilución más elevado que presentaba valores de densidad óptica mayores a 0,2.

2.4. Estudio histopatológico del hígado de los animales infectados

Tras el sacrificio, se obtuvieron tres muestras independientes de localizaciones diferentes del hígado de cada uno de los animales infectados, que se fijaron en una solución de formol al 10%. A continuación, se introdujeron en bloques de parafina y se seccionaron con un microtomo para posteriormente teñirlas con hematoxilina y eosina. El análisis descriptivo de la distribución y gravedad de las lesiones fue llevado a cabo por M^a Ángeles Jiménez Martínez del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la UCM. Se evaluó la gravedad de la inflamación de los tejidos mediante una puntuación clínica semicualitativa, determinada en función del número medio de granulomas e infiltrados inflamatorios presente en los tejidos. Se definieron tres categorías de gravedad: leve (menos de 5 infiltrados), moderada (entre 5 y 14



infiltrados) y grave (más de 14 infiltrados). Por último, se estudió el grado de maduración y la organización de los granulomas, clasificándolos en: granulomas inmaduros, aquellos que se encontraban en desarrollo; granulomas maduros, aquellos que habían iniciado el proceso de diferenciación; y granulomas crónicos o estériles, aquellos que no presentaban amastigotes y se encontraban bien diferenciados, organizados con las células de Kupffer y macrófagos en la parte central y un infiltrado inflamatorio, fundamentalmente compuesto por linfocitos.

3. Técnicas de biología celular

3.1. Aislamiento y diferenciación de células primarias

3.1.1. Obtención de DC murinas derivadas de médula ósea

Las DC murinas, empleadas en los cocultivos con esplenocitos de ratones infectados que han sido descritos en el apartado 2.3.1, se obtuvieron a partir de médula ósea de fémur y tibia de ratones BALB/c ($n = 2$) mediante perfusión con solución salina *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) (*Thermo Fisher Scientific*). Los precursores celulares obtenidos fueron cultivados en condiciones estándar en medio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (*Merck*) suplementado con FBS al 10%, una mezcla antibiótica de penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (*PeptoTech, Reino Unido*) a una concentración de 20 ng/ml para su diferenciación (Lutz *et al.*, 1999). En los días 3 y 6 se añadió medio de cultivo fresco con GM-CSF. Transcurridos diez días, las células no adherentes fueron consideradas DC, cuya caracterización fenotípica ha sido ya descrita (Dominguez-Bernal *et al.*, 2014), y sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/ml.

3.1.2. Obtención de monocitos y macrófagos caninos de sangre periférica

Para la obtención de células primarias a partir de sangre periférica canina, se emplearon donantes sanos ($n = 10$) de diferentes razas, edad media y ambos sexos, que cumplieran con el criterio de ser animales negativos frente a *Leishmania* por serología y PCR. Basándonos en un protocolo previamente descrito (Martinez-Rodrigo *et al.*, 2019), se extrajeron 250 ml de sangre entera de cada animal mediante venopunción yugular y se aislaron las células mononucleares por medio de un gradiente de densidad utilizando Histopaque[®]-1077 (*Merck*). A partir de las células mononucleares se obtuvieron los monocitos (Mon), a través de una selección magnética positiva utilizando microesferas recubiertas con anticuerpos anti-CD14 (*Miltenyi Biotec, España*). Estos se mantuvieron en cultivo en medio completo (CM), constituido por *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 con 2 mM de L-glutamina (*GE Healthcare, EE. UU.*) suplementado con FBS al 10%, una mezcla antibiótica (100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin) y 10 mM de HEPES (*Lonza*), incubándose en condiciones estándar hasta ser utilizados en los ensayos de infección. Las células CD14⁻ se recogieron y se almacenaron a -80°C .



Para la diferenciación de los Mon en macrófagos (M ϕ), se cultivaron en frascos de 25 cm² con una densidad celular de 6x10⁶ células/ml en CM suplementado con 33 ng/ml de GM-CSF (*Kingfisher Biotech, EE. UU.*) y se incubaron durante un período de siete días a 37°C 5% CO₂. En los días tres y seis, el CM fue reemplazado por medio fresco con GM-CSF.

3.2. Inmunofenotipado de cultivos celulares primarios

La caracterización de los Mon y M ϕ primarios caninos, se llevó a cabo por citometría de flujo en los días cero y siete de cultivo. Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-CD14 (CD14: RPE, TÜK4), anti-MHCII (MHC clase II: FITC, YKIX334.2), anti-CD86 (CD86: RPE, BU63) y anti-CD40 (CD40: FITC, LOB7/6) conjugados con los fluorocromos correspondientes (*Bio-Rad, España*). Las células CD14⁺ se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (CD3: FITC, CA17.2A12) para caracterizarlas como linfocitos T (CD14⁺CD3⁺). La intensidad de fluorescencia se cuantificó utilizando el citómetro de flujo FACScan (*BD Biosciences, España*), y los datos se procesaron con el software FlowJo X, versión 10.0.7 (*Beckton Dickinson, EE. UU.*).

3.3. Cultivo de líneas celulares

Las células pertenecientes a la línea celular DH82 (ATCC®-CRL-10389™) de macrófagos tumorales caninos, se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y una mezcla antibiótica de penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml) en condiciones estándar hasta su utilización en los ensayos de infección.

3.4. Infección *in vitro*

Los ensayos de infección en células se llevaron a cabo con un número variable de las mismas en función del tipo y los parámetros determinados posteriormente (**Tabla 2**). Las células se sembraron en placas de cultivo celular de 6 pocillos (P6) o 24 pocillos (P24) en las que se habían dispuesto con antelación lentillas de 13 mm de diámetro, tratadas con poli-L-lisina (*Merck*) para favorecer la adherencia celular (Mon y M ϕ primarios caninos). Tras 12h de incubación a 37°C 5% de CO₂, las células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* en una ratio 5:1 parásitos-células. A las 4h PI se lavaron los parásitos no internalizados con DPBS y se determinó el tiempo cero de infección. La cinética de infección fue de 4, 24 y 72h (**Tabla 2**).

Tabla 2. Condiciones de infección *in vitro* en cultivos celulares

Tipo celular	Nº Cel / pocillo	Placa de cultivo	Ratio de infección	Cinética de infección
Mon	5 x10 ⁵	P24	5:1	24 y 72 h
	2x10 ⁶	P6		72 h
M ϕ	5 x10 ⁵	P24		24 y 72 h
	2x10 ⁶	P6		72 h
DH82	2,5 x10 ⁵	P24		4, 24 y 72h
	1 x 10 ⁶	P6		4 h



3.5. Estimación del índice de infección

Para cuantificar la capacidad de infección de *L. infantum* en los distintos tipos celulares, las células se sembraron sobre lentillas en placas de cultivo de 24 pocillos tal y como se describe en el apartado 3.4. Tras los correspondientes tiempos de infección (**Tabla 2**), las células fueron fijadas con metanol al 70% durante 5 minutos y teñidas con Giemsa (R66, Gurr™) (VWR, EE. UU.). Se contaron 400 células por duplicado mediante un microscopio óptico Olympus BX41, utilizando el objetivo de 100 aumentos, y se determinó el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes intracelulares por cada célula infectada, lo que se denominó intensidad de infección. El índice de infección se calculó como el resultado de la multiplicación de ambos parámetros (Cunha *et al.*, 2013).

3.6. Análisis del metabolismo enzimático y la producción de citoquinas en cultivos celulares

Las actividades enzimáticas, de la iNOS y la arginasa, así como la producción de citoquinas, se analizaron en sistemas de cocultivo de Mon o Mø primarios caninos derivados de sangre periférica con linfocitos autólogos de los perros donantes. A las 4 h PI, tras el lavado de los parásitos extracelulares se añadieron los linfocitos autólogos a los cultivos en una ratio 5:1 linfocito-Mon/Mø y se incubaron a 37°C 5% de CO₂ durante 72h. Para la determinación de la actividad de la enzima iNOS, una vez añadidos los linfocitos autólogos al cocultivo, se agregó al medio de cultivo lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 1 µg/ml (Merck) que se incubó junto a las células durante las 72h. Las actividades de ambas enzimas se midieron en función de las técnicas descritas en el apartado 4.2. La producción de IFN-γ, TNF-α e IL-10 se evaluó siguiendo las técnicas descritas en el apartado 4.3.

4. Técnicas inmunológicas

4.1. Determinación de la producción de ROS

La determinación de la producción de ROS se llevó a cabo tras 24 y 72h de infección por citometría de flujo, utilizando el fluoróforo dihydroethidium (DHE) como sistema indicador. Las células fueron incubadas en presencia de DHE 10 mM (Merck) durante 30 min a 37°C con un 5% de CO₂. Como control positivo se utilizó el inductor de ROS forbol-12-miristato-13 acetato (PMA) (Merck), que se incubó junto con las células a una concentración de 1 µg/ml durante 30 min en condiciones estándar. La intensidad de fluorescencia del DHE se cuantificó utilizando el citómetro de flujo FACScan y el software FlowJo X, versión 10.0.7.

4.2. Cuantificación del metabolismo enzimático

La producción de NO se estimó de forma indirecta a partir de la concentración obtenida de nitritos utilizando la prueba química de Griess (Ding *et al.*, 1988). La actividad arginasa se midió



tras la lisis de las células, mediante su incubación durante 30 min en una solución compuesta por tris-ácido clorhídrico (Tris-HCl) 0,1M, cloruro sódico (NaCl) 300 μ M, floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 μ M y Tritón X-100 al 1% (*Merck*) (*Corraliza et al.*, 1994). La cantidad de arginasa suficiente para inducir la formación de 1 mmol de urea por min se definió como la unidad de actividad enzimática (U). Los resultados se expresaron en miliunidades (mU).

4.3. Medición de la producción de citoquinas

La producción de IFN- γ , TNF- α e IL-10, se determinó mediante técnicas de ELISA. Para ello, se emplearon los kits comerciales correspondientes para cada especie, (*DuoSet[®]ELISA Development Systems*) siguiendo las instrucciones del fabricante (*R&D systems, EE. UU.*).

5. Técnicas de biología molecular

5.1. Extracción de ácido ribonucleico

El ácido ribonucleico (RNA) total de los cultivos celulares infectados se aisló a las 4 y 72h PI mediante el kit comercial *NZY Total RNA Isolation Kit (NZYTech, Portugal)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido se determinó su concentración y pureza utilizando el espectrofotómetro NanoDrop[™]2000 (*Thermo Fisher Scientific*).

5.2. Cuantificación de los niveles de expresión de citoquinas, TLR, NO y arginasa por qPCR

El RNA total obtenido de los cultivos celulares tras 72h de infección se ajustó a una concentración de entre 200 y 400 ng para cada muestra, que se retrotranscribieron para obtener el DNA complementario (cDNA) mediante un kit comercial denominado *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech)*. Se cuantificaron los niveles de expresión de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-18, TNF- α , iNOS, arginasa, TLR2 y TLR4. Los cebadores empleados para la amplificación de los genes analizados se diseñaron de forma específica para estos estudios (**Tabla 3**). Las reacciones de qPCR de transcripción inversa (qRT-PCR) se realizaron utilizando el kit comercial *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) (NZYTech)*, empleando 5 pmol de cada cebador y 4 μ l de cDNA diluido en un volumen final de 20 μ l, usando el sistema de qPCR 7500 FAST (*Applied Biosystems, EE. UU.*). La cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes de interés se llevó a cabo mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen and Livak, 2008), previa normalización de los valores en base a los genes metabólicos β -actina y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). La eficiencia de las reacciones de qPCR se estableció en un índice de determinación R^2 superior a 0,99 y una pendiente de la recta de entre -3,6 y -3,0.



Tabla 3. Cebadores empleados en las reacciones de qRT-PCR

Gen	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Orientación	Posición	Tamaño (bp)	NCBI ^a N° de acceso	Referencia
<i>β-actin</i>	qmB-actin-1D	GGCACCACACCTTCTACAATG	Forward	343-363	151	NM_001195845.2	(Mas et al., 2020)
	qmB-actin-1R	TGGATGGCTACGTACATGGCT	Reverse	476-496			
GAPDH	qGAPDH-1D	CCAGAACATCATCCCTGC	Forward	603-620	240	AB038240.1	(Mas et al., 2020)
	qGAPDH-1R	GAGACCACCTGGTCCTCAGTG	Reverse	822-842			
IL-1β	qIL-1 β-1D	GATGGCTTACTCCAGTAACAATG	Forward	1429-1451	158	XM_005630074.2	(Mas et al., 2020)
	qIL-1 β-1R	GCCTCAGACTCTTGTTACAGAGC	Reverse	1564-1586			
IL-6	qIL-6-1D	GAGACCTGCTTGACAAGAATCAC	Forward	367-389	123	NM_001003301.1	(Mas et al., 2020)
	qIL-6-1R	GATCTTGGTACTCATGTGCACAG	Reverse	467-489			
IL-10	qIL-10-1D	CACGACCCAGACATCAAGAACCAC	Forward	304-327	142	EU426968.1	(Mas et al., 2020)
	qIL-10-1R	TACTAAATGCGCTCTTCACCTGC	Reverse	423-445			
IL-12	qIL-12-1D	AGCAGTGACACTTTCAGCAGAG	Forward	513-534	143	NM_001003292.1	(Mas et al., 2020)
	qIL-12-1R	GCTTGTGAATAGCATCCACCACG	Reverse	633-655			
IL-18	qIL-18-1D	GATTCTGACTGTACAGATAATGC	Forward	211-233	99	NM_001003169.1	(Mas et al., 2020)
	qIL-18-1R	CTTCACAGAGATAGTTACTGCCAG	Reverse	286-309			
TNF-α	qTNFa-1D	AGCCAGTAGCTCATGTTGTAGC	Forward	260-281	122	NM_001003244.4	(Mas et al., 2020)
	qTNFa-1R	CGGCACTATCAGCTGGTTGTCTG	Reverse	359-381			
Arginasa	qArg-1D	GCATGGCTATTGGAAGCATCTC	Forward	794-815	182	XM_532053.6	(Mas et al., 2020)
	qArg-1R	GAATCCTGGTACATCGGGTATC	Reverse	954-975			
iNOS	qInos-1D	GTCTTGTCTGGGAGCCATCATG	Forward	586-607	161	XM_022422531.1	(Mas et al., 2020)
	qInos-1R	CCACCCTGGCCAGATGTTCTC	Reverse	725-746			
TLR2	qTLR 2-1D	GAACCTATCCGACACAAGAATGC	Forward	1331-1353	164	EU487534.1	(Mas et al., 2020)
	qTLR 2-1R	AGGCATCTGGTAGAGTCTTCAAC	Reverse	1472-1494			
TLR4	qTLR 4-1D	ATTCCAGTTTGAAGCAGGCCAGTG	Forward	1300-1323	134	NM_001002950.2	(Mas et al., 2020)
	qTLR 4-1R	GACTTCGAGGCTGACCAAGCCATC	Reverse	1410-1433			



5.3. Construcción de librerías de cDNA y secuenciación del RNA

Para la construcción de las librerías de cDNA, se partió del RNA total obtenido de tres réplicas biológicas de los cultivos celulares a las 4h PI. Una vez aislado, su concentración y pureza se evaluaron tal y como se describe en el apartado 5.1. Además, se analizó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, que incluía la tinción de ácido nucleico intercalante GelRed (*Biotium, EE.UU.*), y el kit comercial *RNA 6000 Nano* perteneciente al bioanalizador Agilent 2100 (*Agilent Technologies, EE.UU.*). Se utilizó un máximo de 1 µg de RNA por muestra. Tanto la construcción de librerías como la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) fueron realizadas por la empresa Novogene[®] de acuerdo a sus protocolos optimizados. Brevemente, las librerías de secuenciación se generaron usando el kit comercial *NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit* para la tecnología Illumina[®] (*NEB, EE. UU.*), siguiendo con las recomendaciones del fabricante. El RNA mensajero (mRNA) se purificó a partir del RNA total utilizando esferas magnéticas unidas a oligonucleótidos Poli-T y se fragmentó mediante cationes divalentes. Tras la retrotranscripción y adenilación de los extremos 3', el cDNA se unió a adaptadores para favorecer su hibridación. Se seleccionaron los fragmentos de cDNA de 150-200bp usando el sistema AMPpure XP (*Beckman Coulter, EE. UU.*) y se amplificaron por PCR. La calidad de las librerías se analizó en el bioanalizador Agilent 2100. Por último, las librerías fueron secuenciadas en la plataforma Illumina HiSeq 2000 (*Illumina, EE. UU.*) para generar las lecturas pareadas (*paired-end*).

Los datos crudos obtenidos en la secuenciación se encuentran disponibles en la base datos *NCBI Sequence Read Archive* con el número de acceso PRJNA701880.

5.4 Control de calidad, mapeo y cuantificación de los niveles de expresión génica

La calidad de los datos obtenidos tras la secuenciación se analizó mediante la herramienta informática FASTP (<http://github.com/OpenGene/fastp>) (Chen *et al.*, 2018), eliminándose las lecturas que contenían adaptadores, secuencias Poli-N y las lecturas de baja calidad. Se calcularon los índices de calidad Phred (Q) 20 y 30 (Ewing and Green, 1998) y el contenido de guanina-citosina (GC) (Sheng *et al.*, 2017) para cada muestra. Todos los análisis posteriores se realizaron únicamente teniendo en cuenta las lecturas de alta calidad.

Las lecturas se alinearon frente al genoma de referencia de los cánidos (*Canis lupus familiaris*, versión CanFam3.1. NCBI: GCA_000002285.2) y de *Leishmania infantum* JPCM5 (versión ASM287v2. NCBI: GCA_000002875.2), obtenidos de la base de datos ENSEMBL/NCBI (Flicek *et al.*, 2014; Hunt *et al.*, 2018) usando el software HISAT2 (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/inde>) (Pertea *et al.*, 2016). Los niveles de expresión se estimaron en función de los fragmentos por kb de transcrito por millón de lecturas mapeadas (FPKM) de cada gen, conocido y nuevo, teniendo en cuenta la longitud del gen y el número de lecturas (Trapnell *et al.*, 2010).



5.5 Análisis del enriquecimiento y la expresión diferencial de genes

En primer lugar, se investigó la correlación entre las muestras infectadas en las mismas condiciones para asegurar su aceptación como réplicas biológicas y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para valorar su agrupación (Son *et al.*, 2018). La expresión diferencial de los genes en las distintas condiciones se estudió utilizando el algoritmo DESeq2 del software estadístico R (<http://www.r-project.org>), con base en un modelo de distribución binomial negativa para la determinación de diferencias estadísticas (Anders and Huber, 2010). Los valores *P* resultantes se ajustaron utilizando el enfoque de Benjamini y Hochberg (Benjamini, 1995) para controlar la Tasa de descubrimientos falsos (FDR). Los genes con un valor FDR < 0,05 se definieron como genes diferencialmente expresados (DEG).

Los DEG fueron analizados para la asignación de términos de ontología génica (GO) y para establecer su distribución entre las categorías función molecular, proceso biológico y componente celular (Ashburner *et al.*, 2000; The Gene Ontology, 2019). Los términos GO enriquecidos se identificaron mediante la herramienta bioinformática PANTHER 16.0 (<http://www.pantherdb.org>) (Thomas *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 2020), utilizando la prueba estadística de sobrerrepresentación. Para facilitar su análisis, una vez obtenidos, se utilizó el servidor REVIGO para identificar los términos GO no redundantes y agruparlos en función de su similitud semántica, permitiendo una semejanza del 0,5 en todos los casos (Supek *et al.*, 2011). Las rutas biológicas se identificaron mediante la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of genes and genomes*) (Kanehisa and Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa *et al.*, 2020) y la herramienta bioinformática STRING 10 versión 11.0 (<https://www.string-db.org>) (Szklarczyk *et al.*, 2019). Los términos GO y rutas biológicas con un valor FDR inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis de enriquecimiento funcional con los DEG hallados en *L. infantum* se realizó mediante la base de datos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org>, VEuPathDB) (Aslett *et al.*, 2010; Harb and Roos, 2020).

6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados, en primer lugar, se estudió la distribución de las variables. Aquellas variables que se ajustaron a una distribución normal se analizaron mediante las pruebas de inferencia estadística paramétrica: *t de Student* para muestras relacionadas o independientes y análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, en función del número de variables comparadas. Por el contrario, aquellas variables que no se ajustaban a una distribución normal se analizaron mediante pruebas de inferencia estadística no paramétrica como la prueba de Mann-Whitney. La prueba específica realizada en cada caso se encuentra recogida en la figura correspondiente. Todos los análisis se realizaron usando el Software Prism 6 (*Graph Pad software*) y los resultados se representan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de *p* se encontraron por debajo de 0,05 ($*p < 0,05$) y 0,01 ($**p < 0,01$).

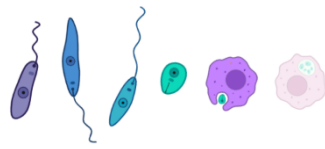


7. Consideraciones éticas

Todos los ensayos que han implicado el uso de animales han sido diseñados de acuerdo con la legislación aplicable (Ley española 63/2013 y Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE), siguiendo el principio de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento). Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité de ética y experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid y la Comunidad de Madrid con los números de procedimiento: PROEX 05/2018 y PROEX 212/18.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



OBJETIVO 1

Caracterizar el perfil de virulencia *in vivo* de los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7, en comparación con la cepa BCN150, en un modelo experimental murino de VL

OBJETIVO 1

1. Contexto científico

La reciente dispersión de la leishmaniosis hacia zonas no endémicas pone de manifiesto el cambio acontecido en su perfil epidemiológico. Esta extensión es fruto del incremento en los movimientos de personas y animales desde zonas endémicas, pero también de los cambios medioambientales y ecológicos inducidos por actividades humanas como la urbanización y la deforestación (Alvar *et al.*, 2012; Gradoni, 2013). La creación del parque forestal periurbano Bosquesur, entre las localidades madrileñas de Fuenlabrada, Leganés, Alcorcón, Getafe y Pinto en 2009, tuvo como consecuencia la alteración de sus condiciones ecológicas, con el consiguiente incremento en la densidad de vectores (*P. perniciosus*) y hospedadores alternativos (liebres y conejos) de *Leishmania* (Arce *et al.*, 2013). Esta confluencia de factores dio lugar al mayor brote de leishmaniosis humana en Europa (Arce *et al.*, 2013), afectando a unas 800 personas con manifestaciones cutáneas y viscerales (gran parte en personas inmunocompetentes). Los estudios de xenodiagnóstico realizados revelaron el papel de reservorio ejercido por los lagomorfos, al resultar, no solo seropositivos frente al parásito, sino también infecciosos para la población de vectores (Molina *et al.*, 2012; Jimenez *et al.*, 2014). Además, la abundancia de estas especies en el entorno del parque y el fácil acceso a las mismas favoreció un cambio en las preferencias alimenticias de los vectores que pasaron a consumir su sangre como principal fuente de alimento (Jimenez *et al.*, 2013; Gonzalez *et al.*, 2017). Cabe destacar que, aunque el perro es el principal reservorio de leishmaniosis en la cuenca Mediterránea, en este caso los cánidos no contribuyeron de forma significativa en la transmisión de la enfermedad (Miro *et al.*, 2017). Por último, los estudios filogenéticos y de tipificación molecular llevados a cabo con distintos aislados obtenidos de pacientes, reservorios y vectores revelaron la implicación del genotipo de *L. infantum* ITS-Lombardi (Chicharro *et al.*, 2013). Un genotipo que a pesar de encontrarse circulando previamente, no había sido descrito hasta el momento.

Este inusual escenario, en el que se afectaron un gran número de personas en un área geográfica muy reducida, apuntaba hacia un cambio en la virulencia de los aislados de *L. infantum* responsables. En un estudio *ex vivo*, realizado previamente en nuestro laboratorio, se halló un incremento en la virulencia de dos de estos aislados tanto en DC como en Mø murinos al compararlos con la cepa BCN150 (Dominguez-Bernal *et al.*, 2014). Posteriormente, otro estudio de un grupo colaborador, que reproducía una infección natural *in vivo* en hámster con aislados de *L. infantum* procedentes del brote, mostró una mayor virulencia de estos en términos de carga parasitaria en órganos diana, alteraciones clínicopatológicas e infectividad para los vectores (Martin-Martin *et al.*, 2015).

En este objetivo y con el fin de caracterizar el perfil de virulencia, profundizamos en el estudio comparativo entre los aislados BOS1FL1 y POL2FL7, procedentes del brote de la Comunidad de



Madrid, y la cepa de referencia BCN150. Se trataba de analizar si los resultados observados *ex vivo*, se reproducían en un modelo murino *in vivo* de VL, y así evaluar los mecanismos inmunológicos que podrían haber permitido al parásito superar la inmunocompetencia de muchos de los pacientes afectados.

2. Resultados

2.1. Variabilidad en el grado de visceralización en función del aislado o cepa de *L. infantum*

En primer lugar, se evaluó el potencial de diseminación de BCN150, BOS1FL1 y POL2FL7 en el hígado y bazo de los animales. Se inocularon por vía IV seis ratones BALB/c, por grupo, con el mismo número de promastigotes de cada cepa/aislado, tal y como se describe en el apartado 2.1. Cinco semanas después de la infección, los ratones se eutanasiaron y la carga parasitaria en ambos órganos se determinó mediante un ensayo LDA. Los resultados obtenidos mostraron una mayor capacidad metastásica de los aislados del brote (BOS1FL1 y POL2FL7), con mayores cargas parasitarias en ambos órganos en comparación con el grupo BCN150. El aislado BOS1FL1 fue el que presentó un potencial de diseminación en órgano diana más elevado (**Figura 7**).

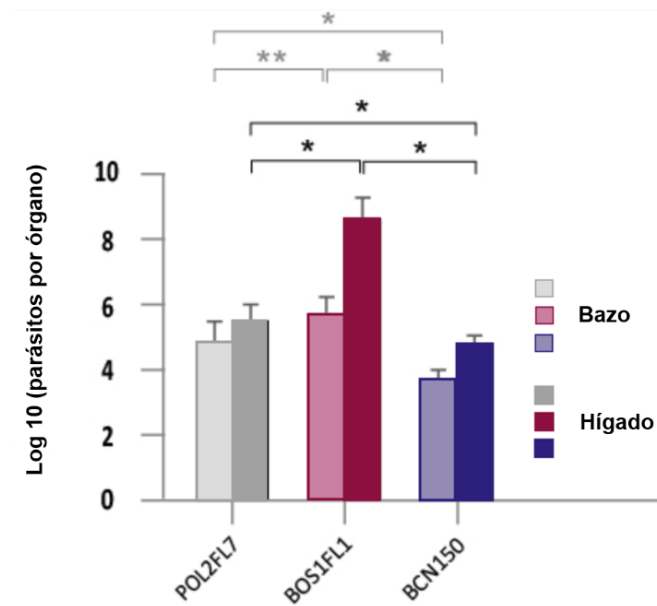


Figura 7. Determinación de la carga parasitaria en hígado y bazo de los animales infectados por *L. infantum*. Se inocularon seis ratones por grupo con 1×10^6 promastigotes/animal en fase estacionaria y se determinó la carga parasitaria en ambos órganos a las 5 semanas PI, mediante un ensayo LDA. Los resultados se representan como la media \pm SEM. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la prueba paramétrica *t de Student*. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



2.2. Inducción de una respuesta humoral específica frente a *L. infantum*

Para evaluar la respuesta humoral inducida en los ratones por cada aislado o cepa parasitaria, se obtuvieron las correspondientes muestras de sangre y se cuantificó la presencia de anticuerpos IgG específicos anti-SLA presentes en el suero. El título medio de anticuerpos del grupo BCN150 se estableció en 1:220 (\pm 49), mientras que los de los grupos POL2FL7 y BOS1FL1 se establecieron en 1:500 (\pm 100) y 1:1267 (\pm 217) respectivamente (**Figura 8**). En correlación con la carga parasitaria y la progresión de la enfermedad, los ratones infectados por el aislado BOS1FL1 fueron los que presentaron una respuesta humoral anti-SLA más elevada.

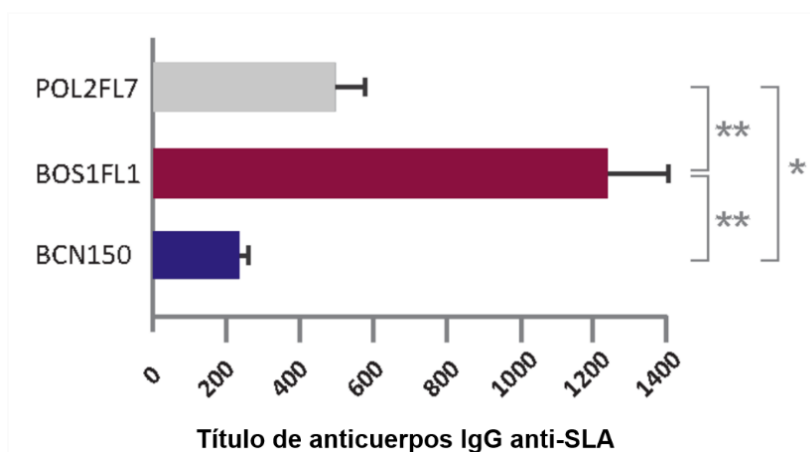


Figura 8. Respuesta inmunitaria humoral frente a SLA. El suero de los ratones infectados por *L. infantum* se obtuvo a las 5 semanas PI en todos los grupos. El título de anticuerpos presentes en el suero se determinó mediante técnicas de ELISA. Los resultados se representan como la media \pm SEM. Los datos obtenidos no se ajustaron a una distribución normal, por lo que su análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica *Mann-Whitney* (* P < 0,05; ** P < 0,01).

2.3. Predominio de la actividad arginasa tras la infección por POL2FL7 y BOS1FL1

El estudio del metabolismo de la L-arginina en las células fagocíticas, más concretamente las actividades de las enzimas iNOS y arginasa, resulta de gran importancia para determinar la tendencia del perfil inmunológico del hospedador frente a la infección por *Leishmania*. La cuantificación de ambas actividades enzimáticas se realizó en un sistema de cocultivo de esplenocitos de los ratones infectados con DC de ratones *naïve*, previamente estimuladas con SLA durante 96h. Todos los grupos infectados produjeron niveles de nitritos entre 5 y 10 veces superiores a los niveles basales del grupo no infectado (PBS: $3,08 \pm 1,06 \mu\text{M}$), sin que se observasen diferencias significativas entre los distintos aislados o cepas de *L. infantum* (**Tabla 4**). Los valores de actividad arginasa detectados en los cocultivos celulares de los ratones infectados fueron, también, significativamente superiores a los del grupo control (PBS). Entre los grupos infectados, los ratones inoculados con el aislado BOS1FL1 presentaron una actividad arginasa significativamente mayor ($30,69 \pm 6,55 \text{ mU}$) que el resto. Por el contrario, no se hallaron diferencias entre los grupos inoculados con POL2FL7 y BCN150 (**Tabla 4**).

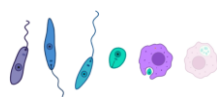


Tabla 4. Evaluación del metabolismo de la L-arginina en los ratones infectados por *L. infantum* BCN150, POL2FL7 y BOS1FL1.

Grupo	Nitritos (μM)	Actividad arginasa (mU)	Ratio iNOS/Arginasa
POL2FL7	28,97 \pm 4,12**	20,18 \pm 3,99*	1,44*
BOS1FL1	18,42 \pm 10,01**	30,69 \pm 6,55*, **a, *b	0,60*, **a, **b
BCN150	31,86 \pm 7,32**	18,30 \pm 5,46	1,74*
PBS	3,08 \pm 1,06	10,79 \pm 1,96	0,19*

Los resultados se representan como la media \pm SEM. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) entre los grupos infectados y el grupo control PBS. La letra (a) indica diferencias significativas entre los grupos POL2FL7 o BOS1FL1 y el grupo BCN150. La letra (b) indica diferencias significativas entre POL2FL7 y BOS1FL1. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba paramétrica *t de Student*.

2.4. Modulación diferencial de la defensa inmunológica del hospedador basada en la producción de citoquinas en respuesta a la infección

La infección de los ratones por BOS1FL1 y POL2FL7 indujo una producción significativamente menor de citoquinas proinflamatorias, IFN- γ y TNF- α , (**Figura 9A, B**) y mayor de citoquinas antiinflamatorias, IL-10, (**Figura 9C**) en comparación con la cepa BCN150. La producción de IL-10 de los esplenocitos de los ratones pertenecientes al grupo BOS1FL1, al igual que la carga parasitaria, el título de anticuerpos IgG anti-SLA y la actividad arginasa, se encontró por encima de los niveles observados para el grupo POL2FL7 (** $p < 0,01$). Las ratios IFN- γ /IL-10 y TNF- α /IL-10 resultaron significativamente reducidos en los ratones infectados por POL2FL7 y BOS1FL1 con respecto al grupo BCN150 (**Tabla 5**). Entre los aislados procedentes del brote, BOS1FL1 dio lugar a unas ratios de citoquinas Th1/Th2 cuyos valores fueron de entre 0,6 y 0,75 veces los del grupo POL2FL7.

Tabla 5. Ratios de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en los ratones infectados por *L. infantum* BCN150, POL2FL7 y BOS1FL1.

Grupo	Ratio IFN- γ /IL-10	Ratio TNF- α /IL-10
POL2FL7	0,19 \pm 0,08**, **a	0,48 \pm 0,19*, *a
BOS1FL1	0,12 \pm 0,09**, **a	0,36 \pm 0,23*, *a
BCN150	0,93 \pm 0,18**	0,89 \pm 0,22*
PBS	3,94 \pm 1,68	10,79 \pm 1,96

Los resultados se representan como la media \pm SEM. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos infectados y el grupo control PBS. La letra (a) indica diferencias significativas entre los grupos POL2FL7 o BOS1FL1 y el grupo BCN150. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de dos vías seguida del test de Tukey. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



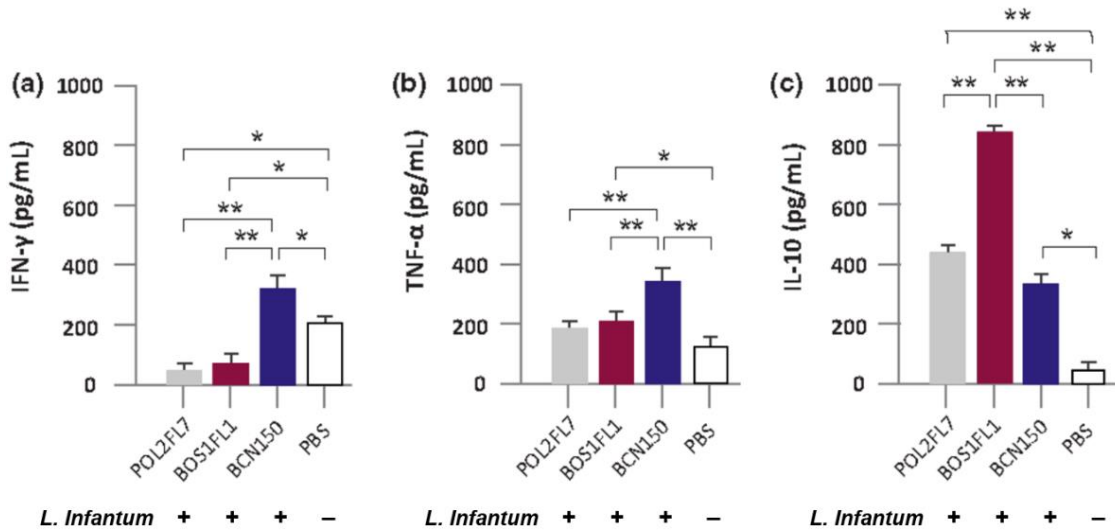


Figura 9. Producción de citoquinas en los animales infectados por *L. infantum*. Los esplenocitos de los ratones infectados se cocultivaron con DC derivadas de médula ósea de ratones *naïve* estimuladas con SLA durante 96h. La producción de IFN- γ (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) se determinó mediante técnicas de ELISA. Los resultados obtenidos se representan como la media \pm SEM. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de dos vías seguida del test de Tukey. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

2.5. Diferencias en la afectación hepática de los ratones en respuesta a la infección

En el estudio anatomopatológico de los hígados de los ratones se observó que, después de cinco semanas de infección, todos los animales desarrollaron una hepatitis de tipo granulomatoso. Por el contrario, el grupo control no presentó lesiones inflamatorias ni de cualquier otra índole. La gravedad de la hepatitis desarrollada se expresó de forma semicuantitativa mediante su clasificación en tres categorías: leve, moderada y grave. De acuerdo con este criterio, los ratones pertenecientes al grupo BOS1FL1 presentaron una afectación hepática entre moderada y grave, mientras que los ratones de los grupos POL2FL7 o BCN150 desarrollaron mayoritariamente una hepatitis leve (Figura 10).

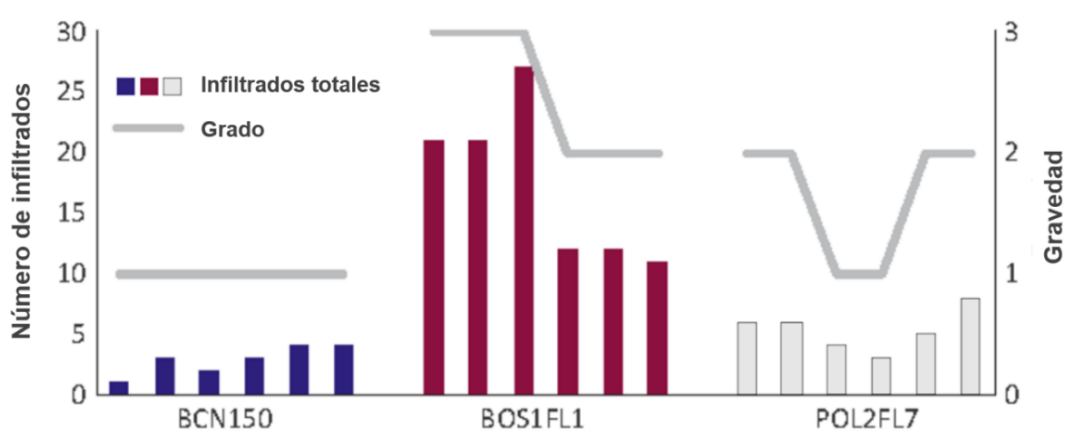


Figura 10. Evaluación de la afectación hepática en los ratones infectados por *L. infantum*. Representación gráfica del número total de infiltrados o granulomas hepáticos hallados en cada animal en todos los grupos. La gravedad de la inflamación se clasificó en 1 leve (< 5 granulomas), 2 moderada (5 - 14 granulomas) y 3 grave (> 14 granulomas).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de granulomas maduros y crónicos o estériles en relación con el porcentaje de infiltrados inmaduros resultó mucho menor en los ratones infectados por BOS1FL1 que en el resto de los grupos. Aunque la gravedad de la inflamación fue similar en los grupos POL2FL7 y BCN150, los ratones infectados por el aislado POL2FL7 mostraron un mayor porcentaje de granulomas estériles que el grupo BCN150 (**Figura 11**).

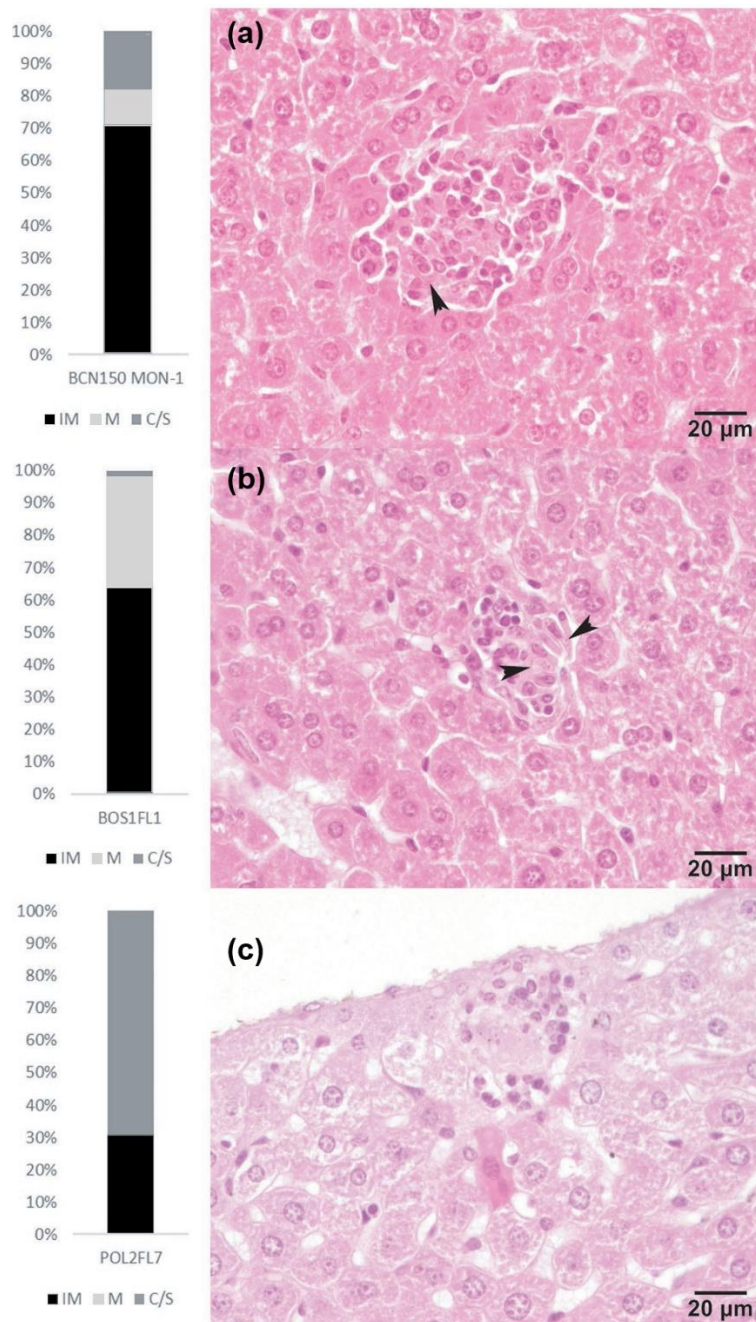


Figura 11. Porcentaje de granulomas hepáticos en función de su fase de maduración. Los granulomas se clasificaron en inmaduros (IM), maduros (M) y crónicos o estériles (C/S). Los granulomas IM (a) se caracterizaron por presentar en su interior una población de células de Kupffer hipertrofiadas con un número variable de amastigotes (flechas) intercaladas con algunos linfocitos y macrófagos. Los granulomas M (b) presentaron una población de macrófagos y células gigantes en la parte central que contenían amastigotes. Los granulomas C/S (c) se caracterizaron por la ausencia de amastigotes y la presencia de una población de linfocitos en la periferia.



3. Discusión

Existen muchos factores que influyen en la virulencia de *Leishmania* y pueden favorecer un incremento en el número y la gravedad de los casos de leishmaniosis (Buckling, 2007). En el brote de la Comunidad de Madrid, se describió por primera vez el papel ejercido por los lagomorfos como reservorios alternativos sin que se hallase ninguna afectación clinicopatológica de los mismos (Molina *et al.*, 2012; Jimenez *et al.*, 2014). No obstante, la interacción de *L. infantum* con estas especies pudo aumentar la virulencia de los aislados responsables, favoreciendo el gran número de personas inmunocompetentes afectadas. Esto podría ser debido a que el patógeno y el hospedador no habrían tenido la oportunidad de coevolucionar hacia una situación de equilibrio (Casadevall *et al.*, 2011). En base a los resultados obtenidos en estudios previos de interacción *Leishmania*-hospedador (Carrion *et al.*, 2006; Nieto *et al.*, 2011; Dominguez-Bernal *et al.*, 2014), en este objetivo, se pretendía evaluar el potencial patógeno de los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7 al compararlos con la cepa, previamente caracterizada, BCN150 en un modelo experimental murino de VL.

Los resultados, en línea con los previamente obtenidos en el grupo INMIVET tras la infección *ex vivo* de Mø y DC murinas y por Martin-Martín y colaboradores en un modelo *in vivo* de infección natural en hámster (Dominguez-Bernal *et al.*, 2014; Martin-Martin *et al.*, 2015), revelaron un espectro de fenotipos de virulencia que abarcaban un rango de agresividad de moderado a elevado. En comparación con la cepa BCN150, la infección con BOS1FL1 y POL2FL7 dio lugar a mayores cargas parasitarias, títulos serológicos más elevados y, en función de los parámetros inmunológicos analizados, una menor capacidad de control de la infección.

Cinco semanas después de la inoculación intravenosa, en todos los grupos, los promastigotes de *L. infantum* fueron capaces de visceralizar y establecer la infección. Los parásitos se encontraron en el hígado y el bazo de los ratones, pero con distintos niveles de diseminación dependiendo del grupo analizado. Los ratones infectados por los aislados POL2FL7 y BOS1FL1 presentaron un mayor número de parásitos en órgano que los del grupo BCN150, siendo las cargas parasitarias en el grupo BOS1FL1 prácticamente el doble de las observadas para la cepa BCN150 y superiores a las del aislado POL2FL7.

En vista de los resultados obtenidos, decidimos investigar si esta gran capacidad metastásica de los aislados procedentes del brote se relacionaba con otros biomarcadores inmunológicos asociados con la progresión de la infección. La producción de anticuerpos específicos es un buen marcador del establecimiento de la infección y desarrollo de la enfermedad. La síntesis de anticuerpos IgG anti-SLA no constituye un mecanismo de defensa efectivo ante un patógeno intracelular, como *L. infantum*, pero su detección mediante técnicas de ELISA tiene un gran valor serodiagnóstico (Maalej *et al.*, 2003; Lakhal *et al.*, 2012). Su determinación permite el diagnóstico cualitativo de la infección y la cuantificación de la intensidad de diseminación del parásito en el hospedador. Los ratones infectados por POL2FL7 y BOS1FL1 mostraron títulos de



anticuerpos IgG anti-SLA entre 2 y 6 veces superiores a los hallados en el grupo BCN150 y, a su vez, los del grupo BOS1FL1 fueron 2,5 veces superiores a los del grupo POL2FL7, lo que se asoció con su mayor carga parasitaria.

Leishmania es un parásito intracelular obligado y, por tanto, requiere de un microambiente en el interior de las células del hospedador que permita su mantenimiento y multiplicación. La L-arginina es un aminoácido esencial cuyo metabolismo refleja la capacidad de control de la infección por parte del hospedador (Iniesta *et al.*, 2001; Kropf *et al.*, 2005). Cuando las células fagocíticas son activadas de forma adecuada, se induce la actividad enzimática de la iNOS que actúa sobre la L-arginina para producir moléculas con actividad leishmanicida como el NO. Por el contrario, cuando las células fagocíticas son activadas de forma inadecuada, se induce la acción de la enzima arginasa que, empleando el mismo sustrato, da lugar a la síntesis de poliaminas, compuestos que favorecen el crecimiento y supervivencia de los parásitos (Wanasen and Soong, 2008). En un estudio reciente se describió que la actividad arginasa podía servir como uno de los principales marcadores de gravedad de la enfermedad (Badirzadeh *et al.*, 2017) y en otro estudio se le atribuyó un gran valor pronóstico en el progreso de la infección (Muxel *et al.*, 2017). Nuestros resultados mostraron un incremento de la actividad arginasa en los ratones infectados en comparación con el grupo control, especialmente en aquellos infectados por los aislados procedentes del brote. La elevada virulencia del aislado BOS1FL1, en términos de carga parasitaria y respuesta humoral, también se observó en su mayor inducción de esta actividad enzimática.

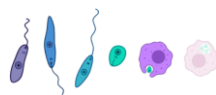
La respuesta inmunitaria celular en los ratones tras su infección por los aislados POL2FL7 y BOS1FL1 (especialmente este último) se inclinó hacia un perfil fundamentalmente de tipo Th2. La producción de IFN- γ y TNF- α en los ratones infectados por los aislados procedentes del brote fue menor que la inducida por la cepa BCN150 y a la vez, en estos mismos grupos, se observó un incremento en la producción de IL-10, lo que se reflejó en sus ratios IFN- γ /IL-10 y TNF- α /IL-10. La correlación positiva entre el control de la infección y una respuesta inmunitaria celular polarizada hacia un perfil de tipo Th1, ha sido ampliamente descrita en células de origen murino, canino y humano (Paul *et al.*, 2012; Gradoni, 2015; Holowka and Bucala, 2020). Además, numerosos estudios han demostrado que la sobreproducción de IL-10, una citoquina inhibidora de la actividad fagocítica en las células del hospedador mamífero es uno de los principales factores que favorecen la supervivencia parasitaria (Nylen *et al.*, 2007; Nylen and Sacks, 2007; Paul *et al.*, 2014). Este predominio del perfil Th2 en la respuesta de los ratones infectados por los aislados procedentes del brote se asoció con la gran diseminación de los parásitos y la progresión de la enfermedad en los mismos.

En el estudio histopatológico de los hígados de los ratones infectados se halló una mayor gravedad de la inflamación hepática tras la infección con los aislados POL2FL7 y BOS1FL1 en comparación con la cepa BCN150. Estos resultados se correlacionaron con la elevada carga parasitaria detectada y el alto título serológico anti-SLA encontrado en estos grupos. Una mayor



carga parasitaria da lugar a una mayor respuesta inflamatoria, pero esta respuesta no es siempre efectiva (Murray, 2001; McFarlane *et al.*, 2011). Numerosos estudios en seres humanos y modelos animales han demostrado que la capacidad de resolución de la infección por *L. infantum* está ligada con la formación de granulomas y su grado de maduración (Stager *et al.*, 2003; Nieto *et al.*, 2011; Dominguez-Bernal *et al.*, 2015). En el grupo de ratones infectados por el aislado BOS1FL1, el porcentaje de granulomas inmaduros fue 2 veces superior al de granulomas maduros y estériles. Estos resultados se correspondían con una respuesta inflamatoria desencadenada en este grupo menos efectiva, relacionada con su elevada respuesta humoral anti-SLA. El grupo de ratones infectados por el aislado POL2FL7 desarrolló una hepatitis inflamatoria ligeramente más grave que la del grupo BCN150, lo que se asoció con su mayor carga parasitaria. Sin embargo, el porcentaje de formación de granulomas crónicos o estériles en este grupo fue superior, lo que no se tradujo en una mayor capacidad para contener la infección, pudiendo estar implicados otros factores en la virulencia del aislado.

En conjunto, los resultados obtenidos en este objetivo ponen de manifiesto el incremento en el perfil de virulencia exhibido por los aislados BOS1FL1 y POL2FL7, y suponen una primera aproximación al estudio de los mecanismos implicados. Las razones que explican la gran afectación de pacientes inmunocompetentes en el brote de leishmaniosis de la Comunidad de Madrid aún no se han aclarado en su totalidad. No obstante, estos resultados constituyen un paso más en el conocimiento y abren puertas hacia futuras investigaciones al respecto.



OBJETIVO 2

Analizar el perfil de virulencia *ex vivo* y el tropismo diferencial del aislado de *L. infantum* BOS1FL1, en comparación con la cepa BCN150, tras la infección de células primarias de origen canino

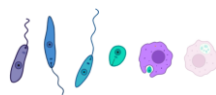
OBJETIVO 2

1. Contexto científico

En la leishmaniosis se produce un desequilibrio entre la respuesta inmunitaria del hospedador y la capacidad de *Leishmania* para modularla que condiciona el establecimiento y progreso de la enfermedad. Inmediatamente después de la infección se activa la maquinaria defensiva del hospedador dando lugar a la producción de compuestos como NO y ROS (Carneiro *et al.*, 2016). Si bien, la producción de NO depende de la activación previa de las células, la producción de ROS, fundamentalmente por parte de los monocitos, es un mecanismo innato que resulta crítico en la adquisición de resistencia frente a la infección (Scott and Novais, 2016). Sin embargo, que se logre o no el control de la parasitosis depende de muchos factores, entre ellos la naturaleza genética del hospedador (Chapman and Hill, 2012) o el genotipo de *Leishmania* implicado (Guerbouj *et al.*, 2001). De hecho, existen estudios previos que han demostrado que en la especie murina el principal mecanismo de control de las células fagocíticas es la producción de NO, mientras que en la especie humana este papel recae en mayor medida en la producción de ROS (Novais *et al.*, 2014).

En España la CanL causada por *L. infantum* es una enfermedad parasitaria endémica y la leishmaniosis humana se considera hipoendémica, si bien ha experimentado un importante aumento de su incidencia en los últimos años a consecuencia del brote de la Comunidad de Madrid (Arce *et al.*, 2013). A pesar de que los cánidos son el principal reservorio de leishmaniosis en la cuenca mediterránea, en este brote no han tenido un papel relevante en la transmisión, siendo los lagomorfos los que han actuado como reservorios alternativos (Molina *et al.*, 2012). Prueba de ello, son los resultados mostrados en los estudios epidemiológicos desarrollados en la zona, que no revelaron un aumento significativo de la prevalencia de la CanL (Miro *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos tanto *ex vivo* como *in vivo* en el modelo murino revelaron una mayor virulencia de los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7, procedentes del brote, en términos de capacidad de infección y habilidad para comprometer la integridad de la respuesta defensiva de los hospedadores. Sin embargo, ante la ausencia de un recrudecimiento de la enfermedad en los cánidos, nos planteamos la hipótesis de que existiese un tropismo diferencial de estos aislados que hubiese favorecido su adaptación a otros reservorios. Por ello, decidimos comparar el comportamiento del aislado BOS1FL1 y la cepa BCN150 en su interacción con células primarias de origen canino, concretamente en Mon y Mø derivados de sangre periférica de perro.



2. Resultados

2.1. Caracterización *in vitro* de *L. infantum* BOS1FL1 y BCN150

En primer lugar, se estudió la cinética de crecimiento y metacicloénesis de *L. infantum* BOS1FL1 y BCN150 para descartar que cualquier diferencia que obtuviéramos en los análisis posteriores pudiera estar relacionada con un diferente desarrollo de los parásitos *in vitro*. Los promastigotes se cultivaron a 26°C durante 20 días, llevándose a cabo un recuento diario de las formas viables de cada aislado/cepa en la cámara de Neubauer mejorada. No se hallaron diferencias significativas en el número de promastigotes en cada recuento, ambos parásitos presentaron una velocidad de crecimiento similar y alcanzaron la fase estacionaria entre los días cinco y ocho de cultivo (**Figura 12A**). Mediante la observación microscópica de su morfología se estudió su metacicloénesis *in vitro*. Los resultados no revelaron diferencias significativas en el número de promastigotes metacíclicos entre BCN150 y BOS1FL1 en ninguna de las fases del ciclo (**Figura 12B**).

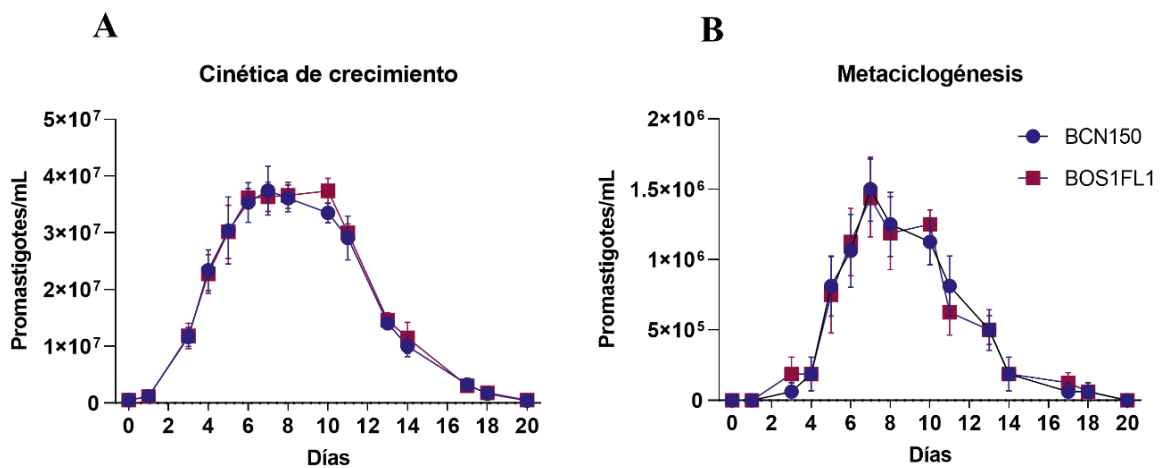


Figura 12. Cinética de crecimiento (A) y metacicloénesis (B) de los parásitos *in vitro*. Los promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 se cultivaron durante 20 días, llevándose a cabo recuentos diarios de las formas viables en la cámara de Neubauer mejorada. Los parásitos se consideraron metacíclicos cuando presentaron una relación entre la longitud de su flagelo y su cuerpo celular >2. Los resultados obtenidos se representan como la media ± SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la prueba paramétrica *t de Student*. (**P* < 0,05; ***P* < 0,01)

Además, se evaluó la viabilidad de los promastigotes tras exponerlos a concentraciones crecientes de H₂O₂ para determinar su susceptibilidad al efecto leishmanicida ejercido por ROS. Los resultados mostraron una reducción del porcentaje de viabilidad de ambos parásitos correlacionado con la concentración H₂O₂. La cepa BCN150 presentó una mayor resistencia que el aislado BOS1FL1 (**Figura 13**), diferencia que se hizo estadísticamente significativa a una concentración de 4 mM (*p* < 0,01).



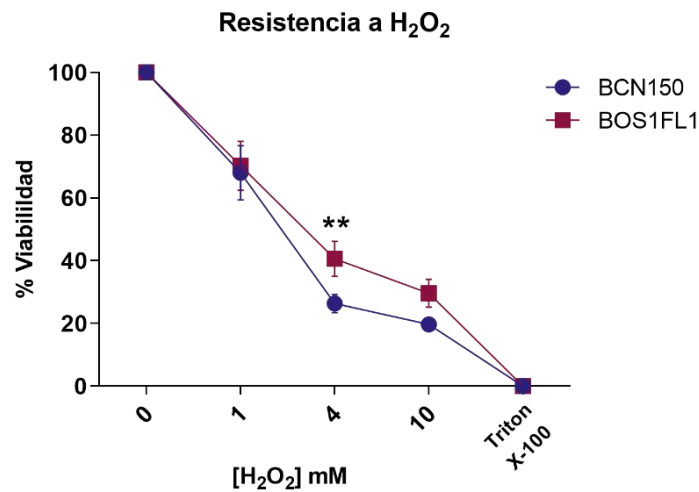
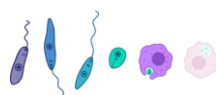


Figura 13. Viabilidad de los promastigotes en condiciones de estrés oxidativo. Los promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 se expusieron a concentraciones crecientes de H₂O₂ y su viabilidad se determinó mediante un ensayo MTT. El gráfico muestra los resultados obtenidos (media ± SEM) en un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes realizados. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica *t de Student*. (**P* < 0,05; ***P* < 0,01)

2.2. Diferencias en la interacción de *L. infantum* con Mon y Mø caninos en función del aislado o cepa

El estudio del comportamiento de *L. infantum* en su interacción con células caninas, se realizó aislando Mon y Mø a partir de sangre periférica de perros donantes, que se caracterizaron por citometría de flujo. Los Mon se definieron como una población celular CD14⁺ MHC-II⁺ CD40^{+/-} y CD86⁻. Una vez diferenciados, los Mø se caracterizaron en función de los mismos marcadores de superficie como una población CD14^{+/-} MHC-II^{+/-}, CD40⁺ y CD86⁻ y se infectaron con promastigotes de ambos tipos parasitarios. El progreso de la infección se evaluó a lo largo de 72h. BCN150 presentó un mayor índice de infección celular en comparación con BOS1FL1 tanto a las 24h (279 ± 18 vs 73 ± 7, *p* < 0,0001) como a las 72h PI (176 ± 17 vs 53 ± 3, *p* = 0,0002). Estas diferencias se correspondieron con un mayor porcentaje e intensidad de infección en ambos tiempos (**Figura 14A, B**).

Los resultados fueron similares tras la infección de los Mon con ambos parásitos. El índice de infección celular de BCN150 resultó superior al de BOS1FL1 tanto a las 24h (200 ± 28 vs 86 ± 6; *p* = 0,0002) como a las 72h PI (435 ± 16 vs 142 ± 14; *p* < 0,0001). De acuerdo con estos resultados, BOS1FL1 mostró una menor capacidad de infección en términos de porcentaje e intensidad en ambos puntos temporales (**Figura 14A, B**).



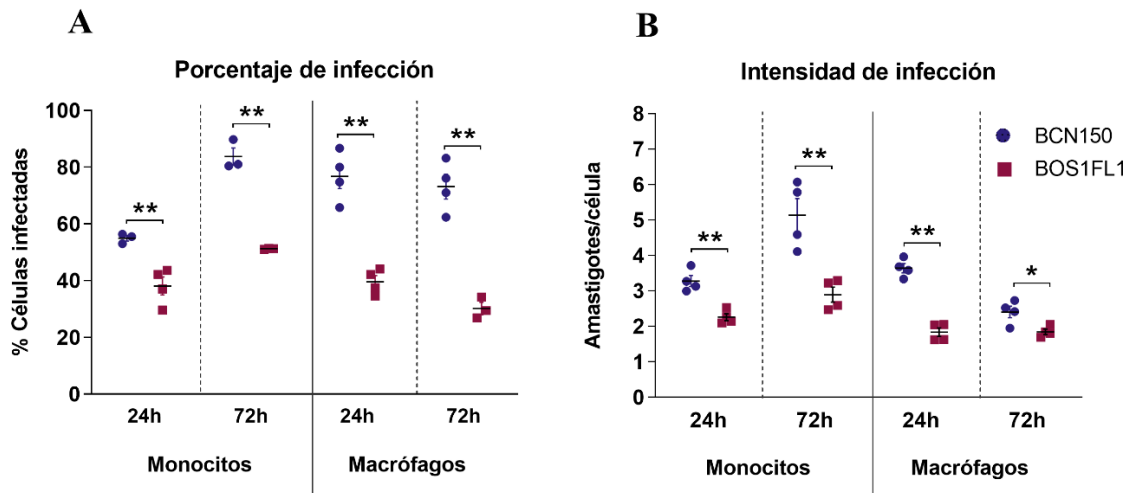


Figura 14. Capacidad de infección de BCN150 y BOS1FL1 en Mon y Mø caninos. Las células fueron infectadas con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio de 5:1 parásitos-células. El porcentaje (A) y la intensidad (B) de infección se evaluaron a las 24 y 72h PI mediante el recuento de las células por microscopía óptica. El gráfico representa los resultados obtenidos (media ± SEM) en un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes realizados. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey de comparación múltiple (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

2.3. Evaluación de la respuesta oxidativa desarrollada tras la infección con *L. infantum*

La producción de compuestos con actividad leishmanicida (NO y ROS) es uno de los principales mecanismos de protección de las células fagocíticas frente a *L. infantum*. Por ello, decidimos investigar si existían diferencias en la inducción de estos compuestos tras la infección de las células caninas con BCN150 y BOS1FL1. La producción de NO, en los cocultivos de linfocitos autólogos con Mon y Mø infectados, se determinó de forma indirecta a través de la concentración de nitritos. No se alcanzaron los límites de detección de la técnica, en ninguno de los tipos celulares, ni tras la infección con *L. infantum* ni en el grupo control de células no infectadas.

La producción de ROS se determinó por citometría de flujo. Como control positivo se utilizaron células tratadas con PMA, un inductor específico de estos compuestos. La mayor producción de ROS se obtuvo en los Mon a la 24h de infección con la cepa BCN150 ($295,2 \pm 7,2$), superando, incluso, los valores obtenidos en el control positivo. En los Mø la producción de ROS en las células infectadas fue mayor que en el grupo control de células no infectadas, pero, a diferencia de lo observado en los Mon, no se superaron los niveles inducidos por el PMA (Figura 15).



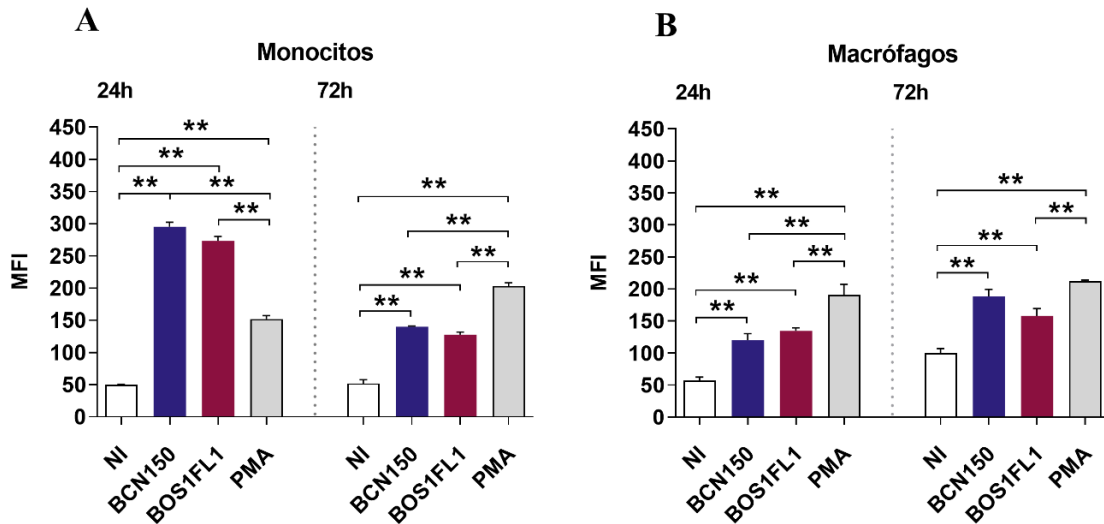


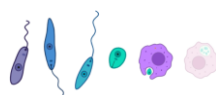
Figura 15. Determinación de la producción de ROS en los Mon y Mφ caninos infectados por BCN150 y BOS1FL1. Las células se infectaron con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio 5:1 parásitos-células. Transcurridas 24 y 72h PI, las células se incubaron con DHE (10 μM) durante 30 minutos a 37°C 5% CO₂. Como control positivo se utilizó PMA (1 μg/ml). La intensidad media de fluorescencia (MFI) del DHE se determinó por citometría de flujo. Los resultados mostrados en el gráfico se corresponden con un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey de comparación múltiple. (**P* < 0,05; ***P* < 0,01).

Posteriormente se analizó el efecto de ROS sobre la infectividad de ambos parásitos. Para ello, las células fueron incubadas con el inductor PMA (1μg/ml) durante 30 min y posteriormente se llevó a cabo la infección. En los Mon, a las 24 y 72h PI, en las células tratadas con PMA se observó una reducción significativa del porcentaje, la intensidad (**Figura 16A, B**) y el índice de infección (**Tabla 6**). Esta reducción en la infectividad de los parásitos fue más pronunciada en el caso de la cepa BCN150, lo que indicaba una mayor susceptibilidad de la misma a ROS (**Tabla 6**). En los Mφ caninos el porcentaje de infección se redujo significativamente sólo a las 24h PI y la intensidad no disminuyó e incluso se incrementó a las 72h PI en el caso del aislado BOS1FL1 (**Figura 16A, B**).

Tabla 6. Efecto de la inducción de ROS sobre el índice de infección de BCN150 y BOS1FL1 en monocitos y macrófagos caninos.

	Monocitos				Macrófagos			
	BCN150		BOS1FL1		BCN150		BOS1FL1	
	NT	PMA	NT	PMA	NT	PMA	NT	PMA
24 h PI	286 ± 15	18 ± 2**	152 ± 13	26 ± 1**	449 ± 3	328 ± 10	332 ± 11	288 ± 17
72h PI	298 ± 34	42 ± 4**	161 ± 12	37 ± 9**	414 ± 4	432 ± 38	330 ± 20	500 ± 30**

Las células fueron tratadas con PMA (1 μg/ml) durante 30 min e infectadas con *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio 5:1 parásitos-células. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey de comparación múltiple (**P* < 0,05; ***P* < 0,01).



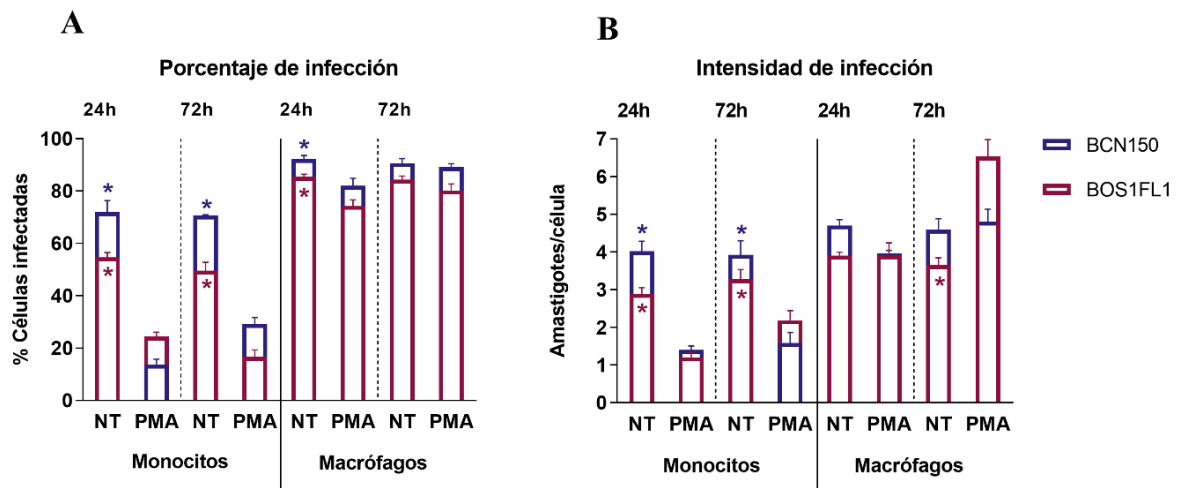


Figura 16. Efecto de ROS sobre la capacidad de infección de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1. Las células fueron tratadas con PMA (1 µg/ml) e incubadas durante 30 min. Transcurrido este tiempo se infectaron con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio 5: 1 parásitos-células. El porcentaje (A) y la intensidad (B) de infección se evaluaron a las 24 y 72h PI mediante el recuento de las células por microscopía óptica. El gráfico representa los resultados obtenidos (media ± SEM) en un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes realizados. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey de comparación múltiple. Los asteriscos (*) indican las diferencias entre las células tratadas y no tratadas con PMA (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

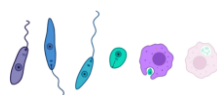
2.4. Análisis de la actividad de las enzimas arginasa e iNOS

Los niveles de actividad de la enzima arginasa se analizaron en los cocultivos de Mon o Mø caninos con linfocitos autólogos de los donantes. Para ello, los Mon o Mø fueron infectados con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 y posteriormente se añadieron los linfocitos. La determinación de la actividad arginasa se llevó a cabo a las 72h PI. Al igual que en los resultados obtenidos en la producción de NO, los niveles de actividad de esta enzima no superaron en ningún caso los límites de detección de la técnica empleada.

Con el objetivo de descartar que los resultados negativos obtenidos se debieran a la falta de sensibilidad de los métodos empleados, se analizó la expresión del mRNA de las enzimas arginasa e iNOS mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de la enzima iNOS no resultaron significativos y aunque la enzima arginasa sí se expresó ligeramente, no se observaron diferencias entre las células infectadas con cualquiera de los parásitos y el control de células no infectadas

2.5. Cuantificación de la expresión diferencial de citoquinas inflamatorias y TLRs tras la infección con BCN150 y BOS1FL1

Los niveles de expresión de los genes que codificaban las citoquinas proinflamatorias IL-1β (*IL1B*), IL-6 (*IL6*), IL12p40 (*IL12B*), IL-18 (*IL18*) y TNF-α (*TNF*), y la citoquina antiinflamatoria IL-10 (*IL10*), se estudiaron en los Mon y Mø caninos mediante qRT-PCR. Las células se infectaron con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 y la expresión de los genes de interés se



cuantificó a las 72h PI. Los resultados revelaron un aumento de la expresión de *IL1B* y *TNF* en los Mon infectados con respecto al grupo control de células no infectadas. Entre ambos parásitos, estos niveles de expresión fueron superiores en el caso de la cepa BCN150, sin embargo, la diferencia con BOS1FL1 no resultó estadísticamente significativa (**Figura 17A, B**). El resto de las citoquinas proinflamatorias solo se expresaron ligeramente en respuesta a la infección, sin que se observasen diferencias importantes. En los Mon, la cepa BCN150 dio lugar a una expresión significativamente mayor del gen *IL10* que el aislado BOS1FL1 (**Figura 17C**).

Además, se analizó la expresión de los genes que codificaban los receptores TLR-2 (*TLR2*) y TLR-4 (*TLR4*), observándose un incremento de la misma tras la infección de los Mon que fue mayor en el caso de la cepa BCN150, aunque la diferencia con BOS1FL1 no resultó estadísticamente significativa (**Figura 17D**). En los M ϕ , no se hallaron diferencias en los niveles de expresión de las citoquinas ni los receptores TLR.

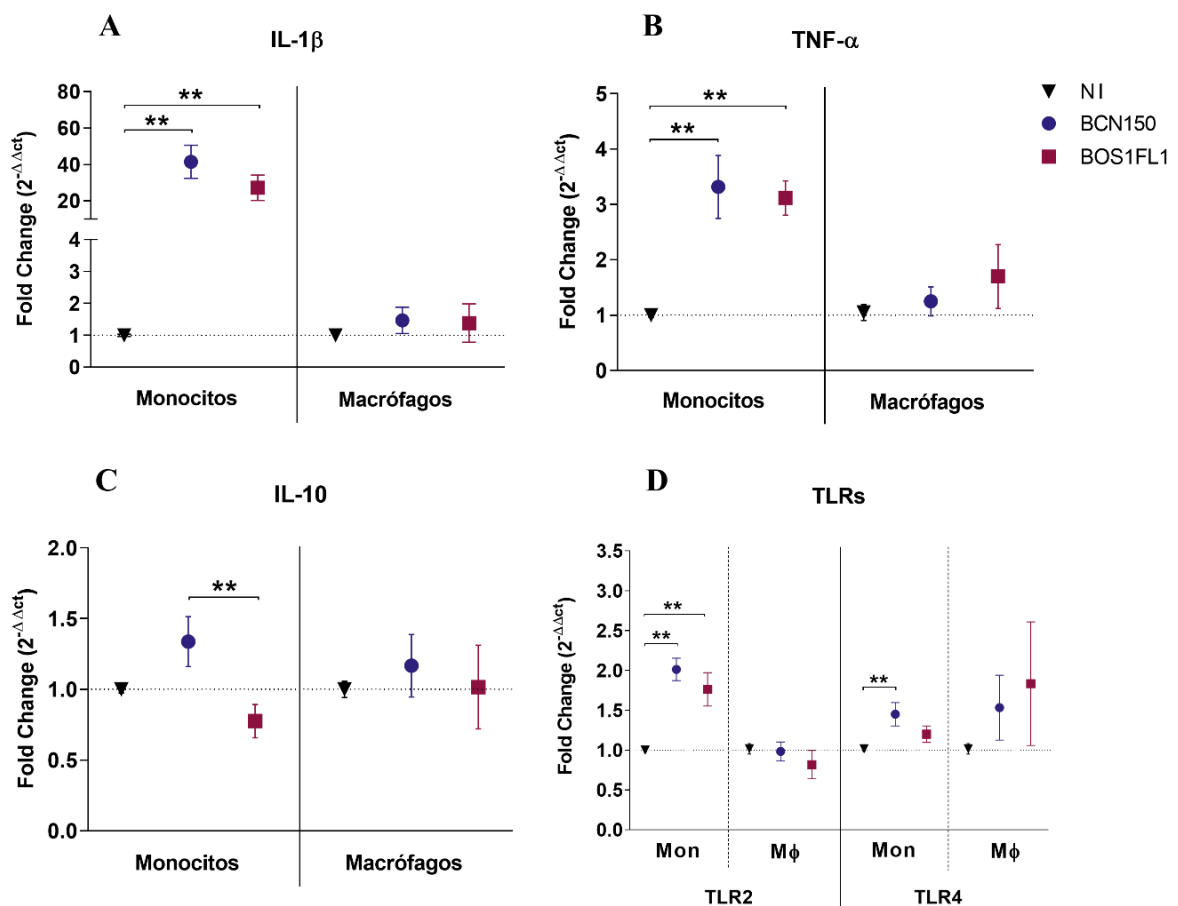
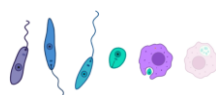


Figura 17. Análisis de la expresión de IL-1 β (*IL1B*), IL-10 (*IL10*), TNF- α (*TNF*), TLR2 (*TLR2*) y TLR4 (*TLR4*). Se cuantificaron los niveles de expresión relativa (*Fold change*) de *IL1B* (A), *TNF* (B), *IL10* (C) y *TLR2* y *TLR4* (D) en los Mon y M ϕ caninos a las 72h PI. Las células fueron infectadas con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio 5:1 parásitos-células. El gráfico muestra los resultados obtenidos (media \pm SEM) en 4 experimentos independientes. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey de comparación múltiple (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



2.6. Predominio de un perfil Th2 de susceptibilidad en las células caninas infectadas con *L. infantum* BCN150

Finalmente, se analizó la producción de citoquinas de los Mon y M ϕ , al ponerlos, una vez infectados, en cocultivo con linfocitos autólogos de los perros donantes. La infección con *L. infantum* dio lugar a un aumento significativo de la producción de citoquinas tanto proinflamatorias (TNF- α e IFN- γ) como antiinflamatorias (IL-10) (**Figura 18**). La cepa BCN150 indujo una producción significativamente mayor de IL-10 (264 ± 31 vs 165 ± 24 pg/mL, $p = 0,0002$) y menor de IFN- γ (196 ± 3 vs 261 ± 26 pg/mL, $p = 0,0151$) que el aislado BOS1FL1 en ambos tipos celulares. No se hallaron diferencias en la producción de TNF- α en función del aislado o cepa (**Figura 18**). Estos resultados indicaron un desequilibrio en la producción de citoquinas tras la infección con BCN150 hacia un perfil de susceptibilidad de tipo Th2.

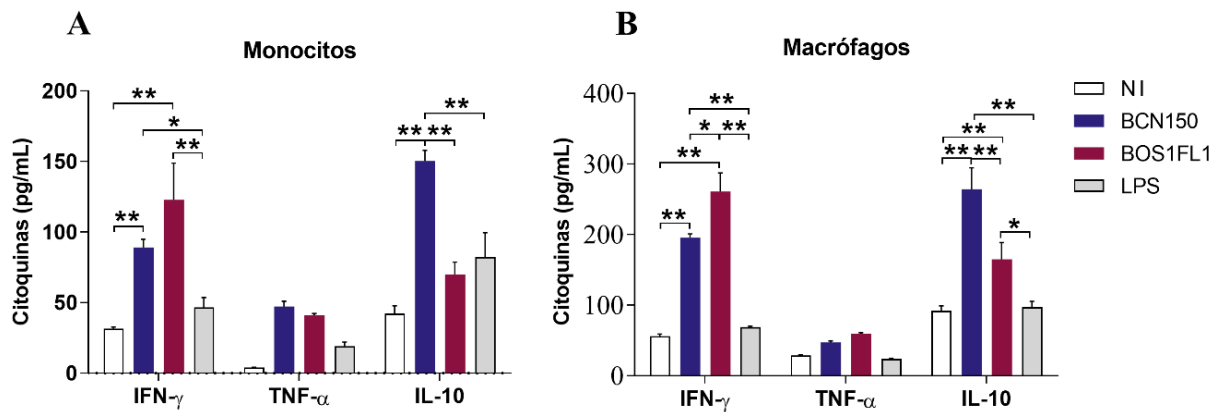


Figura 18. Producción de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en el cocultivo de Mon (A) y M ϕ (B) caninos con linfocitos autólogos. La concentración de las citoquinas se analizó en el sobrenadante de los cocultivos celulares infectados por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1. El gráfico representa los resultados obtenidos (media \pm SEM) en tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA de dos vías seguida por el test de Tukey de comparación múltiple (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

3. Discusión

Los cambios en la virulencia de *L. infantum* se reflejan en su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria innata y adaptativa del hospedador, facilitando su adaptación a nuevas especies y la dispersión de la enfermedad (Gupta *et al.*, 2013). En este contexto, en el grupo de investigación INMIVET nos planteamos la posibilidad de que existiese un cambio en el tropismo de los aislados de *Leishmania* responsables del brote de leishmaniosis de la Comunidad de Madrid, que hubiese permitido su adaptación a nuevos reservorios como liebres y conejos, mostrando una menor virulencia en los cánidos (Miro *et al.*, 2017; Horrillo *et al.*, 2019). Por ello, se decidió comparar el comportamiento del aislado BOS1FL1 en su interacción con células de origen canino con la cepa de referencia BCN150.



La caracterización fenotípica de los promastigotes *in vitro* se llevó a cabo para descartar que cualquier diferencia hallada en la interacción con las células caninas pudiera estar asociada con cambios en su cinética de crecimiento y metacicloénesis. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias en la velocidad de crecimiento o el desarrollo de formas metacíclicas entre BCN150 y BOS1FL1. Sin embargo, al comparar su porcentaje e intensidad de infección en los Mon y Mø caninos, el aislado BOS1FL1, que había mostrado una mayor virulencia en la especie murina (Dominguez-Bernal *et al.*, 2014), presentó una menor capacidad de infección que la cepa BCN150.

Para intentar entender las razones de este cambio en el comportamiento intracelular de BOS1FL1 y BCN150 en función de la especie de origen de las células infectadas, investigamos su capacidad para modular la respuesta defensiva de las células. Se analizaron los niveles de actividad de la enzima arginasa y la producción de NO a las 72h PI. Ambos parámetros se encontraron por debajo de los límites de detección de la técnica empleada para su determinación, con independencia del aislado o cepa. Para corroborar estos resultados, se evaluaron los niveles de expresión del mRNA de las enzimas iNOS y arginasa mediante qRT-PCR. Coincidiendo con otros estudios (Singh *et al.*, 2018), esta expresión resultó insignificante en ambos casos tanto en las células infectadas como en el grupo control de células no infectadas. En la especie murina se establece una relación directa entre la actividad del NO y la eliminación de los parásitos (Mauel *et al.*, 1991), sin embargo, estudios previos han demostrado que en otras especies, como la humana, el NO no tiene un papel significativo en la defensa de los Mon y Mø frente a *Leishmania* (Gantt *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2017), aunque, si se observa un efecto de otros compuestos como ROS (Novais *et al.*, 2014). En los cánidos la información es mucho más limitada y el papel que ejerce el NO, es controvertido. Mientras algunos autores defienden que las células caninas también utilizan este compuesto como estrategia leishmanicida (Petitdidier *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017), otros, en concordancia con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, no han hallado una producción significativa del mismo al infectar Mon y Mø caninos con *L. infantum* (Turchetti *et al.*, 2015; Montserrat-Sangra *et al.*, 2018; Martinez-Rodrigo *et al.*, 2019).

La elevada producción de ROS observada en las células caninas infectadas con BCN150 y BOS1FL1, apunta a un predominio de estos compuestos en la respuesta oxidativa defensiva de los cánidos frente a la leishmaniosis. La susceptibilidad de *Leishmania* frente a ROS ha sido previamente estudiada (Cortes *et al.*, 2019), hallándose diferencias entre híbridos naturales de *L. infantum* y *L. major* (Cortes *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en el análisis de la viabilidad de BCN150 y BOS1FL1 tras su exposición a H₂O₂, uno de los componentes englobados entre las especies reactivas de oxígeno, revelaron una mayor resiliencia *in vitro* de BOS1FL1 a diferentes concentraciones de este compuesto. Esto podría concederle una ventaja potencial a este aislado al enfrentarse a la maquinaria defensiva del hospedador, especialmente en aquellas células en las que la producción de radicales oxidativos es mayor. Además, al inducir la producción de ROS



en las células caninas mediante su tratamiento con PMA, se observó una clara reducción en el porcentaje y la intensidad de infección de ambos parásitos, menos intensa en el caso del aislado BOS1FL1, lo que probablemente se deba a su mayor capacidad de resistencia. No obstante, esta diferencia no se correspondió con una mayor infectividad en las células caninas, por lo que parecían existir otros factores implicados en el diferente comportamiento intracelular de ambos parásitos.

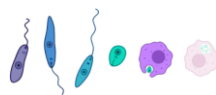
En vista de los resultados obtenidos en la evaluación de la respuesta oxidativa, decidimos investigar si la infección con BCN150 y BOS1FL1 desencadenaba una diferente modulación de la producción de citoquinas en las células. Para ello, se analizó la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 y TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10) en los Mon y M ϕ infectados. La infección por BCN150 y BOS1FL1 no indujo una expresión significativa de IL-6, IL-12 o IL-18. La concentración de IL-12 ya había sido analizada en otros estudios a partir del sobrenadante de M ϕ humanos infectados con *L. major*, sin que se encontrara una producción significativa de la misma (Brodskyn *et al.*, 2000). Resultados semejantes se obtuvieron en otro estudio en el que se infectaron monocitos humanos con aislados de *L. infantum* viscerotrópicos y dermatotrópicos y con aislados de *L. major* con diferente perfil de virulencia (Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2009). Estos resultados, en conjunto con nuestros datos, sugerían que la virulencia de *Leishmania* parecía no influir en la expresión de esta citoquina en las células caninas. Por el contrario, sí observamos un aumento de la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-10 en los Mon caninos tras la infección por *L. infantum*. La IL-1 β actúa incrementando la respuesta inflamatoria al favorecer la expresión de TNF- α y ambas citoquinas pueden jugar un papel dual en la respuesta frente a la leishmaniosis, promoviendo su progreso o su control (Scott and Novais, 2016). Son muy pocos los estudios que se han realizado para investigar el papel de la IL-1 β en pacientes humanos infectados por *Leishmania*, pero los resultados disponibles indican que puede contribuir al progreso de la enfermedad (Santos *et al.*, 2018). En los cánidos se ha descrito una mayor producción de IL-1 β en el riñón de los animales tras su infección por *L. infantum*, asociada con la respuesta inflamatoria y la activación a nivel glomerular de complejos multimoleculares denominados inflamomas. Esto, a su vez, se relaciona con una mayor gravedad de la enfermedad renal, que es uno de los procesos patogénicos más relevantes en la CanL (Esch *et al.*, 2015). Aunque algunos estudios han sugerido que la producción IL-10 no se relaciona con la susceptibilidad de los cánidos frente a *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2016), muchos otros (Almeida *et al.*, 2017; Medina-Colorado *et al.*, 2017; Martínez-Rodrigo *et al.*, 2019; Reza *et al.*, 2019), si defienden esta asociación. Nuestros resultados, en línea con estos estudios, revelaron un incremento de la expresión de IL-1 β e IL-10 en las células infectadas que, además, fue superior en la cepa BCN150, si bien la diferencia con BOS1FL1 sólo resultó estadísticamente significativa en el caso de la IL-10. Estas diferencias podrían explicar, en parte, la menor capacidad de infección del aislado BOS1FL1 observada en los monocitos y estar relacionadas con una menor virulencia en la especie canina. En el caso de los M ϕ no se hallaron diferencias significativas en la expresión de citoquinas ni proinflamatorias ni antiinflamatorias en respuesta



a la infección que permitiesen explicar la diferente infectividad de los parásitos. Sin embargo, cuando se analizó la respuesta adaptativa desencadenada ante la infección, mediante el cocultivo de los Mon y Mø con linfocitos autólogos de los perros donantes, sí se halló una mayor producción de IL-10 y una menor producción de IFN- γ en las células infectadas con la cepa BCN150 en comparación con el aislado BOS1FL1, tanto en los Mon como en los Mø. Este desequilibrio en el ambiente de citoquinas generado por la cepa BCN150 apuntaba a un mayor perfil de diferenciación de linfocitos Th2, lo que está ampliamente descrito que conlleva a la mayor susceptibilidad frente a la infección (Gradoni, 2015).

La expresión de receptores TLR en la superficie de las células inmunitarias innatas es clave en el reconocimiento de patógenos como *Leishmania* (Faria *et al.*, 2012). A pesar de que gran parte de los estudios describen su papel defensivo, en la actualidad existen evidencias de que estos receptores, también, pueden actuar facilitando el progreso de la enfermedad (Faria *et al.*, 2012). Nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 en los Mon caninos infectados en comparación con el grupo control de células no infectadas. Existen estudios que han demostrado un aumento de la expresión de estos receptores en pacientes que presentan cuadros de VL no tratados, atribuyéndoles un importante papel en la patogenia de la enfermedad al favorecer la producción de TNF- α , IL-10 y TGF- β (Gatto *et al.*, 2015). La función que desempeñan en la CanL no se ha estudiado en detalle (Hosein *et al.*, 2017), sin embargo, diferentes autores han hallado un aumento de la expresión de TLR2, en distintos tejidos y órganos de cánidos naturalmente infectados con *L. infantum* (Melo *et al.*, 2014; Esteve *et al.*, 2015; Montserrat-Sangra *et al.*, 2016). Por el contrario, la expresión de TLR4 no se ha relacionado con el progreso de la infección e incluso se ha visto disminuida en el bazo y linfonódulo de los animales infectados (Hosein *et al.*, 2015). La mayor expresión de TLR2 y TLR4 observada en los Mon caninos infectados con BCN150 con respecto a BOS1FL1, si bien no resultó estadísticamente significativa, podría estar relacionada con su mayor producción de IL-10, lo que podría favorecer la mayor infectividad observada en esta cepa. Además, algunos estudios atribuyen a los TLR un importante papel en la producción de ROS ante la infección por *Leishmania* (Srivastava *et al.*, 2012). El incremento en la expresión de estos receptores, observado en los Mon caninos, podría haber contribuido, por tanto, a la gran producción de ROS observada en los mismos, especialmente en las células infectadas con la cepa BCN150.

La mayor resistencia del aislado BOS1FL1 al efecto de ROS *in vitro*, no se reflejó en un incremento de su capacidad de infección en las células caninas, resultando incluso inferior a la de la cepa BCN150. Los resultados obtenidos en el análisis del perfil de citoquinas, la expresión de TLR y el desarrollo de la respuesta oxidativa en las células caninas, no fueron suficientes para explicar el diferente comportamiento mostrado por BOS1FL1 en los cánidos. Los factores implicados en el perfil de virulencia de los diferentes aislados y cepas de *L. infantum* aún están escasamente definidos, pero su estudio se hace indispensable para explicar los cambios observados en términos de patología y epidemiología en el brote de leishmaniosis de la Comunidad de Madrid.



OBJETIVO 3

Estudiar el perfil transcriptómico desarrollado en la interacción parásito-célula hospedadora, empleando el aislado de *L. infantum* BOS1FL1 en comparación con la cepa BCN150, y la línea celular DH82 de macrófagos caninos

OBJETIVO 3

1 Contexto científico

En la leishmaniosis, la naturaleza de la interacción entre *Leishmania* y las células del sistema inmunitario del hospedador resulta determinante para el establecimiento, desarrollo y posterior evolución de la enfermedad (Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2009). Los macrófagos son las células diana por excelencia del protozoo, pero también actúan como células presentadoras de antígeno para los linfocitos activando la respuesta defensiva del hospedador, por lo que juegan un papel fundamental en el control o el progreso de la infección (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). Por su parte, *Leishmania* cuenta con sus propios mecanismos para modular y evadir esta respuesta, adaptándose al ambiente generado en el interior de los macrófagos y utilizando su propia maquinaria para sobrevivir y multiplicarse (Podinovskaia and Descoteaux, 2015).

En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva del RNA (RNA-seq) ha supuesto un importante avance en el estudio de la interacción entre *Leishmania* y sus diferentes hospedadores (Patino and Ramirez, 2017). Mediante su uso, se han podido identificar cambios en el perfil transcripcional tanto de los patógenos como de las células infectadas de manera simultánea (Westermann *et al.*, 2012). Esto ha contribuido en gran medida al conocimiento de los mecanismos involucrados en la virulencia de los parásitos (Shadab *et al.*, 2019) y su capacidad de evasión de la respuesta inmunitaria (Dillon *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2 revelaron importantes diferencias en el comportamiento del aislado de *L. infantum* BOS1FL1, procedente del brote de la Comunidad de Madrid, en comparación con la cepa de referencia BCN150, en función de la especie hospedadora infectada. Este aislado, exhibió una mayor virulencia en el modelo murino experimental de VL que, sin embargo, no se tradujo en una mayor capacidad de infección con respecto a BCN150 en el caso de los M ϕ y M ϕ primarios caninos. No obstante, al evaluar la respuesta inmunitaria generada en estas células, especialmente en los M ϕ , no se hallaron diferencias significativas en la producción de citoquinas y compuestos leishmanicidas, como ROS, que justificasen los diferentes índices de infección observados.

En este contexto, decidimos llevar a cabo un ensayo de RNA-seq infectando la línea celular DH82 de macrófagos tumorales caninos con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1, con el objetivo de identificar no solo posibles cambios de la expresión génica de las células y de los parásitos sino, también de obtener una visión holística que ayudara a explicar las diferencias en su comportamiento.



2. Resultados

El estudio transcriptómico de la interacción de *L. infantum* con las células caninas se llevó a cabo empleando la línea celular de macrófagos tumorales DH82, con el objetivo de mejorar la reproductibilidad del ensayo y disminuir la posible variabilidad individual derivada de emplear células primarias de distintos perros donantes.

2.1. Evaluación de la infectividad de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1

En primer lugar, estudiamos si el comportamiento observado durante el objetivo 2 en los Mø primarios caninos se reproducía en la línea celular DH82, analizando la capacidad de infección de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en estas células. La infección se llevó a cabo *in vitro* con promastigotes estacionarios en una ratio 5:1 parásitos-células. El porcentaje, la intensidad y el índice de infección se determinaron a las 4, 24 y 72h PI tal y como se describe en el apartado 3.5. El porcentaje de infección (**Figura 19A**), y el número de amastigotes por célula infectada (**Figura 19B**) resultaron superiores en la cepa BCN150 en comparación con el aislado BOS1FL1, si bien la diferencia en la intensidad a las 72h no resultó significativa.

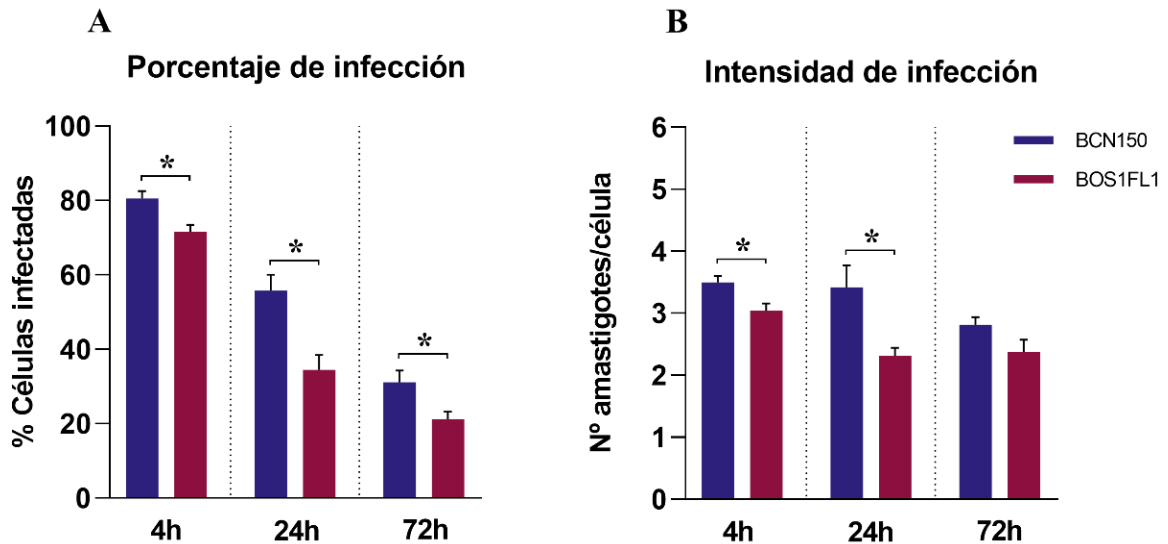


Figura 19. Infectividad de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en células DH82. El porcentaje (A) y la intensidad de infección (B) fueron determinados por microscopía óptica. Las células DH82 se infectaron con promastigotes estacionarios en una ratio 5:1 parásitos-células. El gráfico muestra los resultados obtenidos (media ± SEM) en un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes realizados. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba paramétrica *t de Student*. Los asteriscos (*) indican el nivel de significación (**P* < 0,05, ***P* < 0,01).

En función de ambos parámetros se calculó el índice de infección que, en concordancia con los resultados obtenidos en los Mø caninos primarios, fue significativamente menor en las células infectadas con el aislado BOS1FL1 en todos los tiempos (**Tabla 7**).



Tabla 7. Índice de infección de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en células DH82

Índice de infección	DH82	
	BCN150	BOS1FL1
4h PI	281 ± 6**	217 ± 14
24h PI	187 ± 9**	81 ± 12
72h PI	83 ± 9*	51 ± 4

Las células DH82 se infectaron con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio 5:1 parásitos-células. El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba *t de Student* (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

2.2. Modulación de la expresión génica de las células DH82 tras su infección por *L. infantum*

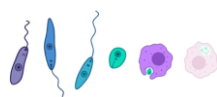
2.2.1. Secuenciación, control de calidad y mapeo frente al genoma del perro

El perfil transcripcional de las células DH28 se estudió tras su infección temprana (4h PI) mediante la técnica de *RNA-seq*. Se analizaron tres condiciones: células infectadas por el aislado BOS1FL1 (BOS), células infectadas por la cepa BCN150 (BCN) y un control de células no infectadas (NI). De cada una de las condiciones se obtuvieron tres réplicas independientes. La secuenciación del RNA dio lugar a un total aproximado de 770 millones de lecturas en las 9 muestras, con entre 80 y 90 millones en cada una de ellas. El porcentaje de mapeo obtenido con el genoma de referencia del perro (*Canis lupus familiaris* version CanFam 3.1) fue, de media, de un 79% en las células infectadas y un 96% en las células control (**Tabla S1**).

La calidad de las lecturas se evaluó en función de los índices Q20/Q30 y el contenido de GC (**Tabla S2**). Todos los análisis realizados con posterioridad se llevaron a cabo teniendo en cuenta, únicamente, las lecturas de alta calidad. La correlación entre las muestras se estudió mediante un análisis PCA y la determinación del coeficiente de correlación R^2 . Los resultados confirmaron la validez de todas las réplicas y revelaron una mayor agrupación entre las muestras infectadas con *L. infantum*. El valor de R^2 , fue muy elevado al comparar todas las condiciones, lo que indicaba una escasa variabilidad entre ellas.

2.2.2. Diferencias en la expresión génica de las células DH82

Los cambios en el perfil transcriptómico de las células DH82 en las distintas condiciones (NI, BCN y BOS), se estudiaron mediante la cuantificación del número de genes diferencialmente expresados (DEG) y la determinación de su Tasa de variación o "*Fold change*" (FC), que se calculó como la relación entre los niveles de expresión de los DEG al comparar dos condiciones. Se consideraron DEG aquellos genes que presentaron un valor FDR (tasa de descubrimientos falsos)



inferior a 0,05. Al calcular el logaritmo en base 2 del FC (Log_2FC) de cada uno de los DEG, los genes que presentaron un valor positivo fueron considerados sobreexpresados y los genes con un valor negativo infraexpresados.

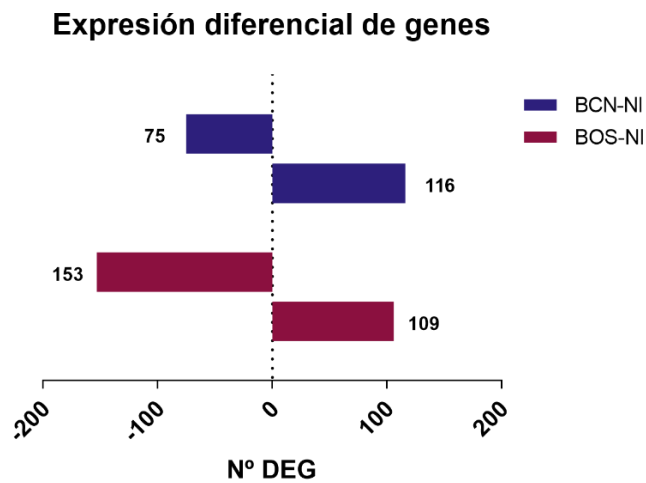


Figura 20. Expresión diferencial de genes en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1. Las células se infectaron con promastigotes de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 en una ratio 5:1 parásitos-células. El número de DEG se calculó al comparar las células infectadas con el grupo control de células no infectadas, teniendo en cuenta aquellos genes con un valor FDR < 0,05. El número de DEG sobreexpresados se representa en los valores positivos. El número de DEG infraexpresados se representa en los valores negativos.

La infección de las células con la cepa BCN150 con respecto al grupo control de células no infectadas (BCN-NI), indujo un total de 191 DEGs, 116 sobreexpresados (Log_2FC entre 0,19 y 1,39) y 75 infraexpresados (Log_2FC entre -0,17 y -0,84) (**Figura 20, Tabla S3**). La infección con BOS1FL1, en comparación con el grupo control (BOS-NI), indujo un total de 262 DEG, 109 sobreexpresados (Log_2FC entre 0,16 y 0,99) y 153 infraexpresados (Log_2FC entre -0,17 y -0,92) (**Figura 20, Tabla S4**). El número de DEG que presentó un valor FC superior a 1,5 fue de 17 genes en BCN-NI y 22 en BOS-NI. Además, entre todos los DEG analizados en ambas comparativas, 136 fueron comunes, 55 resultaron diferencialmente expresados únicamente en las células infectadas con BCN150 y 126 únicamente en las células infectadas con BOS1FL1 (**Figura 21**).

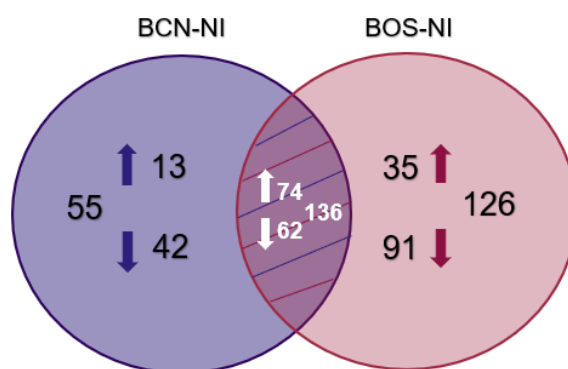


Figura 21. Diagrama de Venn de la expresión diferencial de genes. Representación gráfica de los DEG comunes y específicos en BCN-NI y BOS-NI. Los valores hacen referencia al número DEG totales, sobreexpresados (flecha hacia arriba) e infraexpresados (flecha hacia abajo).



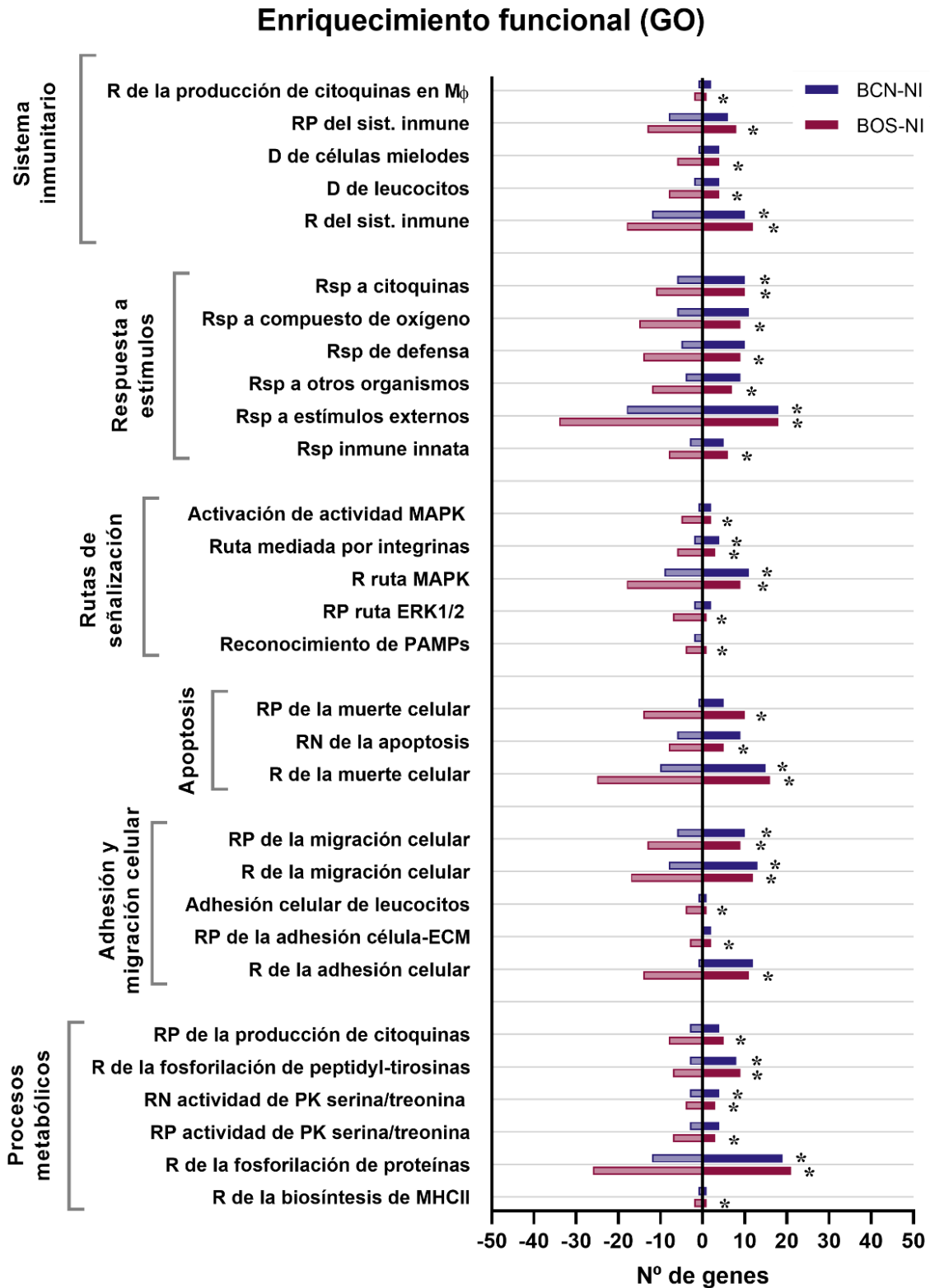
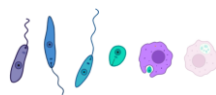


Figura 22. Términos GO enriquecidos en las células DH82 tras su infección por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas. El gráfico muestra una selección de los términos GO más relevantes enriquecidos en BCN-NI y BOS-NI. Las barras representan el número de DEG relacionado con cada término GO, incluyendo en color oscuro los DEG sobreexpresados y en color claro los DEG infraexpresados. Los asteriscos (*) indican los términos GO estadísticamente significativos (FDR < 0,05). R, regulación; RP, regulación positiva, RN, regulación negativa; D, diferenciación; Rsp, respuesta; PK, proteínas quinasa.



2.2.3. Identificación de los procesos y rutas biológicas moduladas en las células tras su infección por *L. infantum*

Con el objetivo de evaluar las implicaciones de las diferencias de expresión génica en las células infectadas con BCN150 y BOS1FL1, identificamos los posibles procesos y rutas biológicas moduladas por los parásitos mediante un análisis de enriquecimiento funcional de los DEG. La ontología génica (GO) es un conjunto de términos o conceptos, relacionados entre sí, que permiten describir los genes y sus productos en función de su relación con tres aspectos: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares (The Gene Ontology, 2019). En relación con los procesos biológicos, en BCN-NI se obtuvieron 118 términos GO enriquecidos estadísticamente significativos que se asociaron en 28 grupos (**Tabla S5**), mientras que en BOS-NI este número fue superior con 326 asociados en 48 grupos (**Tabla S6**). En ambos casos se obtuvieron términos GO relacionados con la respuesta frente a *Leishmania* como la regulación del sistema inmunitario, la respuesta a estímulos, la transducción de señales, la apoptosis, el metabolismo, la adhesión y la migración celular. Los más relevantes se encuentran representados en la figura 22.

Posteriormente, para estudiar si existían diferencias en las rutas biológicas, se compararon los DEG obtenidos con la base de datos KEGG (Kanehisa and Goto, 2000). Con respecto al control de células no infectadas, la infección con la cepa BCN150 dio lugar a 9 rutas enriquecidas estadísticamente significativas (**Tablas S7**). En las células infectadas con BOS1FL1, el número fue mucho mayor, con 39 rutas enriquecidas estadísticamente significativas (**Tablas S8**). En las tablas 8 y 9 se muestran las más interesantes en relación con la posible respuesta frente a la infección por *L. infantum*. En ambos casos se hallaron rutas biológicas relacionadas con la transducción de señales, como la vía de señalización de la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (Akt), PI3K-Akt, y con el sistema inmunitario, como la ruta de señalización de los receptores NLR. Éstas, fueron investigadas con más detalle y los resultados obtenidos se encuentran recogidos en los apartados 2.2.4 y 2.2.5.

Entre las rutas que resultaron estadísticamente significativas solo en BOS-NI, se encontraron algunas relacionadas con el reconocimiento de patógenos, el metabolismo y la interacción entre células, como la ruta de interacción citoquina-receptor. Además, se encontraron múltiples rutas enriquecidas relacionadas con la señalización, como las vías de señalización del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las proteínas de la familia Janus quinasa (JAK) y activadoras de la transcripción (STAT), JAK-STAT, y la vía de señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B). En la **figura 23** se representan gráficamente las diferencias en los niveles de expresión de los genes implicados en las rutas de mayor interés.



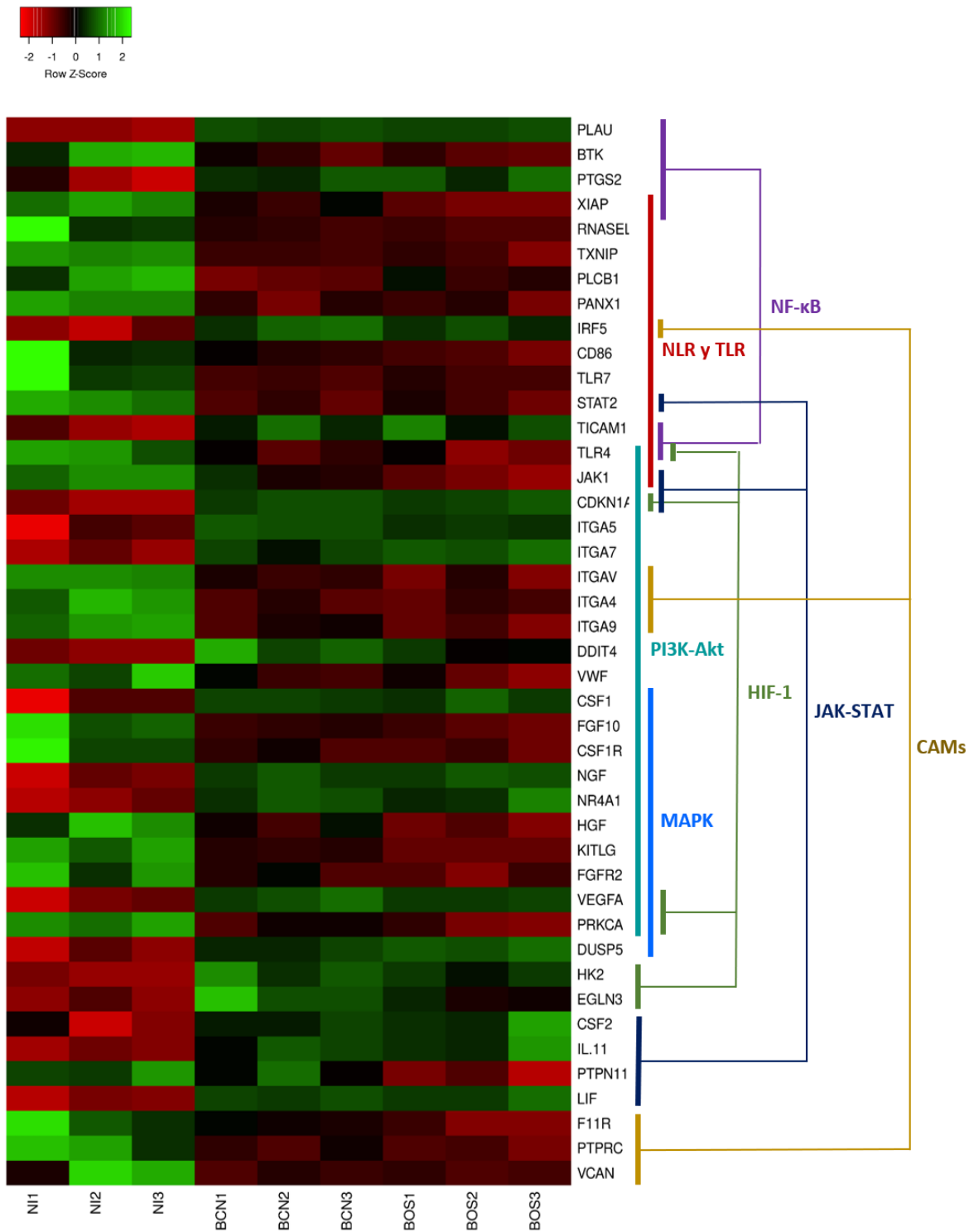


Figura 23. Heatmap o mapa de intensidad de los genes diferencialmente expresados en las células DH82. En la figura se representan gráficamente los niveles de expresión basados en los valores FPKM de una selección de los DEG implicados en las rutas biológicas de mayor interés. Los segmentos localizados a la derecha de la figura representan las rutas biológicas y engloban todos los DEG obtenidos que forman parte de las mismas. El mapa de intensidad se realizó utilizando la herramienta bioinformática Heatmapper ([Http://www2.heatmapper.ca](http://www2.heatmapper.ca)).

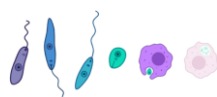


Tabla 8. Rutas biológicas enriquecidas seleccionadas en BCN-NI

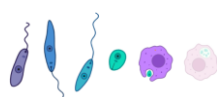
Ruta KEGG	Nº DEG implicados	Nº genes ruta	FDR
PI3K-Akt	12	319	0,0156
VEGF	4	51	0,0216
Receptores NLR	5	129	0,0165
Rap1	9	193	0,0156

Tabla 9. Rutas biológicas enriquecidas seleccionadas en BOS-NI

Ruta KEGG	Nº DEG implicados	Nº genes ruta	FDR
PI3K-Akt	20	319	0,000048
VEGF	5	51	0,0084
HIF-1	6	94	0,0161
TNF	4	99	0,0323
Interacción citoquina-receptor	9	208	0,0174
Receptores NLR	8	129	0,0061
Rap1	11	193	0,0022
Ras	11	212	0,0032
Receptores TLR	5	79	0,0334
JAK-STAT	7	136	0,0207
NF-κB	6	84	0,0109
MAPK	12	273	0,0061
Adhesión focal	12	184	0,00098
Fagosoma	6	125	0,0485
CAMs	8	126	0,0061
Interacción ECM-Receptor	6	76	0,0084

2.2.4. Diferencias en la modulación de la vía de señalización PI3K-Akt

La vía de señalización PI3K-Akt resultó modulada en las células infectadas por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1, siendo la que presentaba un número mayor de DEG implicados. En BCN-NI y BOS-NI se hallaron 8 genes sobreexpresados que fueron comunes (*ITGA5*, *ITGA7*, *NGF*, *CSF1*, *VEGFA*, *NR4A1*, *CDKN1A* y *DDIT4*). Entre los genes infraexpresados implicados, 4 fueron coincidentes (*ITGA4*, *KITLG*, *CSFR1* y *FGF10*) y 8 exclusivos de las células infectadas por el aislado BOS1FL1 (*FGR2*, *HGF*, *PRKCA*, *ITGAV*, *VWF*, *JAK1* y *TLR4*) (**Figura 24**). Al investigar los productos resultantes de estos genes se encontraron, entre otros, diferentes factores de crecimiento, proteínas integrales de membrana, como las integrinas, y receptores de la superficie celular tipo TLR y tirosina-quinasa. La diferente expresión de estos genes podría dar lugar a una modulación diferencial de la actividad de la enzima PI3K y como consecuencia de la activación de la proteína Akt, relacionadas con la supervivencia celular y la respuesta frente a *Leishmania* (Kima, 2016). El gen *DDIT4* (también conocido como *REDD1*) implicado en esta vía, resultó sobreexpresado en



las células infectadas con ambos parásitos y su valor de FC fue el más elevado de entre todos los DEG analizados. Este valor FC, además, fue superior en BCN-NI (FC 2,62) que en BOS-NI (FC 1,99). Este gen codifica una proteína que inhibe el complejo 1 del receptor de la rapamicina (mTOR1) (Foltyn *et al.*, 2019), que desempeña importantes funciones relacionadas con la respuesta inmunitaria y la proliferación y supervivencia celular (Kumar *et al.*, 2018).

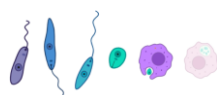
2.2.5. Expresión diferencial de receptores TLR y NLR en las células infectadas

Las células del sistema inmunitario cuentan con receptores indispensables en el reconocimiento de patógenos, como *Leishmania*, como los TLR y NLR (Rossi and Fasel, 2018). En BOS-NI la ruta de señalización de los receptores TLR resultó significativamente modulada con un total de 5 DEG implicados, 2 de ellos sobreexpresados (*TICAM1* y *IRF5*) y 3 infraexpresados (*TLR4*, *TLR7* y *CD86*). A pesar de que esta ruta no se encontró entre las rutas significativamente moduladas en las células infectadas por la cepa BCN150, sí se observó un incremento en la expresión del gen *IRF5* y una disminución del nivel de expresión del gen *TLR7*, con unos valores FC muy similares a los observados en BOS-NI.

La infección con *L. infantum*, también indujo la modulación de la ruta de señalización de los receptores NLR. Los genes *STAT2*, *PANX1*, *TXNIP* y *RNASEL* aparecieron infraexpresados tanto en BCN-NI como en BOS-NI. Los genes *JAK1*, *TLR4* y *XIAP* resultaron infraexpresados sólo en las células infectadas por el aislado BOS1FL1 y el gen *PLCB1*, únicamente en las células infectadas por la cepa BCN150 (**Figura 25**). Los cambios en la expresión de estos genes podrían afectar a la respuesta defensiva de las células, influyendo en la activación de la vía de señalización NF- κ B implicada en la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Reinhard *et al.*, 2012), así como, a la activación del receptor NLRP3 y la formación de los inflamosomas (Harrington and Gurung, 2020).

2.3. Diferencias en la expresión génica de *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 tras la infección de células DH82

Una vez eliminadas las lecturas que se mapearon frente al genoma del perro, las secuencias se alinearon con el genoma de referencia de *L. infantum* JPCM5 (versión ASM287v2. NCBI: GCA_000002875.2). Se obtuvo un total aproximado de 46 millones de lecturas mapeadas en las muestras infectadas, con entre 6,8 y 8,5 millones en cada una de ellas (**Tabla S9**). La calidad de las lecturas se evaluó en función de los índices Q20/Q30 y el contenido de GC. Los resultados se encuentran recogidos en la tabla S10. El estudio de la de correlación entre las muestras de la misma condición, permitió su aceptación como réplicas biológicas y al igual que en el caso de las lecturas mapeadas frente al genoma del perro, el valor del coeficiente R^2 fue muy elevado al comparar todas las condiciones.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron 8.300 genes de *L. infantum*, 8.270 comunes, 18 exclusivamente expresados en el aislado BOS1FL1 y 12 en la cepa BCN150. Los genes que no fueron comunes codificaban en su mayoría, distintas moléculas de RNA de transferencia (tRNA) y proteínas hipotéticas de función desconocida.

Al comparar la expresión génica de los parásitos, únicamente 23 genes presentaron un valor FDR inferior a 0,05 y, por tanto, pudieron ser considerados como DEG. En BCN150 se hallaron 15 DEG sobrepresados con un valor Log_2FC que oscilaba entre 0,13 y 0,58. Al profundizar en su estudio, se encontraron, entre otros, genes relacionados con el metabolismo energético (*ATPF1A*, metalopeptidasa *M49*), el transporte intracelular (*MVP*), el ciclo celular y la transcripción (*HSP83*, fosfoproteína fosfatasa, *SMC*, *CPSF-A*). En BOS1FL1 se hallaron 8 genes sobrepresados (infraexpresados en BCN150) con un valor Log_2FC que oscilaba entre -0,17 y -0,40. En este caso los genes estaban implicados en la síntesis de las proteínas ribosomales 40S, 60S y las histonas H1, H2A y H4 (**Tabla S11**).

El análisis del enriquecimiento funcional de los DEG se llevó a cabo utilizando la base de datos TriTrypDB. En el caso de BOS1FL1 no se hallaron rutas biológicas significativamente enriquecidas y en BCN150 únicamente resultó estadísticamente significativa la ruta metabólica correspondiente a la biosíntesis del ATP (PWY-7980).



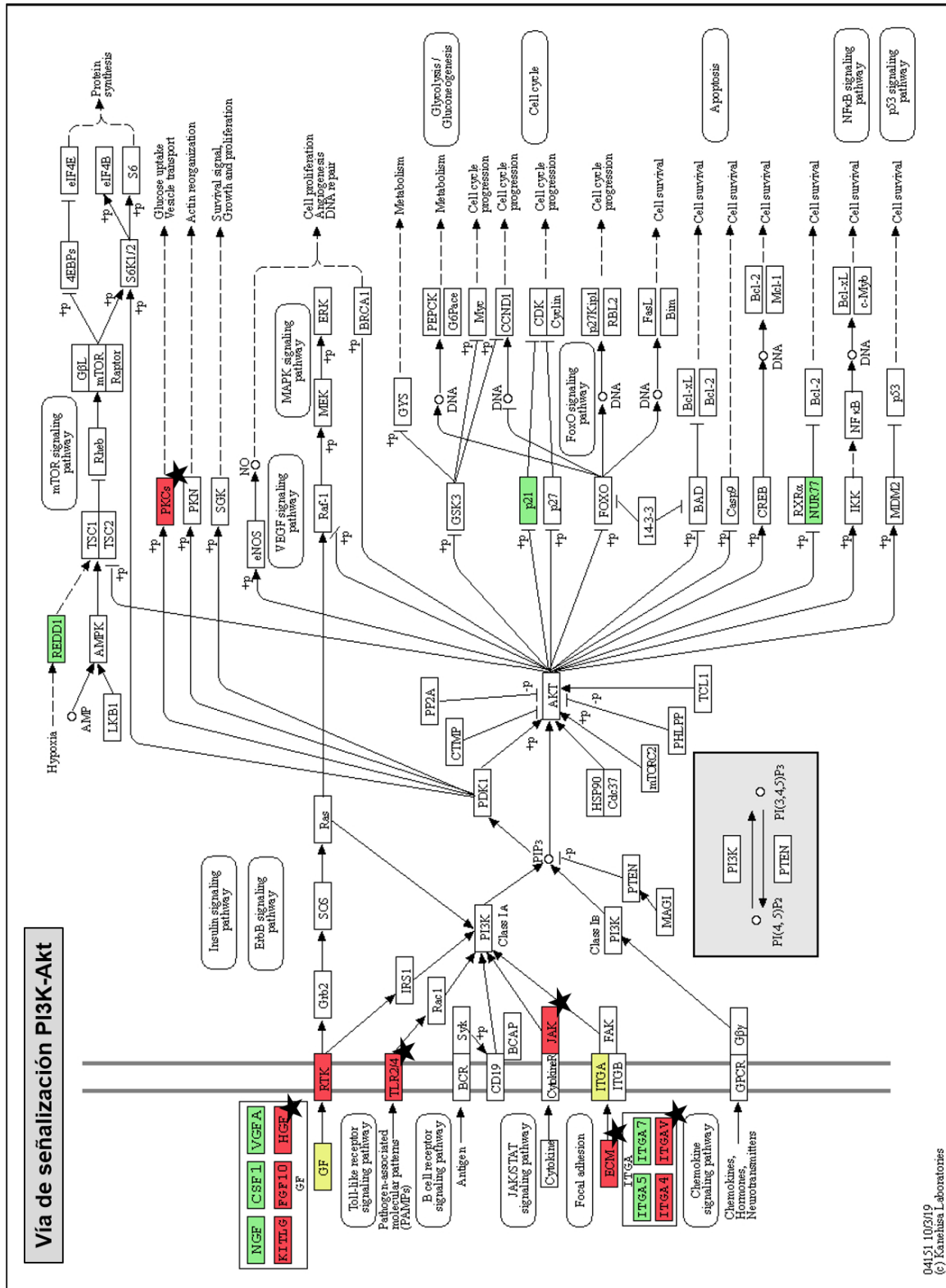
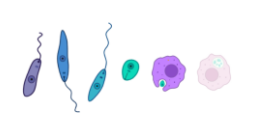


Figura 24. Representación esquemática de los genes implicados en la vía de señalización PI3K-Akt. Los DEG hallados en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 con respecto al grupo control de células no infectadas aparecen resaltados en color verde (genes sobrexpresados), rojo (genes infraexpresados) o amarillo (genes sobrexpresados e infraexpresados). Las estrellas de color negro indican los DEG hallados únicamente en las células infectadas por el aislado BOS1FL1.



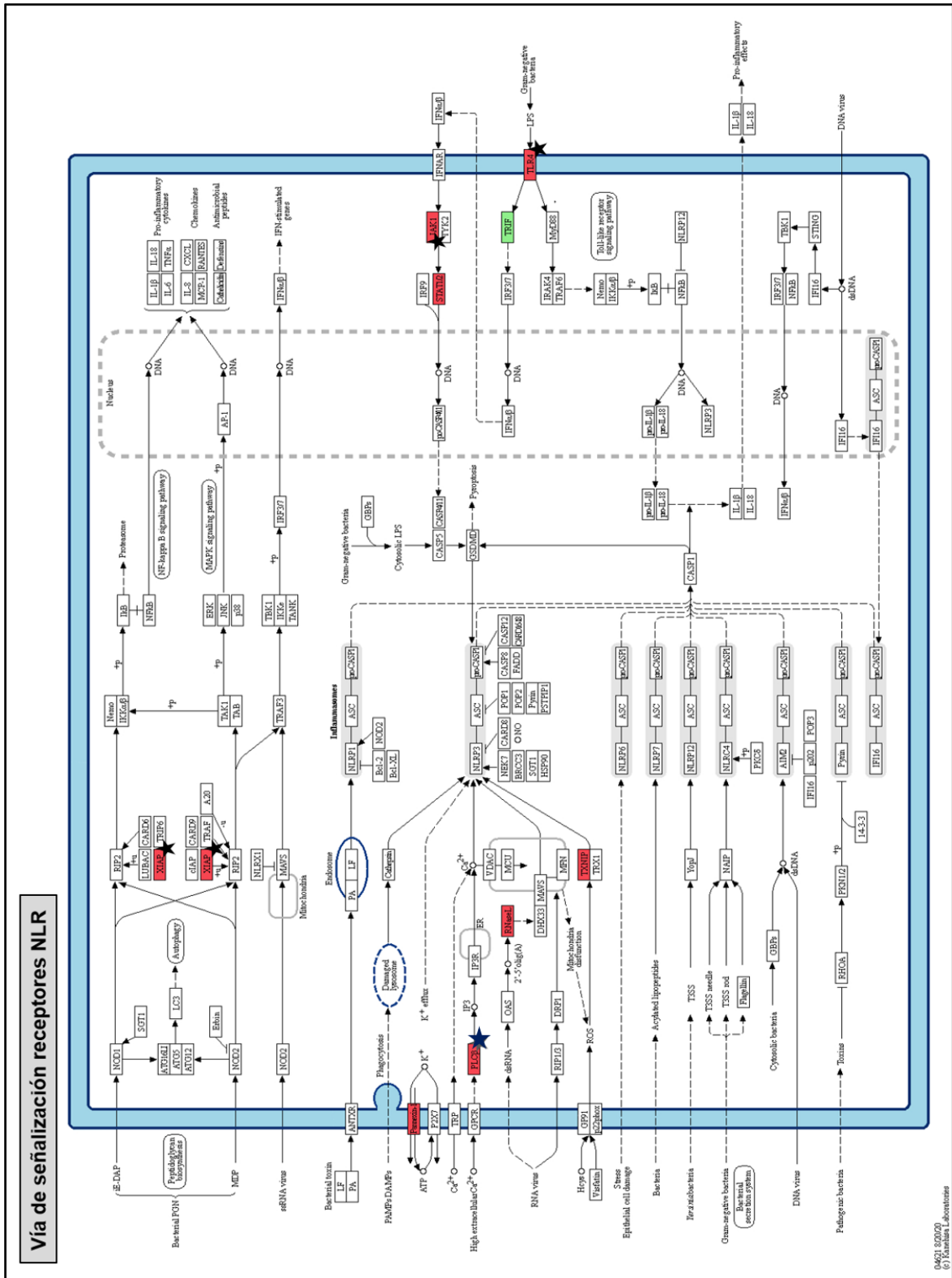


Figura 25. Representación esquemática de los genes implicados en la vía de señalización de los receptores NLR. Los DEG hallados en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 con respecto al grupo control de células no infectadas aparecen resaltados en color verde (genes sobrexpresados) o rojo (genes infraexpresados). Las estrellas de color negro y azul indican los DEG hallados únicamente en las células infectadas por el aislado BOS1FL1 o la cepa BCN150, respectivamente.



3. Discusión

Las herramientas de secuenciación masiva del RNA, permiten analizar de manera simultánea los perfiles de expresión génica desencadenados en parásitos y hospedadores tras su interacción (Westermann *et al.*, 2012). Por ello, en los últimos años se han empleado para investigar los cambios transcripcionales inducidos por la infección con diferentes especies de *Leishmania* en células de distintos orígenes (Cruz and Freitas-Castro, 2019). Estos estudios han contribuido al conocimiento de los mecanismos empleados por el protozoo para evadir y modular la respuesta inmunitaria del hospedador (Dillon *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016).

El aislado de *L. infantum* BOS1FL1, procedente del brote de leishmaniosis humana de la Comunidad de Madrid, exhibió una diferente capacidad de infección según la especie hospedadora al compararlo con la cepa BCN150. En el modelo murino de VL este aislado presentó una mayor virulencia en términos de diseminación en órganos diana y modulación de la respuesta defensiva de los hospedadores (objetivo 1). Por el contrario, al infectar Mon y Mø primarios caninos, fue la cepa BCN150 la que presentó una mayor capacidad de infección (objetivo 2). Para profundizar en este cambio de comportamiento de los parásitos en la especie canina, analizamos el perfil transcriptómico desencadenado tras la infección de macrófagos tumorales caninos DH82 por BCN150 y BOS1FL1. El estudio se llevó a cabo empleando esta línea celular, en lugar de células derivadas de sangre periférica, con el objetivo de minimizar la diversidad biológica entre las distintas condiciones (Williams *et al.*, 2014; Hekman *et al.*, 2015).

En primer lugar, se investigó si el comportamiento que se había observado en los Mon y Mø caninos primarios, se mantenía en las células DH82. La capacidad de infección de los parásitos se cuantificó a las 4, 24 y 72h PI, observándose la misma tendencia hallada previamente. La cepa BCN150 presentó una mayor infectividad que el aislado BOS1FL1 en términos de porcentaje, intensidad e índice de infección en todos los tiempos. Posteriormente, se evaluó el perfil de regulación génica inducido por ambos parásitos en las células. El análisis transcriptómico se llevó a cabo a las 4h PI, basándonos en estudios precedentes realizados con macrófagos murinos y humanos, que habían hallado una mayor respuesta de las células a la infección por *Leishmania* en este tiempo, con una disminución gradual de la misma hasta las 72h PI. Además, a las 4h PI fue cuando las células DH82 presentaron un mayor porcentaje de infección con ambos parásitos.

Las técnicas de RNAseq se han utilizado con anterioridad para evaluar los posibles mecanismos implicados en la virulencia de *Leishmania*. Aunque no hay muchos trabajos, existe heterogeneidad en cuanto a los resultados obtenidos. Shadab y colaboradores hallaron importantes diferencias en la expresión génica de Mø peritoneales murinos al infectarlos con promastigotes de *L. donovani* con distinto fenotipo de virulencia (Shadab *et al.*, 2019). Nuestros resultados se encuentran en discordancia con los observados en este estudio, ya que, a pesar de que se obtuvo un porcentaje de infección próximo al 80%, la infección de las células DH82 por BCN150 y BOS1FL1 indujo una escasa regulación de su perfil de expresión génica, hallándose un número relativamente bajo de DEG al compararlas con el grupo control de células no



infectadas, que además presentaban un valor FC inferior a 1,5 en la mayoría de los casos. Estos resultados, también, se contraponían con los obtenidos en otros estudios en los que la infección de Mø primarios murinos y humanos con *L. major* y *L. amazonensis*, desencadenó importantes cambios en el perfil transcripcional de las células (Dillon *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016).

Sin embargo, un estudio realizado por Andreu y colaboradores en 2017 comparó la expresión diferencial de la línea celular de macrófagos murinos J774 con Mø derivados de médula ósea de la misma especie al infectarlos con *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados revelaron grandes diferencias en la respuesta de ambos tipos celulares a la infección, siendo muy superior en las células primarias. Los autores plantearon la hipótesis de que el origen tumoral de las células J774 pudiera influir en su estado de activación favoreciendo una menor respuesta frente a la infección (Andreu *et al.*, 2017). No obstante, las líneas celulares tumorales han sido previamente utilizadas en estudios de RNAseq. Más concretamente, las células DH82 se han empleado con anterioridad para estudiar su interacción con el virus del moquillo canino encontrándose importantes variaciones en su expresión génica (Zheng *et al.*, 2020), aunque su uso con *Leishmania* no se había descrito hasta el momento. En el caso de *L. infantum*, un ensayo llevado a cabo en el año 2020 utilizó la línea celular de monocitos humanos THP-1, para analizar la activación del inflamosoma. En línea con nuestros resultados, los autores describieron un perfil transcripcional muy similar en las células infectadas y las células no estimuladas. El número de DEG también resultó relativamente bajo y sus valores de FC fueron inferiores a 1,5 en la mayoría de los casos (Gatto *et al.*, 2020). La escasa regulación inducida en el perfil transcripcional de las células DH82 infectadas por BCN150 y BOS1FL1 podría, por tanto, estar relacionada con su naturaleza tumoral, pero también con una posible entrada silente del parásito en las mismas, evadiendo así su respuesta defensiva. Estos datos apoyan la hipótesis de que no solo el patógeno, sino el origen y el tipo celular en el que se realiza el estudio, condicionan los resultados obtenidos, dificultando su interpretación y aportando más complejidad al proceso de interacción entre patógenos y células hospedadoras.

A pesar de que nuestros resultados revelaron que la infección de las células DH82 no inducía una modificación sustancial de su perfil transcriptómico, sí encontraron algunas diferencias en la modulación ejercida por ambos parásitos. En BCN-NI y BOS-NI se obtuvieron, respectivamente, 191 y 262 DEG estadísticamente significativos, haciéndose necesario estudiar su posible implicación biológica en la respuesta de las células frente a la infección. Para ello, se llevó a cabo un análisis del enriquecimiento funcional de los DEG en cada una de las condiciones. La infección con BOS1FL1 fue la que ejerció una mayor modulación de la expresión génica de las células con respecto al grupo control. Esto se tradujo en un mayor número de términos GO enriquecidos estadísticamente significativos, entre los cuales se encontraron términos relacionados con la regulación del sistema inmunitario. Por el contrario, la cepa BCN150 indujo un número considerablemente menor de términos GO enriquecidos estadísticamente significativos. Estas diferencias podrían apuntar a la existencia de una modulación específica de la expresión génica de las células inducida por cada uno de los parásitos.



El análisis de las rutas biológicas implicadas en la expresión diferencial de las células infectadas se llevó a cabo comparando los DEG con la base de datos KEGG. Entre las rutas biológicas más afectadas, se encontró la vía de señalización PI3K-Akt, que puede jugar un papel importante en la respuesta del hospedador frente a la infección con *Leishmania* (Kima, 2016). La actividad de la enzima PI3K se ha relacionado con el progreso de la leishmaniosis al modular la capacidad de fagocitosis de los macrófagos y la secreción de citoquinas antiinflamatorias (Cummings *et al.*, 2012; Oghumu and Satoskar, 2013). Además, existen estudios que describen que la activación de la vía PI3K/Akt tras la infección por *L. amazonensis* puede inducir una disminución de la expresión de la enzima iNOS y, por tanto, de la producción NO (Calegari-Silva *et al.*, 2015). Los DEG hallados en BCN-NI y BOS-NI implicados en esta ruta estaban relacionados con diferentes factores de crecimiento, integrinas y receptores de tipo tirosina quinasa. En ambos casos se encontraron genes tanto sobreexpresados como infraexpresados, la mayoría de los cuales fueron comunes. Sin embargo, en el caso de las células infectadas con el aislado BOS1FL1 el número de genes infraexpresados fue mayor. Estos factores de crecimiento, integrinas y receptores tirosina-quinasa conducen a la activación de la enzima PI3K (Shi *et al.*, 2019), con lo que su menor expresión en las células infectadas con BOS1FL1 podría estar relacionada con la menor capacidad infectiva observada en este aislado. El gen *DDIT4*, también implicado en esta ruta, apareció sobreexpresado en BCN-NI y BOS-NI con el mayor valor de FC de entre todos los genes analizados, siendo superior en las células infectadas con BCN150. Este gen codifica la síntesis de una proteína inhibidora del complejo mTOR1 (Foltyn *et al.*, 2019). Algunos autores describen que *Leishmania* es capaz de inhibir este complejo y activar de forma concomitante la proteína 1 de unión al factor de inicio de la traducción 4E (4E-BP1), lo que favorece su proliferación y supervivencia en el fagosoma (Jaramillo *et al.*, 2011). La mayor expresión del gen *DDIT4* inducida en las células DH82 por la infección con la cepa BCN150 podría dar lugar a una mayor inhibición del complejo mTOR, promoviendo su supervivencia intracelular. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan investigar su papel en la diferente respuesta de las células DH82 a la infección. Estos resultados abren la puerta a nuevas investigaciones acerca de la capacidad de *Leishmania* para modular la vía de señalización PI3K/Akt en las células hospedadoras y su posible implicación en los mecanismos de virulencia del parásito.

Los receptores TLR y NLR tienen un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Está ampliamente descrito que pueden ejercer una función defensiva frente a la infección con *Leishmania* (Faria *et al.*, 2012), contribuyendo a la producción de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos (Kawai and Akira, 2011). De hecho, existen estudios que han demostrado que la activación del receptor TLR4 contribuye al control de la infección con *L. major* en ratones (Kropf *et al.*, 2004). Sin embargo, en el caso de los cánidos, la función que desempeña este receptor no está clara, habiéndose observado tanto un aumento como una disminución de sus niveles de expresión en distintos órganos y tejidos de animales infectados por *L. infantum* (Melo *et al.*, 2014; Hosein *et al.*, 2015). La información acerca del papel que juega el receptor TLR7 en la leishmaniosis, también, es escasa, pero el uso de agonistas del



mismo se ha relacionado con la protección frente a la infección (Reynolds *et al.*, 2013; Craft *et al.*, 2014). En las células DH82, el gen *TLR7* apareció infraexpresado tanto en las células infectadas por el aislado BOS1FL1 como por la cepa BCN150, mientras que el gen *TLR4* resultó infraexpresado únicamente tras la infección por BOS1FL1. En este contexto, es necesario profundizar en el conocimiento de las funciones de estos receptores en el establecimiento de la infección por diferentes cepas o aislados de *L. infantum* en los cánidos.

El receptor NLRP3, perteneciente a la familia NLR, influye directamente en la activación de los inflamomas y junto con la activación de la vía NF- κ B, conduce a la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Harrington and Gurung, 2020). La infección de las células DH82 con BCN150 y BOS1FL1 dio lugar a una disminución de los niveles de expresión de distintos genes relacionados con la activación de este receptor y la vía de señalización NF- κ B, como los genes *PANX1*, *TXNIP*, *RNASEL*, *TLR4*, *XIAP* y *PLCB1* (Zhou *et al.*, 2010; Murakami *et al.*, 2012; Chakrabarti *et al.*, 2015; Crespo Yanguas *et al.*, 2017; Vucic, 2018). Coincidiendo con nuestros resultados, algunos autores sugieren que *Leishmania* es capaz de modular la respuesta defensiva del hospedador, inhibiendo la activación del receptor NLRP3 para garantizar su supervivencia (Shio *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2017; Saresella *et al.*, 2020).

Finalmente, se comparó la expresión génica de los parásitos tras su interacción con las células DH82. El éxito de *Leishmania* para establecer la infección en los hospedadores mamíferos, depende de su capacidad para diferenciarse en amastigotes y sobrevivir en el fagosoma de las células infectadas (Hombach and Clos, 2014). Entre los genes sobreexpresados en BCN150, se halló el gen que codifica la síntesis de la proteína de choque térmico HSP83 que constituye la forma citoplasmática de la proteína HSP90, relacionada con la señalización de los parásitos y su diferenciación en amastigotes (Requena *et al.*, 2015). Por el contrario, en el aislado BOS1FL1 se observó una sobreexpresión del gen que codifica la histona H1 que se ha relacionado con una menor capacidad de diferenciación de los promastigotes en amastigotes y una disminución de la infectividad de los parásitos *in vitro* e *in vivo* (Alexandratos *et al.*, 2013). Estos datos apuntan nuevamente, a la posibilidad de que el comportamiento diferencial observado en ambos parásitos se deba al efecto sumatorio de múltiples factores implicados en la interacción parásito-hospedador.

En su conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de diferencias en el perfil transcripcional desarrollado tras la infección de las células DH82 por *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1. Estas diferencias, aunque sutiles, podrían contribuir a la menor capacidad de BOS1FL1 de infectar y multiplicarse en este tipo celular. Esta tesis doctoral es tan solo el punto de partida en un proyecto más amplio que persigue llegar a discernir con precisión cuál es el verdadero papel de la adaptación y coevolución de distintos aislados de *L. infantum* en su virulencia y en el proceso patogénico que resulta de la interacción de este protozoo con sus diferentes hospedadores.



6

CONCLUSIONES 

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

PRIMERA. Los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7 exhiben una mayor virulencia que la cepa BCN150 en el modelo murino experimental de leishmaniosis visceral, en términos de carga parasitaria en órgano diana, modulación de la respuesta defensiva de los hospedadores y alteraciones histopatológicas en el hígado de los animales infectados. Esto podría relacionarse con una mayor capacidad de estos aislados para establecer la infección, incluso en individuos inmunocompetentes.

SEGUNDA. Los aislados de *L. infantum* BOS1FL1 y POL2FL7 muestran diferencias en su perfil de virulencia en el modelo murino experimental de VL. BOS1FL1 presenta un fenotipo más agresivo que POL2FL7, que se refleja en su mayor capacidad metastásica y su mayor modulación de la respuesta inmunitaria en los animales, favoreciendo la susceptibilidad frente a la infección.

TERCERA. Existe un comportamiento diferencial del aislado BOS1FL1 en función de la especie hospedadora que se refleja en su menor infectividad, en comparación con la cepa BCN150, tras la infección de células de origen canino. Este cambio de comportamiento podría estar relacionado con un tropismo diferencial de los aislados del brote de la Comunidad de Madrid por especies hospedadoras alternativas, como liebres y conejos.

CUARTA. El desarrollo de la respuesta oxidativa como mecanismo de defensa en los monocitos y macrófagos primarios caninos frente a la infección por *L. infantum* depende de la producción de ROS. El aislado BOS1FL1 presenta una mayor capacidad de resistencia que la cepa BCN150 al efecto de ROS, lo que sin embargo no supone una ventaja en su interacción con estas células, sugiriendo la existencia de otros factores que condicionen su comportamiento intracelular.

QUINTA. La interacción de células DH82 con *L. infantum* induce una escasa modificación del perfil transcripcional tanto de las células como de los parásitos, lo que se refleja en el bajo número de genes diferencialmente expresados observados. Esto podría estar relacionado tanto con el origen tumoral de las células DH82, que podría limitar la respuesta producida en las células primarias, como con la posible entrada silente del parásito en las mismas, evitando así desencadenar su respuesta defensiva.

SEXTA. Las diferencias observadas en el análisis transcriptómico de las células DH82 infectadas con BCN150 y BOS1FL1 apuntan a la existencia de una modulación específica inducida por cada uno de los parásitos. Esto podría relacionarse con su diferente comportamiento intracelular e influir en el posterior desencadenamiento de la inmunopatogénesis de la leishmaniosis.



CONCLUSIONS

The most relevant conclusions of the work presented in this Doctoral Thesis are summarised below:

FIRST. *L. infantum* isolates BOS1FL1 and POL2FL7 exhibit a higher virulence profile than the strain BCN150 in the experimental murine model of VL, in terms of parasite load in target organ, modulation of host defence response and histopathological alterations in the liver of infected animals. This could be related to an increased ability of these isolates to establish infection, even in immunocompetent individuals.

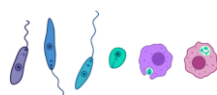
SECOND. *L. infantum* isolates BOS1FL1 and POL2FL7 show differences in their virulence profile in the experimental murine model of VL. BOS1FL1 presents a more aggressive phenotype than POL2FL7, which is reflected in its greater metastatic capacity and in the modulation of the host immune response, promoting susceptibility to infection.

THIRD. There is a differential behaviour of BOS1FL1 isolate depending on the host species that is reflected in its lower infectivity, compared to BCN150, after infection of canine cells. This behavioural change could be related to a differential tropism of the isolates from the leishmaniosis outbreak of Madrid for alternative host species, such as hares and rabbits.

FOURTH. The development of the oxidative burst as a defence mechanism in primary canine monocytes and macrophages against *L. infantum* infection depends on the production of ROS. BOS1FL1 is more resistant than BCN150 to the effect of ROS, which, however, does not represent an advantage in its interaction with these cells, suggesting the existence of other factors that influence its intracellular behaviour.

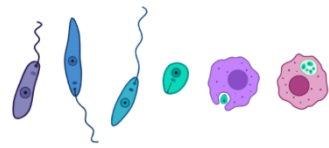
FIFTH. The interaction of DH82 cells with *L. infantum* induces little modification of the transcriptional profile of both cells and parasites, which is reflected in the low number of differentially expressed genes observed. This could be related both to the tumour origin of DH82 cells, that could limit the response produced in primary cells, and to the possible silent entry of the parasite into the cells, avoiding the activation of their defensive response.

SIXTH. The differences observed in the transcriptomic analysis of DH82 cells infected with BCN150 and BOS1FL1 suggest the existence of a specific modulation induced by each parasite. This could be related to their different intracellular behaviour and subsequent involvement in triggering leishmanial immunopathogenesis.



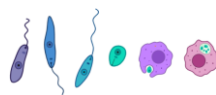
7

BIBLIOGRAFÍA

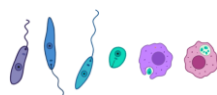


BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, A. Y. M., Dewan, A., Shogib, M. R. I., Rahman, M. M. and Hossain, M. F. (2017). "Environmental factors associated with the distribution of visceral leishmaniasis in endemic areas of Bangladesh: modeling the ecological niche." Trop Med Health **45**: 13.
- Acosta-Soto, L., Encinas, E. S., Deschutter, E. J., Pasetto, R. A., Petri-de-Odrizola, E. M., Bornay-Llinares, F. J. and Ramos-Rincon, J. M. (2020). "Autochthonous Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Corrientes Province, Argentina." Am J Trop Med Hyg **102**(3): 593-597.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votycka, J., Marty, P., Delaunay, P. and Sereno, D. (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies." PLoS Negl Trop Dis **10**(3): e0004349.
- Al-Salem, W. S., Pigott, D. M., Subramaniam, K., Haines, L. R., Kelly-Hope, L., Molyneux, D. H., Hay, S. I. and Acosta-Serrano, A. (2016). "Cutaneous Leishmaniasis and Conflict in Syria." Emerg Infect Dis **22**(5): 931-933.
- Alexander, J. and Bryson, K. (2005). "T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm." Immunol Lett **99**(1): 17-23.
- Alexandratos, A., Clos, J., Samiotaki, M., Efstathiou, A., Panayotou, G., Soteriadou, K. and Smirlis, D. (2013). "The loss of virulence of histone H1 overexpressing *Leishmania donovani* parasites is directly associated with a reduction of HSP83 rate of translation." Mol Microbiol **88**(5): 1015-1031.
- Almeida, B. F. M., Silva, K. L. O., Venturin, G. L., Chiku, V. M., Leal, A. A. C., Bosco, A. M., Ciarlini, P. C. and Lima, V. M. F. (2017). "Induction of haem oxygenase-1 increases infection of dog macrophages by *L. infantum*." Parasite Immunol **39**(12).
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. (2004). "Canine leishmaniasis." Adv Parasitol **57**: 1-88.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. and Team, W. H. O. L. C. (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.
- Alves, C. R., Souza, R. S., Charret, K. D. S., Cortes, L. M. C., Sa-Silva, M. P., Barral-Veloso, L., Oliveira, L. F. G. and da Silva, F. S. (2018). "Understanding serine proteases implications on *Leishmania* spp lifecycle." Exp Parasitol **184**: 67-81.
- Anders, S. and Huber, W. (2010). "Differential expression analysis for sequence count data." Genome Biol **11**(10): R106.



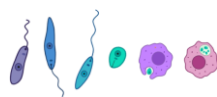
- Andrade, B. B., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A. and Barral-Netto, M. (2007). "Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights." Scand J Immunol **66**(2-3): 122-127.
- Andreu, N., Phelan, J., de Sessions, P. F., Cliff, J. M., Clark, T. G. and Hibberd, M. L. (2017). "Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with Mycobacterium tuberculosis." Sci Rep **7**: 42225.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. and Volf, P. (2013). "The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region." Euro Surveill **18**(30): 20540.
- Anversa, L., Tiburcio, M. G. S., Richini-Pereira, V. B. and Ramirez, L. E. (2018). "Human leishmaniasis in Brazil: A general review." Rev Assoc Med Bras (1992) **64**(3): 281-289.
- Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Muller, K. E., Nerland, A. H. and Floeter-Winter, L. M. (2017). "RNA-seq transcriptional profiling of Leishmania amazonensis reveals an arginase-dependent gene expression regulation." PLoS Negl Trop Dis **11**(10): e0006026.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., Garcia, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martinez, A. M., Perez, A. M., Aranguéz, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J. and Vilas, F. (2013). "Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012." Euro Surveill **18**(30): 20546.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. and Sherlock, G. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet **25**(1): 25-29.
- Ashford, R. W. (1996). "Leishmaniasis reservoirs and their significance in control." Clin Dermatol **14**(5): 523-532.
- Ashour, D. S. (2015). "Toll-like receptor signaling in parasitic infections." Expert Rev Clin Immunol **11**(6): 771-780.
- Asilian, A., Sharif, A., Faghihi, G., Enshaeieh, S., Shariati, F. and Siadat, A. H. (2004). "Evaluation of CO laser efficacy in the treatment of cutaneous leishmaniasis." Int J Dermatol **43**(10): 736-738.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M. J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Logan, F. J., Miller, J. A., Mitra, S., Myler, P. J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D. F., Ramasamy, G., Rogers, M. B., Roos, D. S., Ross, C., Sivam, D., Smith, D. F.,



- Srinivasamoorthy, G., Stoeckert, C. J., Jr., Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G. and Wang, H. (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D457-462.
- Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H. and Walochnik, J. (2008). "Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change." Wien Klin Wochenschr **120**(19-20 Suppl 4): 24-29.
- Azami-Conesa, I., Martínez-Díaz, R. A., González, F. and Gómez-Munoz, M. T. (2020). "First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe." Res Vet Sci **132**: 172-176.
- Badirzadeh, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Abdossamadi, Z., Heidari-Kharaji, M., Gholami, E., Sedaghat, B., Niyayati, M. and Rafati, S. (2017). "Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites." PLoS Negl Trop Dis **11**(7): e0005774.
- Bakker, B. M., Mensonides, F. I., Teusink, B., van Hoek, P., Michels, P. A. and Westerhoff, H. V. (2000). "Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2087-2092.
- Barkati, S., Ndao, M. and Libman, M. (2019). "Cutaneous leishmaniasis in the 21st century: from the laboratory to the bedside." Curr Opin Infect Dis **32**(5): 419-425.
- Barrett, M. P. and Croft, S. L. (2012). "Management of trypanosomiasis and leishmaniasis." Br Med Bull **104**: 175-196.
- Bates, P. A. (1994). "The developmental biology of *Leishmania* promastigotes." Exp Parasitol **79**(2): 215-218.
- Bates, P. A. and Rogers, M. E. (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*." Curr Mol Med **4**(6): 601-609.
- Baylis, M. (2017). "Potential impact of climate change on emerging vector-borne and other infections in the UK." Environ Health **16**(Suppl 1): 112.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. and Sacks, D. L. (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-507.
- Benjamini, Y. H., Y. (1995). "Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing." Journal of the Royal Statistical Society **57**: 289-300.
- Berman, J. D. and Neva, F. A. (1981). "Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages in vitro." Am J Trop Med Hyg **30**(2): 318-321.
- Bern, C., Maguire, J. H. and Alvar, J. (2008). "Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **2**(10): e313.



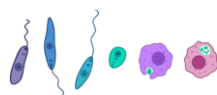
- Bhattacharya, S. K. and Dash, A. P. (2017). "Elimination of Kala-Azar from the Southeast Asia Region." Am J Trop Med Hyg **96**(4): 802-804.
- Bhattarai, N. R., Van der Auwera, G., Rijal, S., Picado, A., Speybroeck, N., Khanal, B., De Doncker, S., Das, M. L., Ostyn, B., Davies, C., Coosemans, M., Berkvens, D., Boelaert, M. and Dujardin, J. C. (2010). "Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal." Emerg Infect Dis **16**(2): 231-237.
- Bifeld, E. and Clos, J. (2015). "The genetics of Leishmania virulence." Med Microbiol Immunol **204**(6): 619-634.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. A. and Olivier, M. (1999). "Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation." Eur J Immunol **29**(11): 3737-3744.
- Boechat, V. C., Pereira, S. A., Junior, A., Dos Santos, S. A., Miranda, L. F. C., Figueiredo, F. B., Ferreira, L. C., de Carvalho Rodrigues, F. D. C., de Oliveira, R. V. C., de-Freitas, R. T., Bruno, R. V., Morgado, F. N. and Menezes, R. C. (2020). "Frequency, active infection and load of Leishmania infantum and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs." PLoS One **15**(9): e0238188.
- Boelaert, M., Burza, S., Romero, G. (2018). Control and Public Health Aspects. The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. F. Bruschi, Gradoni, L., Springer International Publishing.
- Bogdan, C. (2012). "Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis." Front Cell Infect Microbiol **2**: 69.
- Boggiatto, P. M., Gibson-Corley, K. N., Metz, K., Gallup, J. M., Hostetter, J. M., Mullin, K. and Petersen, C. A. (2011). "Transplacental transmission of Leishmania infantum as a means for continued disease incidence in North America." PLoS Negl Trop Dis **5**(4): e1019.
- Boggiatto, P. M., Ramer-Tait, A. E., Metz, K., Kramer, E. E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J. M., Gallup, J. M., Jones, D. E. and Petersen, C. A. (2010). "Immunologic indicators of clinical progression during canine Leishmania infantum infection." Clin Vaccine Immunol **17**(2): 267-273.
- Boite, M. C., Spath, G. F., Bussotti, G., Porrozzzi, R., Morgado, F. N., Llewellyn, M., Schwabl, P. and Cupolillo, E. (2019). "Trans-Atlantic Spill Over: Deconstructing the Ecological Adaptation of Leishmania infantum in the Americas." Genes (Basel) **11**(1).
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brodskyn, C., Beverley, S. M. and Titus, R. G. (2000). "Virulent or avirulent (dhfr-ts-) Leishmania major elicit predominantly a type-1 cytokine response by human cells in vitro." Clin Exp Immunol **119**(2): 299-304.



- Buckling, A. (2007). "Epidemiology. Keep it local." Science **315**(5816): 1227-1228.
- Buffet, P. A., Sulahian, A., Garin, Y. J., Nassar, N. and Derouin, F. (1995). "Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice." Antimicrob Agents Chemother **39**(9): 2167-2168.
- Buitrago, R., Cupolillo, E., Bastrenta, B., Le Pont, F., Martinez, E., Barnabe, C. and Breniere, S. F. (2011). "PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia." Infect Genet Evol **11**(3): 557-563.
- Bunn, P. T., Montes de Oca, M., de Labastida Rivera, F., Kumar, R., Ng, S. S., Edwards, C. L., Faleiro, R. J., Sheel, M., Amante, F. H., Frame, T. C. M., Muller, W., Haque, A., Uzonna, J. E., Hill, G. R. and Engwerda, C. R. (2018). "Distinct Roles for CD4(+) Foxp3(+) Regulatory T Cells and IL-10-Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*." J Immunol **201**(11): 3362-3372.
- Calegari-Silva, T. C., Vivarini, A. C., Miqueline, M., Dos Santos, G. R., Teixeira, K. L., Saliba, A. M., Nunes de Carvalho, S., de Carvalho, L. and Lopes, U. G. (2015). "The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF-kappaB p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway." Open Biol **5**(9): 150118.
- Campino, L., Maia, C. (2018). The Role of Reservoirs: Canine Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmania Parasites. A. Ponte-Sucre, Padrón-Nieves, M., Springer International Publishing.
- Campos, T. M., Costa, R., Passos, S. and Carvalho, L. P. (2017). "Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **112**(11): 733-740.
- Carneiro, P. P., Conceicao, J., Macedo, M., Magalhaes, V., Carvalho, E. M. and Bacellar, O. (2016). "The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis." PLoS One **11**(2): e0148084.
- Carrion, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D. R., Requena, J. M. and Alonso, C. (2006). "Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice." Parasite Immunol **28**(5): 173-183.
- Casadevall, A., Fang, F. C. and Pirofski, L. A. (2011). "Microbial virulence as an emergent property: consequences and opportunities." PLoS Pathog **7**(7): e1002136.
- Chakrabarti, A., Banerjee, S., Franchi, L., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Nunez, G. and Silverman, R. H. (2015). "RNase L activates the NLRP3 inflammasome during viral infections." Cell Host Microbe **17**(4): 466-477.
- Chapman, S. J. and Hill, A. V. (2012). "Human genetic susceptibility to infectious disease." Nat Rev Genet **13**(3): 175-188.



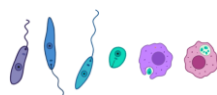
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. and Gu, J. (2018). "fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor." Bioinformatics **34**(17): i884-i890.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I. P., Garcia, E., Nieto, J., Moreno, J. and Cruz, I. (2013). "Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012." Euro Surveill **18**(30): 20545.
- Chitimia, L., Munoz-Garcia, C. I., Sanchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Rio, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Gimenez-Font, P., Jimenez-Montalban, P., Martinez-Ramirez, A., Meseguer-Meseguer, J. M., Garcia-Bacete, I., Sanchez-Isarria, M. A., Sanchis-Monsonis, G., Garcia-Martinez, J. D., Vicente, V., Segovia, M. and Berriatua, E. (2011). "Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain." Veterinary parasitology **181**(1): 12-16.
- Cisse, M., Zida, A., Diallo, A. H., Marty, P. and Aoun, K. (2020). "[Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in West Africa: a Systematic Review]." Bull Soc Pathol Exot **113**(1): 24-34.
- Clarke, C. F., Bradley, K. K., Wright, J. H. and Glowicz, J. (2013). "Case report: Emergence of autochthonous cutaneous leishmaniasis in northeastern Texas and southeastern Oklahoma." Am J Trop Med Hyg **88**(1): 157-161.
- Coelho-Finamore, J. M., Freitas, V. C., Assis, R. R., Melo, M. N., Novozhilova, N., Secundino, N. F., Pimenta, P. F., Turco, S. J. and Soares, R. P. (2011). "*Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts." Int J Parasitol **41**(3-4): 333-342.
- Cojean, S., Nicolas, V. and Lievin-Le Moal, V. (2020). "The macrophage microtubule network acts as a key cellular controller of the intracellular fate of *Leishmania infantum*." PLoS Negl Trop Dis **14**(7): e0008396.
- Conceicao-Silva, F. and Morgado, F. N. (2019). "*Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End?" Front Cell Infect Microbiol **9**: 330.
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. and Modolell, M. (1994). "Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod." J Immunol Methods **174**(1-2): 231-235.
- Cortes, S., Albuquerque-Wendt, A., Maia, C., Carvalho, M., Lima, I. A., de Freitas, L. A. R., Dos-Santos, W. L. C. and Campino, L. (2019). "Elucidating in vitro and in vivo phenotypic behaviour of *L. infantum*/*L. major* natural hybrids." Parasitology **146**(5): 580-587.
- Costa, C. H. (2011). "How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy." Rev Soc Bras Med Trop **44**(2): 232-242.
- Craft, N., Birnbaum, R., Quanquin, N., Erfe, M. C., Quant, C., Haskell, J. and Bruhn, K. W. (2014). "Topical resiquimod protects against visceral infection with *Leishmania infantum* chagasi in mice." Clin Vaccine Immunol **21**(9): 1314-1322.



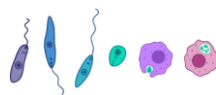
- Crespo Yanguas, S., Willebrords, J., Johnstone, S. R., Maes, M., Decrock, E., De Bock, M., Leybaert, L., Cogliati, B. and Vinken, M. (2017). "Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1864**(1): 51-61.
- Croft, S. L., Sundar, S. and Fairlamb, A. H. (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.
- Cruz, A. K. and Freitas-Castro, F. (2019). "Genome and transcriptome analyses of *Leishmania* spp.: opening Pandora's box." Curr Opin Microbiol **52**: 64-69.
- Cruz, I., Canavate, C., Rubio, J. M., Morales, M. A., Chicharro, C., Laguna, F., Jimenez-Mejias, M., Sirera, G., Videla, S., Alvar, J. and Spanish, H. I. V. L. S. G. (2002). "A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus." Trans R Soc Trop Med Hyg **96 Suppl 1**: S185-189.
- Cummings, H. E., Barbi, J., Reville, P., Oghumu, S., Zorko, N., Sarkar, A., Keiser, T. L., Lu, B., Ruckle, T., Varikuti, S., Lezama-Davila, C., Wewers, M. D., Whitacre, C., Radzioch, D., Rommel, C., Seveau, S. and Satoskar, A. R. (2012). "Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(4): 1251-1256.
- Cunha, J., Carrillo, E., Sanchez, C., Cruz, I., Moreno, J. and Cordeiro-da-Silva, A. (2013). "Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis." Parasit Vectors **6**: 122.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H. and Grimaldi, G., Jr. (2000). "A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*." Parasitol Today **16**(4): 142-144.
- Dantas-Torres, F., Miro, G., Bowman, D. D., Gradoni, L. and Otranto, D. (2019). "Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change." Trends Parasitol **35**(2): 97-101.
- Davis, B. K., Wen, H. and Ting, J. P. (2011). "The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases." Annu Rev Immunol **29**: 707-735.
- De Brito, R. C. F., Aguiar-Soares, R. D. O., Cardoso, J. M. O., Coura-Vital, W., Roatt, B. M. and Reis, A. B. (2020). "Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis." Appl Microbiol Biotechnol **104**(19): 8105-8116.
- De Pablos, L. M., Ferreira, T. R. and Walrad, P. B. (2016). "Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra." Curr Opin Microbiol **34**: 82-89.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.



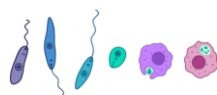
- Dillon, L. A., Suresh, R., Okrah, K., Corrada Bravo, H., Mosser, D. M. and El-Sayed, N. M. (2015). "Simultaneous transcriptional profiling of *Leishmania major* and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions." *BMC Genomics* **16**: 1108.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. (1988). "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production." *J Immunol* **141**(7): 2407-2412.
- Dominguez-Bernal, G., Horcajo, P., Orden, J. A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., De La Fuente, R., Ordonez-Gutierrez, L., Martinez-Rodrigo, A., Mas, A. and Carrion, J. (2015). "HisAK70: progress towards a vaccine against different forms of leishmaniasis." *Parasit Vectors* **8**: 629.
- Dominguez-Bernal, G., Jimenez, M., Molina, R., Ordonez-Gutierrez, L., Martinez-Rodrigo, A., Mas, A., Cutuli, M. T. and Carrion, J. (2014). "Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniasis in Madrid, Spain." *Parasites & vectors* **7**: 499.
- Dos-Santos, A. L., Carvalho-Kelly, L. F., Dick, C. F. and Meyer-Fernandes, J. R. (2016). "Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections." *Exp Parasitol* **167**: 67-75.
- Dos Santos Meira, C. and Gedamu, L. (2019). "Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis." *Microorganisms* **7**(12).
- Dumitrache, M. O., Nachum-Biala, Y., Gilad, M., Mircean, V., Cazan, C. D., Mihalca, A. D. and Baneth, G. (2016). "The quest for canine leishmaniasis in Romania: the presence of an autochthonous focus with subclinical infections in an area where disease occurred." *Parasit Vectors* **9**(1): 297.
- Dunning, N. (2009). "Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology." *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research* **2**(1): 73-82.
- El Hamouchi, A., Daoui, O., Ait Kbaich, M., Mhaidi, I., El Kacem, S., Guizani, I., Sarih, M. and Lemrani, M. (2019). "Epidemiological features of a recent zoonotic cutaneous leishmaniasis outbreak in Zagora province, southern Morocco." *PLoS Negl Trop Dis* **13**(4): e0007321.
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M. and Gutierrez Fernandez, J. (2014). "Diagnosis of leishmaniasis." *J Infect Dev Ctries* **8**(8): 961-972.
- Esch, K. J., Schaut, R. G., Lamb, I. M., Clay, G., Morais Lima, A. L., do Nascimento, P. R., Whitley, E. M., Jeronimo, S. M., Sutterwala, F. S., Haynes, J. S. and Petersen, C. A. (2015). "Activation of autophagy and nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing-like receptor family, pyrin domain-containing 3 inflammasome during *Leishmania infantum*-associated glomerulonephritis." *Am J Pathol* **185**(8): 2105-2117.



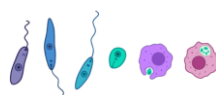
- Esteve, L. O., Saz, S. V., Hosein, S. and Solano-Gallego, L. (2015). "Histopathological findings and detection of Toll-like receptor 2 in cutaneous lesions of canine leishmaniosis." Vet Parasitol **209**(3-4): 157-163.
- Ewing, B. and Green, P. (1998). "Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities." Genome Res **8**(3): 186-194.
- Faria, M. S., Reis, F. C. and Lima, A. P. (2012). "Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters?" J Parasitol Res **2012**: 930257.
- Fernandes, M. C., Dillon, L. A., Belew, A. T., Bravo, H. C., Mosser, D. M. and El-Sayed, N. M. (2016). "Dual Transcriptome Profiling of Leishmania-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures." mBio **7**(3).
- Fernandez-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchon-Lorenzo, S., Munoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J. C., Gomez-Gordo, L., Soto, M., Alonso, C. and Gomez-Nieto, L. C. (2013). "Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*." Vet Parasitol **192**(1-3): 118-128.
- Fernandez Cotrina, J., Iniesta, V., Monroy, I., Baz, V., Hugnet, C., Maranon, F., Fabra, M., Gomez-Nieto, L. C. and Alonso, C. (2018). "A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend(R) against canine leishmaniosis." Vaccine **36**(15): 1972-1982.
- Filardy, A. A., Guimaraes-Pinto, K., Nunes, M. P., Zukeram, K., Fliess, L., Pereira, L., Oliveira Nascimento, D., Conde, L. and Morrot, A. (2018). "Human Kinetoplastid Protozoan Infections: Where Are We Going Next?" Front Immunol **9**: 1493.
- Flicek, P., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., Gil, L., Giron, C. G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S., Johnson, N., Juettemann, T., Kahari, A. K., Keenan, S., Kulesha, E., Martin, F. J., Maurel, T., McLaren, W. M., Murphy, D. N., Nag, R., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Pritchard, E., Riat, H. S., Ruffier, M., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Trevanion, S. J., Vullo, A., Wilder, S. P., Wilson, M., Zadissa, A., Aken, B. L., Birney, E., Cunningham, F., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T. J., Kinsella, R., Muffato, M., Parker, A., Spudich, G., Yates, A., Zerbino, D. R. and Searle, S. M. (2014). "Ensembl 2014." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D749-755.
- Foltyn, M., Luger, A. L., Lorenz, N. I., Sauer, B., Mittelbronn, M., Harter, P. N., Steinbach, J. P. and Ronellenfisch, M. W. (2019). "The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma." Br J Cancer **120**(5): 481-487.
- Forestier, C. L., Gao, Q. and Boons, G. J. (2014). "Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?" Front Cell Infect Microbiol **4**: 193.



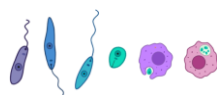
- Franceschini, E., Puzzolante, C., Menozzi, M., Rossi, L., Bedini, A., Orlando, G., Gennari, W., Meacci, M., Rugna, G., Carra, E., Codeluppi, M. and Mussini, C. (2016). "Clinical and Microbiological Characteristics of Visceral Leishmaniasis Outbreak in a Northern Italian Nonendemic Area: A Retrospective Observational Study." *Biomed Res Int* **2016**: 6481028.
- Frezard, F., Demicheli, C. and Ribeiro, R. R. (2009). "Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs." *Molecules* **14**(7): 2317-2336.
- Gabriel, A., Valerio-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Goncalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T. and Santos-Gomes, G. (2019). "Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease." *J Immunol Res* **2019**: 2603730.
- Gadelha, C., Rothery, S., Morphew, M., McIntosh, J. R., Severs, N. J. and Gull, K. (2009). "Membrane domains and flagellar pocket boundaries are influenced by the cytoskeleton in African trypanosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(41): 17425-17430.
- Galvez, R., Miro, G., Descalzo, M. A., Nieto, J., Dado, D., Martin, O., Cubero, E. and Molina, R. (2010). "Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain)." *Vet Parasitol* **169**(3-4): 327-334.
- Gantt, K. R., Goldman, T. L., McCormick, M. L., Miller, M. A., Jeronimo, S. M., Nascimento, E. T., Britigan, B. E. and Wilson, M. E. (2001). "Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*." *J Immunol* **167**(2): 893-901.
- Garcia, N., Moreno, I., Alvarez, J., de la Cruz, M. L., Navarro, A., Perez-Sancho, M., Garcia-Seco, T., Rodriguez-Bertos, A., Conty, M. L., Torano, A., Prieto, A., Dominguez, L. and Dominguez, M. (2014). "Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain." *Biomed Res Int* **2014**: 318254.
- Gatto, M., Borim, P. A., Wolf, I. R., Fukuta da Cruz, T., Ferreira Mota, G. A., Marques Braz, A. M., Casella Amorim, B., Targino Valente, G., de Assis Golim, M., Venturini, J., Araujo Junior, J. P., Pontillo, A. and Sartori, A. (2020). "Transcriptional analysis of THP-1 cells infected with *Leishmania infantum* indicates no activation of the inflammasome platform." *PLoS Negl Trop Dis* **14**(1): e0007949.
- Gatto, M., de Abreu, M. M., Tasca, K. I., de Assis Golim, M., da Silva, L. D., Simao, J. C., Fortaleza, C. M., de Campos Soares, A. M. and Calvi, S. A. (2015). "The involvement of TLR2 and TLR4 in cytokine and nitric oxide production in visceral leishmaniasis patients before and after treatment with anti-leishmanial drugs." *PLoS One* **10**(2): e0117977.
- Giancchetti, E. and Montomoli, E. (2020). "The enemy at home: leishmaniasis in the Mediterranean basin, Italy on the focus." *Expert Rev Anti Infect Ther* **18**(6): 563-577.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J. and de Miguel, A. G. (2011). "Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008)." *Am J Trop Med Hyg* **85**(5): 820-825.



- Goncalves-de-Albuquerque, S. D. C., Pessoa, E. S. R., Trajano-Silva, L. A. M., de Goes, T. C., de Morais, R. C. S., da, C. O. C. N., de Lorena, V. M. B. and de Paiva-Cavalcanti, M. (2017). "The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis." Front Immunol **8**: 1437.
- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A. and Mosser, D. M. (2011). "Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection." J Exp Med **208**(6): 1253-1265.
- Gonzalez, E., Alvarez, A., Ruiz, S., Molina, R. and Jimenez, M. (2017). "Detection of high Leishmania infantum loads in Phlebotomus perniciosus captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR." Acta Trop **171**: 68-73.
- Gonzalez, E., Jimenez, M., Hernandez, S., Martin-Martin, I. and Molina, R. (2017). "Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, Leishmania infantum infection rates and blood meal preferences." Parasites & vectors **10**(1): 368.
- Gonzalez, E., Molina, R. and Jimenez, M. (2018). "Rabbit trypanosome detection in Phlebotomus perniciosus sand flies from the leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain." Acta Trop **187**: 201-206.
- Gradoni, L. (2013). "Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges." Euro Surveill **18**(30): 20539.
- Gradoni, L. (2015). "Canine Leishmania vaccines: still a long way to go." Vet Parasitol **208**(1-2): 94-100.
- Gradoni, L. (2018). A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. F. Bruschi, Gradoni, L., Springer International Publishing
- Gramiccia, M., Di Muccio, T. (2018). Diagnosis. The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. F. Bruschi, Gradoni, L., Springer International Publishing.
- Gramiccia, M. and Gradoni, L. (2005). "The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control." Int J Parasitol **35**(11-12): 1169-1180.
- Grimaldi, G., Jr., Teva, A., Dos-Santos, C. B., Santos, F. N., Pinto, I. D., Fux, B., Leite, G. R. and Falqueto, A. (2017). "Field trial of efficacy of the Leish-tec(R) vaccine against canine leishmaniasis caused by Leishmania infantum in an endemic area with high transmission rates." PLoS One **12**(9): e0185438.
- Guerbouj, S., Guizani, I., Speybroeck, N., Le Ray, D. and Dujardin, J. C. (2001). "Genomic polymorphism of Leishmania infantum: a relationship with clinical pleomorphism?" Infect Genet Evol **1**(1): 49-59.



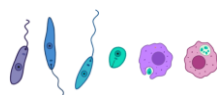
- Gupta, A. K., Ghosh, K., Palit, S., Barua, J., Das, P. K. and Ukil, A. (2017). "Leishmania donovani inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory proteins A20 and UCP2." FASEB J **31**(11): 5087-5101.
- Gupta, G., Oghumu, S. and Satoskar, A. R. (2013). "Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis." Adv Appl Microbiol **82**: 155-184.
- Gurung, P. and Kanneganti, T. D. (2015). "Innate immunity against Leishmania infections." Cell Microbiol **17**(9): 1286-1294.
- Harb, O. S. and Roos, D. S. (2020). "ToxoDB: Functional Genomics Resource for Toxoplasma and Related Organisms." Methods Mol Biol **2071**: 27-47.
- Harrington, V. and Gurung, P. (2020). "Reconciling protective and pathogenic roles of the NLRP3 inflammasome in leishmaniasis." Immunol Rev **297**(1): 53-66.
- Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. and Olivier, M. (2011). "Temperature-induced protein secretion by Leishmania mexicana modulates macrophage signalling and function." PLoS One **6**(5): e18724.
- Hekman, J. P., Johnson, J. L. and Kukekova, A. V. (2015). "Transcriptome Analysis in Domesticated Species: Challenges and Strategies." Bioinform Biol Insights **9**(Suppl 4): 21-31.
- Hendrickx, S., Maes, L., Croft, S. L., Caljon, G. (2018). The Challenges of Effective Leishmaniasis Treatment. Drug Resistance in Leishmania Parasites. A. Ponte-Sucre, Padrón-Nieves, M., Springer International Publishing.
- Holowka, T. and Bucala, R. (2020). "Role of Host and Parasite MIF Cytokines during Leishmania Infection." Trop Med Infect Dis **5**(1).
- Hombach, A. and Clos, J. (2014). "No stress--Hsp90 and signal transduction in Leishmania." Parasitology **141**(9): 1156-1166.
- Horrillo, L., Castro, A., Matia, B., Molina, L., Garcia-Martinez, J., Jaqueti, J., Garcia-Arata, I., Carrillo, E., Moreno, J., Ruiz-Giardin, J. M. and San Martin, J. (2019). "Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by L. infantum in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?" Parasit Vectors **12**(1): 359.
- Horrillo, L., San Martin, J. V., Molina, L., Madronal, E., Matia, B., Castro, A., Garcia-Martinez, J., Barrios, A., Cabello, N., Arata, I. G., Casas, J. M. and Ruiz Giardin, J. M. (2015). "Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain)." Clin Microbiol Infect **21**(3): 269-273.
- Hosein, S., Blake, D. P. and Solano-Gallego, L. (2017). "Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis." Parasitology **144**(1): 95-115.
- Hosein, S., Rodriguez-Cortes, A., Blake, D. P., Allenspach, K., Alberola, J. and Solano-Gallego, L. (2015). "Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a



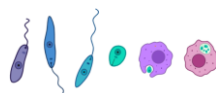
- Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum* Infection." *PLoS One* **10**(10): e0140325.
- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Parton, A., Armean, I. M., Trevanion, S. J., Flicek, P. and Cunningham, F. (2018). "Ensembl variation resources." *Database (Oxford)* **2018**.
- Hurrell, B. P., Regli, I. B. and Tacchini-Cottier, F. (2016). "Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions." *Trends Parasitol* **32**(5): 392-401.
- Husein-ElAhmed, H., Gieler, U. and Steinhoff, M. (2020). "Evidence supporting the enhanced efficacy of pentavalent antimonials with adjuvant therapy for cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis." *J Eur Acad Dermatol Venereol*.
- Ibraim, I. C., de Assis, R. R., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Melo, M. N., Turco, S. J. and Soares, R. P. (2013). "Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages." *Parasit Vectors* **6**: 54.
- Ikeogu, N. M., Akaluka, G. N., Edechi, C. A., Salako, E. S., Onyilagha, C., Barazandeh, A. F. and Uzonna, J. E. (2020). "Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development." *Microorganisms* **8**(8).
- Ilgoutz, S. C. and McConville, M. J. (2001). "Function and assembly of the *Leishmania* surface coat." *Int J Parasitol* **31**(9): 899-908.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C. and Corraliza, I. (2001). "The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages." *J Exp Med* **193**(6): 777-784.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C., Molano, I., Mohedano, A., Carcelen, J., Miron, C., Alonso, C. and Corraliza, I. (2002). "Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites." *Parasite Immunol* **24**(3): 113-118.
- Jacobs, T., Andra, J., Gaworski, I., Graefe, S., Mellenthin, K., Kromer, M., Halter, R., Borlak, J. and Clos, J. (2005). "Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection." *Med Microbiol Immunol* **194**(3): 143-149.
- Jaramillo, M., Gomez, M. A., Larsson, O., Shio, M. T., Topisirovic, I., Contreras, I., Luxenburg, R., Rosenfeld, A., Colina, R., McMaster, R. W., Olivier, M., Costa-Mattioli, M. and Sonenberg, N. (2011). "Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection." *Cell Host Microbe* **9**(4): 331-341.
- Jimenez, M., Gonzalez, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fuster, F. and Molina, R. (2013). "Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus*



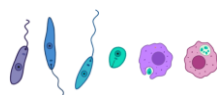
- perniciosus from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain." Parasitol Res **112**(7): 2453-2459.
- Jimenez, M., Gonzalez, E., Martin-Martin, I., Hernandez, S. and Molina, R. (2014). "Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?" Vet Parasitol **202**(3-4): 296-300.
- Kalavi, K., Jorjani, O., Faghihi, M. A. and Mowla, S. J. (2021). "Cytokine Gene Expression Alterations in Human Macrophages Infected by *Leishmania major*." Cell J **22**(4): 476-481.
- Kanehisa, M. (2019). "Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms." Protein Sci **28**(11): 1947-1951.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M. and Tanabe, M. (2020). "KEGG: integrating viruses and cellular organisms." Nucleic Acids Res.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." Nucleic Acids Res **28**(1): 27-30.
- Kanyina, E. W. (2020). "Characterization of visceral leishmaniasis outbreak, Marsabit County, Kenya, 2014." BMC Public Health **20**(1): 446.
- Karunaweera, N. D., Ginige, S., Senanayake, S., Silva, H., Manamperi, N., Samaranayake, N., Siriwardana, Y., Gamage, D., Senerath, U. and Zhou, G. (2020). "Spatial Epidemiologic Trends and Hotspots of Leishmaniasis, Sri Lanka, 2001-2018." Emerg Infect Dis **26**(1): 1-10.
- Kaufer, A., Barratt, J., Stark, D. and Ellis, J. (2019). "The complete coding region of the maxicircle as a superior phylogenetic marker for exploring evolutionary relationships between members of the Leishmaniinae." Infect Genet Evol **70**: 90-100.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. and Barratt, J. (2017). "The evolution of trypanosomatid taxonomy." Parasit Vectors **10**(1): 287.
- Kawai, T. and Akira, S. (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.
- Kaye, P. and Scott, P. (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.
- Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M. P. and Cadiergues, M. C. (1997). "Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis." Med Vet Entomol **11**(2): 105-111.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H. and Ashford, R. W. (1974). "Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly." Proc R Soc Lond B Biol Sci **187**(1089): 409-419.



- Kim, D. H., Chung, H. J., Bleys, J. and Ghohestani, R. F. (2009). "Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials." PLoS Negl Trop Dis **3**(2): e381.
- Kima, P. E. (2007). "The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist." Int J Parasitol **37**(10): 1087-1096.
- Kima, P. E. (2016). "PI3K signaling in *Leishmania* infections." Cell Immunol **309**: 19-22.
- Kone, A. K., Niare, D. S., Piarroux, M., Izri, A., Marty, P., Laurens, M. B., Piarroux, R., Thera, M. A. and Doumbo, O. K. (2019). "Visceral Leishmaniasis in West Africa: Clinical Characteristics, Vectors, and Reservoirs." J Parasitol Res **2019**: 9282690.
- Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D. F. and Muller, I. (2004). "Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*." Infect Immun **72**(4): 1920-1928.
- Kropf, P., Fuentes, J. M., Fahrnich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M. and Muller, I. (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo." FASEB J **19**(8): 1000-1002.
- Kumar, A., Das, S., Mandal, A., Verma, S., Abhishek, K., Kumar, A., Kumar, V., Ghosh, A. K. and Das, P. (2018). "Leishmania infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization." Parasite Immunol **40**(11): e12586.
- Kweku, M. A., Odoom, S., Pupilampu, N., Desewu, K., Nuako, G. K., Gyan, B., Raczniak, G., Kronmann, K. C., Koram, K., Botero, S., Boakye, D. and Akuffo, H. (2011). "An outbreak of suspected cutaneous leishmaniasis in Ghana: lessons learnt and preparation for future outbreaks." Glob Health Action **4**.
- Lainson, R., Ready, P. D. and Shaw, J. J. (1979). "Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*." Proc R Soc Lond B Biol Sci **206**(1164): 307-318.
- Lakhal, S., Mekki, S., Ben-Abda, I., Mousli, M., Amri, F., Aoun, K. and Bouratbine, A. (2012). "Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude *Leishmania* histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis." Clin Vaccine Immunol **19**(9): 1487-1491.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" Trends Microbiol **11**(5): 210-214.
- Lauthier, J. J. K., Masataka (2018). Immunological and Immunopathological Aspects. The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. F. Bruschi, Gradoni, L., Springer International Publishing AG.



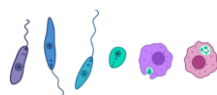
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Manomat, J., Piyaraj, P., Tan-Ariya, P., Bualert, L. and Mungthin, M. (2017). "Leishmaniasis in Thailand: A Review of Causative Agents and Situations." Am J Trop Med Hyg **96**(3): 534-542.
- Leveque, M. F., Lachaud, L., Simon, L., Battery, E., Marty, P. and Pomares, C. (2020). "Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniases With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*." Front Cell Infect Microbiol **10**: 67.
- Lodge, R., Diallo, T. O. and Descoteaux, A. (2006). "Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane." Cell Microbiol **8**(12): 1922-1931.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." J Immunol Methods **223**(1): 77-92.
- Maalej, I. A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F. and Dellagi, K. (2003). "Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **68**(3): 312-320.
- Maia, C. and Campino, L. (2011). "Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?" Trends Parasitol **27**(8): 341-344.
- Maia, C. and Campino, L. (2018). "Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs." Front Cell Infect Microbiol **8**: 302.
- Maia, C., Dantas-Torres, F., Campin, L. (2018). Parasite Biology: The reservoir hosts. The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases. F. Bruschi, Gradoni, L. , Springer International Publishing.
- Maia, C. and Depaquit, J. (2016). "Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*?" Parasite **23**: 55.
- Maia, C. S., Monteiro, M. C., Gavioli, E. C., Oliveira, F. R., Oliveira, G. B. and Romao, P. R. (2015). "Neurological disease in human and canine leishmaniasis--clinical features and immunopathogenesis." Parasite Immunol **37**(8): 385-393.
- Mandell, M. A. and Beverley, S. M. (2017). "Continual renewal and replication of persistent *Leishmania* major parasites in concomitantly immune hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(5): E801-E810.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N. and Gradoni, L. (2013). "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern." Med Vet Entomol **27**(2): 123-147.
- Marovich, M. A., Lira, R., Shepard, M., Fuchs, G. H., Kruezer, R., Nutman, T. B. and Neva, F. A. (2001). "Leishmaniasis recidivans recurrence after 43 years: a clinical and immunologic report after successful treatment." Clin Infect Dis **33**(7): 1076-1079.



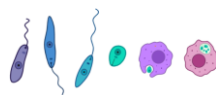
- Martin-Martin, I., Jimenez, M., Gonzalez, E., Eguiluz, C. and Molina, R. (2015). "Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain." *Vet Res* **46**: 138.
- Martin-Martin, I., Molina, R., Rohousova, I., Drahota, J., Volf, P. and Jimenez, M. (2014). "High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain." *Vet Parasitol* **202**(3-4): 207-216.
- Martinez-Rodrigo, A., Mas, A., Fernandez-Cotrina, J., Belinchon-Lorenzo, S., Orden, J. A., Arias, P., de la Fuente, R., Carrion, J. and Dominguez-Bernal, G. (2019). "Strength and medium-term impact of HisAK70 immunization in dogs: Vaccine safety and biomarkers of effectiveness for ex vivo *Leishmania infantum* infection." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **65**: 137-143.
- Mas, A., Martinez-Rodrigo, A., Orden, J. A., Vinals, L. M., Dominguez-Bernal, G. and Carrion, J. (2020). "A further investigation of the leishmaniosis outbreak in Madrid (Spain): low-infectivity phenotype of the *Leishmania infantum* BOS1FL1 isolate to establish infection in canine cells." *Vet Immunol Immunopathol* **230**: 110148.
- Mauel, J., Corradin, S. B. and Buchmuller Rouiller, Y. (1991). "Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages." *Res Immunol* **142**(7): 577-580; discussion 593-574.
- McCall, L. I., Zhang, W. W. and Matlashewski, G. (2013). "Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease." *PLoS Pathog* **9**(1): e1003053.
- McConville, M. J. and Ferguson, M. A. (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes." *Biochem J* **294** (Pt 2): 305-324.
- McFarlane, E., Carter, K. C., McKenzie, A. N., Kaye, P. M., Brombacher, F. and Alexander, J. (2011). "Endogenous IL-13 plays a crucial role in liver granuloma maturation during *Leishmania donovani* infection, independent of IL-4/R α -responsive macrophages and neutrophils." *J Infect Dis* **204**(1): 36-43.
- McGwire, B. S. and Satoskar, A. R. (2014). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." *QJM* **107**(1): 7-14.
- Meddeb-Garnaoui, A., Zrelli, H. and Dellagi, K. (2009). "Effects of tropism and virulence of *Leishmania* parasites on cytokine production by infected human monocytes." *Clin Exp Immunol* **155**(2): 199-206.
- Medina-Colorado, A. A., Osorio, E. Y., Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., Kong, F., Spratt, H., Soong, L. and Melby, P. C. (2017). "Splenic CD4⁺ T Cells in Progressive Visceral Leishmaniasis Show a



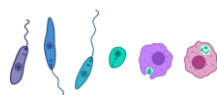
- Mixed Effector-Regulatory Phenotype and Impair Macrophage Effector Function through Inhibitory Receptor Expression." PLoS One **12**(1): e0169496.
- Melo, G. D., Silva, J. E., Grano, F. G., Homem, C. G. and Machado, G. F. (2014). "Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis." Parasite Immunol **36**(12): 726-731.
- Melo, L. M., Perosso, J., Almeida, B. F., Silva, K. L., Somenzari, M. A. and de Lima, V. M. (2014). "Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis." Int Immunopharmacol **18**(2): 373-378.
- Menna-Barreto, R. F. and de Castro, S. L. (2014). "The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics." Biomed Res Int **2014**: 614014.
- Mi, H., Ebert, D., Muruganujan, A., Mills, C., Albu, L. P., Mushayamaha, T. and Thomas, P. D. (2020). "PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API." Nucleic Acids Res.
- Mihalca, A. D., Cazan, C. D., Sulesco, T. and Dumitrache, M. O. (2019). "A historical review on vector distribution and epidemiology of human and animal leishmanioses in Eastern Europe." Res Vet Sci **123**: 185-191.
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. and Mosser, D. M. (2005). "A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania." J Exp Med **201**(5): 747-754.
- Miro, G., Galvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M. A. and Molina, R. (2007). "Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog." Vet Parasitol **143**(3-4): 375-379.
- Miro, G., Muller, A., Montoya, A., Checa, R., Marino, V., Marino, E., Fuster, F., Escacena, C., Descalzo, M. A. and Galvez, R. (2017). "Epidemiological role of dogs since the human leishmaniosis outbreak in Madrid." Parasites & vectors **10**(1): 209.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., Lucientes, J. and Alvar, J. (1994). "Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*." Trans R Soc Trop Med Hyg **88**(4): 491-493.
- Molina, R., Jimenez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martin-Martin, I., Sevillano, O., Melero, S. and Bernal, J. (2012). "The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain." Vet Parasitol **190**(1-2): 268-271.
- Molina, R., Jimenez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martin-Martin, I., Sevillano, O., Melero, S. and Bernal, J. (2012). "The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain." Veterinary Parasitology **190**(1-2): 268-271.



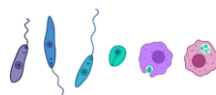
- Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J. and Lopez-Velez, R. (2014). "Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(8): e3021.
- Montserrat-Sangra, S., Alborch, L., Ordeix, L. and Solano-Gallego, L. (2016). "TLR-2 and TLR-4 transcriptions in unstimulated blood from dogs with leishmaniosis due to *Leishmania infantum* at the time of diagnosis and during follow-up treatment." *Vet Parasitol* **228**: 172-179.
- Montserrat-Sangra, S., Ordeix, L., Martinez-Orellana, P. and Solano-Gallego, L. (2018). "Parasite Specific Antibody Levels, Interferon-gamma and TLR2 and TLR4 Transcripts in Blood from Dogs with Different Clinical Stages of Leishmaniosis." *Vet Sci* **5**(1).
- Moreira, D., Santarem, N., Loureiro, I., Tavares, J., Silva, A. M., Amorim, A. M., Ouaisi, A., Cordeiro-da-Silva, A. and Silvestre, R. (2012). "Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(1): e1469.
- Moreno, J. (2019). "Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis." *Front Vet Sci* **6**: 168.
- Moreno, J. and Alvar, J. (2002). "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model." *Trends Parasitol* **18**(9): 399-405.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A. M. and Gueguen, S. (2012). "Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(6): e1683.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J. E., Kaye, P. M. and Chatterjee, M. (2014). "Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery." *Trends Parasitol* **30**(2): 65-74.
- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A. M. and Horng, T. (2012). "Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(28): 11282-11287.
- Murray, H. W. (2001). "Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis." *Int J Exp Pathol* **82**(5): 249-267.
- Muxel, S. M., Aoki, J. I., Fernandes, J. C. R., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Acuna, S. M., Muller, K. E., Vanderlinde, R. H. and Floeter-Winter, L. M. (2017). "Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection." *Front Microbiol* **8**: 2682.
- Muyombwe, A., Olivier, M., Harvie, P., Bergeron, M. G., Ouellette, M. and Papadopoulou, B. (1998). "Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene." *J Infect Dis* **177**(1): 188-195.



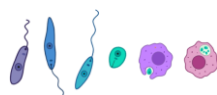
- Nieto, A., Dominguez-Bernal, G., Orden, J. A., De La Fuente, R., Madrid-Elena, N. and Carrion, J. (2011). "Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model." Vet Res **42**: 39.
- Noguerol Alvarez, M., San Martin Lopez, J. V., Aguado Lobo, M. and Aparicio Azcarraga, P. (2012). "[Community outbreak of leishmaniasis in the southern area of the community of Madrid]." Aten Primaria **44**(8): 508-509.
- Novais, F. O., Nguyen, B. T., Beiting, D. P., Carvalho, L. P., Glennie, N. D., Passos, S., Carvalho, E. M. and Scott, P. (2014). "Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species." J Infect Dis **209**(8): 1288-1296.
- Nylen, S., Maurya, R., Eidsmo, L., Manandhar, K. D., Sundar, S. and Sacks, D. (2007). "Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis." J Exp Med **204**(4): 805-817.
- Nylen, S. and Sacks, D. (2007). "Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis." Trends Immunol **28**(9): 378-384.
- Oghumu, S. and Satoskar, A. R. (2013). "PI3K-gamma inhibitors in the therapeutic intervention of diseases caused by obligate intracellular pathogens." Commun Integr Biol **6**(2): e23360.
- Olivier, M., Brownsey, R. W. and Reiner, N. E. (1992). "Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7481-7485.
- Oualha, R., Barhoumi, M., Marzouki, S., Harigua-Souiai, E., Ben Ahmed, M. and Guizani, I. (2019). "Infection of Human Neutrophils With *Leishmania infantum* or *Leishmania major* Strains Triggers Activation and Differential Cytokines Release." Front Cell Infect Microbiol **9**: 153.
- Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69** **Suppl 1**: S10-18.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years." Vaccine **26**(14): 1709-1724.
- Patino, L. H. and Ramirez, J. D. (2017). "RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions." Infect Genet Evol **49**: 273-282.
- Paul, J., Karmakar, S. and De, T. (2012). "TLR-mediated distinct IFN-gamma/IL-10 pattern induces protective immunity against murine visceral leishmaniasis." Eur J Immunol **42**(8): 2087-2099.
- Paul, J., Naskar, K., Chowdhury, S., Chakraborti, T. and De, T. (2014). "TLR mediated GSK3beta activation suppresses CREB mediated IL-10 production to induce a protective immune response against murine visceral leishmaniasis." Biochimie **107** **Pt B**: 235-246.



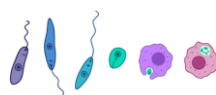
- Pereira, R. M., Teixeira, K. L., Barreto-de-Souza, V., Calegari-Silva, T. C., De-Melo, L. D., Soares, D. C., Bou-Habib, D. C., Silva, A. M., Saraiva, E. M. and Lopes, U. G. (2010). "Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*." *FASEB J* **24**(2): 617-626.
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T. and Salzberg, S. L. (2016). "Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown." *Nat Protoc* **11**(9): 1650-1667.
- Petitdidier, E., Pagniez, J., Papierok, G., Vincendeau, P., Lemesre, J. L. and Bras-Goncalves, R. (2016). "Recombinant Forms of *Leishmania amazonensis* Excreted/Secreted Promastigote Surface Antigen (PSA) Induce Protective Immune Responses in Dogs." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(5): e0004614.
- Pimenta, P. F., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P. G., Perkins, P. V. and Sacks, D. L. (1992). "Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut." *Science* **256**(5065): 1812-1815.
- Pinart, M., Rueda, J. R., Romero, G. A., Pinzon-Florez, C. E., Osorio-Arango, K., Silveira Maia-Elkhoury, A. N., Reveiz, L., Elias, V. M. and Tweed, J. A. (2020). "Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." *Cochrane Database Syst Rev* **8**: CD004834.
- Pingel, S., Wang, Z. E. and Locksley, R. M. (1998). "Distribution of protein kinase C isoforms after infection of macrophages with *Leishmania major*." *Infect Immun* **66**(4): 1795-1799.
- Podinovskaia, M. and Descoteaux, A. (2015). "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction." *Future Microbiol* **10**(1): 111-129.
- Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H. and Joiner, K. A. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9." *J Immunol* **145**(12): 4311-4316.
- Qian, M. B., Chen, J., Bergquist, R., Li, Z. J., Li, S. Z., Xiao, N., Utzinger, J. and Zhou, X. N. (2019). "Neglected tropical diseases in the People's Republic of China: progress towards elimination." *Infect Dis Poverty* **8**(1): 86.
- Quinnell, R. J. and Courtenay, O. (2009). "Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis." *Parasitology* **136**(14): 1915-1934.
- Rath, M., Muller, I., Kropf, P., Closs, E. I. and Munder, M. (2014). "Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages." *Front Immunol* **5**: 532.
- Reinhard, K., Huber, M., Lohoff, M. and Visekruna, A. (2012). "The role of NF-kappaB activation during protection against *Leishmania* infection." *Int J Med Microbiol* **302**(4-5): 230-235.
- Reithinger, R., Brooker, S. and Kolaczinski, J. H. (2007). "Visceral leishmaniasis in eastern Africa--current status." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**(12): 1169-1170.



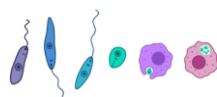
- Requena, J. M., Iborra, S., Carrion, J., Alonso, C. and Soto, M. (2004). "Recent advances in vaccines for leishmaniasis." Expert Opin Biol Ther **4**(9): 1505-1517.
- Requena, J. M., Montalvo, A. M. and Fraga, J. (2015). "Molecular Chaperones of Leishmania: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes." Biomed Res Int **2015**: 301326.
- Reynolds, K. A., Loughlin, W. A. and Young, D. J. (2013). "Quinolines as chemotherapeutic agents for leishmaniasis." Mini Rev Med Chem **13**(5): 730-743.
- Reza, S., Hasan, N. A., Maryam, N. F., Fahimeh, B., Ghahremani, A., GholamReza, H. and Amin, G. M. (2019). "Cytokine profile and nitric oxide levels in macrophages exposed to Leishmania infantum FML." Exp Parasitol **203**: 1-7.
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., da Silva, M. E., Dos Santos, C. C. P., Frezard, F. J. G. and da Silva, S. M. (2018). "Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control." Biomed Res Int **2018**: 3296893.
- Roatt, B. M., de Oliveira Cardoso, J. M., De Brito, R. C. F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D. and Reis, A. B. (2020). "Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment." Appl Microbiol Biotechnol.
- Rodrigues, J. C., Godinho, J. L. and de Souza, W. (2014). "Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure." Subcell Biochem **74**: 1-42.
- Rogers, M., Kropf, P., Choi, B. S., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P. and Muller, I. (2009). "Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival." PLoS Pathog **5**(8): e1000555.
- Rogers, M. E., Chance, M. L. and Bates, P. A. (2002). "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis." Parasitology **124**(Pt 5): 495-507.
- Rossi, M. and Fasel, N. (2018). "How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!" Int Immunol **30**(3): 103-111.
- Roth-Damas, P., Sempere-Manuel, M., Mialaret-Lahiguera, A., Fernandez-Garcia, C., Gil-Tomas, J. J., Colomina-Rodriguez, J. and Palop-Larrea, V. (2017). "Community outbreak of cutaneous leishmaniasis in La Ribera region of Valencia, Spain: Public Health measures." Enferm Infecc Microbiol Clin **35**(6): 338-343.
- Sacks, D. L., Saraiva, E. M., Rowton, E., Turco, S. J. and Pimenta, P. F. (1994). "The role of the lipophosphoglycan of Leishmania in vector competence." Parasitology **108** Suppl: S55-62.
- Sansom, F. M., Tang, L., Ralton, J. E., Saunders, E. C., Naderer, T. and McConville, M. J. (2013). "Leishmania major methionine sulfoxide reductase A is required for resistance to oxidative stress and efficient replication in macrophages." PLoS One **8**(2): e56064.



- Santos, D., Campos, T. M., Saldanha, M., Oliveira, S. C., Nascimento, M., Zamboni, D. S., Machado, P. R., Arruda, S., Scott, P., Carvalho, E. M. and Carvalho, L. P. (2018). "IL-1beta Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis." *J Invest Dermatol* **138**(5): 1107-1115.
- Saresella, M., Basilico, N., Marventano, I., Perego, F., La Rosa, F., Piancone, F., Taramelli, D., Banks, H. and Clerici, M. (2020). "Leishmania infantum infection reduces the amyloid beta42-stimulated NLRP3 inflammasome activation." *Brain Behav Immun* **88**: 597-605.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." *Nat Protoc* **3**(6): 1101-1108.
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M. and Wilson, M. E. (2017). "Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis." *Int J Mol Sci* **18**(6).
- Scott, P. and Novais, F. O. (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis." *Nat Rev Immunol* **16**(9): 581-592.
- Scott, P., Pearce, E., Natovitz, P. and Sher, A. (1987). "Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes." *J Immunol* **139**(1): 221-227.
- Sergiev, V., Kondrashin, A., Litvinov, S., Morozova, L., Turbabina, N., Stepanova, E., Maksimova, M., Shevchenko, S. and Morozov, E. (2018). "Epidemiology and Control of Leishmaniasis in the Former USSR: A Review Article." *Iran J Parasitol* **13**(3): 342-350.
- Servadio, J. L., Machado, G., Alvarez, J., de Ferreira Lima Junior, F. E., Vieira Alves, R. and Convertino, M. (2020). "Information differences across spatial resolutions and scales for disease surveillance and analysis: The case of Visceral Leishmaniasis in Brazil." *PLoS One* **15**(7): e0235920.
- Seva, A. D. P., Martcheva, M., Tuncer, N., Fontana, I., Carrillo, E., Moreno, J. and Keesling, J. (2017). "Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain." *PLoS One* **12**(10): e0186372.
- Shadab, M., Das, S., Banerjee, A., Sinha, R., Asad, M., Kamran, M., Maji, M., Jha, B., Deepthi, M., Kumar, M., Tripathi, A., Kumar, B., Chakrabarti, S. and Ali, N. (2019). "RNA-Seq Revealed Expression of Many Novel Genes Associated With Leishmania donovani Persistence and Clearance in the Host Macrophage." *Front Cell Infect Microbiol* **9**: 17.
- Shao, L., Devenport, M. and Jacobs-Lorena, M. (2001). "The peritrophic matrix of hematophagous insects." *Arch Insect Biochem Physiol* **47**(2): 119-125.
- Sheng, Q., Vickers, K., Zhao, S., Wang, J., Samuels, D. C., Koues, O., Shyr, Y. and Guo, Y. (2017). "Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis." *Brief Funct Genomics* **16**(4): 194-204.



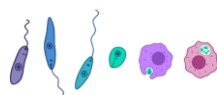
- Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D. and Zhou, X. (2019). "Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review)." Mol Med Rep **19**(6): 4529-4535.
- Shio, M. T., Christian, J. G., Jung, J. Y., Chang, K. P. and Olivier, M. (2015). "PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by Leishmania Zinc-Metalloprotease during Infection." PLoS Negl Trop Dis **9**(6): e0003868.
- Silva-Barrios, S., Charpentier, T. and Stager, S. (2018). "The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids." Trends Parasitol **34**(2): 155-171.
- Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J. and Reiner, N. E. (2010). "An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages." J Cell Sci **123**(Pt 6): 842-852.
- Singh, N., Kumar, R., Chauhan, S. B., Engwerda, C. and Sundar, S. (2018). "Peripheral Blood Monocytes With an Antiinflammatory Phenotype Display Limited Phagocytosis and Oxidative Burst in Patients With Visceral Leishmaniasis." J Infect Dis **218**(7): 1130-1141.
- Soares-Silva, M., Diniz, F. F., Gomes, G. N. and Bahia, D. (2016). "The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids." Front Microbiol **7**: 183.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. and Baneth, G. (2009). "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis." Vet Parasitol **165**(1-2): 1-18.
- Solano-Gallego, L., Miro, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. and The LeishVet, G. (2011). "LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis." Parasit Vectors **4**: 86.
- Solano-Gallego, L., Montserrat-Sangra, S., Ordeix, L. and Martinez-Orellana, P. (2016). "Leishmania infantum-specific production of IFN-gamma and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis." Parasit Vectors **9**(1): 317.
- Son, K., Yu, S., Shin, W., Han, K. and Kang, K. (2018). "A Simple Guideline to Assess the Characteristics of RNA-Seq Data." Biomed Res Int **2018**: 2906292.
- Soong, L. (2008). "Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites." J Immunol **180**(7): 4355-4360.
- Souza, A. E., Bates, P. A., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. (1994). "Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol **63**(2): 213-220.
- Srivastava, A., Singh, N., Mishra, M., Kumar, V., Gour, J. K., Bajpai, S., Singh, S., Pandey, H. P. and Singh, R. K. (2012). "Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens." Mol Cell Biochem **359**(1-2): 359-368.



- Stager, S., Alexander, J., Carter, K. C., Brombacher, F. and Kaye, P. M. (2003). "Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity." *Infect Immun* **71**(8): 4804-4807.
- Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." *Parasit Vectors* **10**(1): 82.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Rai, V. K., Agrawal, N., Singh, S. P., Chauhan, V. and Murray, H. W. (2007). "Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions." *Clin Infect Dis* **45**(5): 556-561.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A. and Berman, J. (2002). "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis." *N Engl J Med* **347**(22): 1739-1746.
- Sundar, S., Singh, O. P. and Chakravarty, J. (2018). "Visceral leishmaniasis elimination targets in India, strategies for preventing resurgence." *Expert Rev Anti Infect Ther* **16**(11): 805-812.
- Sunter, J. and Gull, K. (2017). "Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding." *Open Biol* **7**(9).
- Sunter, J. D., Yanase, R., Wang, Z., Catta-Preta, C. M. C., Moreira-Leite, F., Myskova, J., Pruzinova, K., Volf, P., Mottram, J. C. and Gull, K. (2019). "Leishmania flagellum attachment zone is critical for flagellar pocket shape, development in the sand fly, and pathogenicity in the host." *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**(13): 6351-6360.
- Sunyoto, T., Potet, J. and Boelaert, M. (2017). "Visceral leishmaniasis in Somalia: A review of epidemiology and access to care." *PLoS Negl Trop Dis* **11**(3): e0005231.
- Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. and Smuc, T. (2011). "REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms." *PLoS One* **6**(7): e21800.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J. and Mering, C. V. (2019). "STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets." *Nucleic Acids Res* **47**(D1): D607-D613.
- Tabbabi, A. (2019). "Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa." *Afr Health Sci* **19**(1): 1329-1337.
- Thakur, S., Joshi, J. and Kaur, S. (2020). "Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods." *J Parasit Dis*: 1-20.
- The Gene Ontology, C. (2019). "The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong." *Nucleic Acids Res* **47**(D1): D330-D338.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A. and Narechania, A. (2003). "PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function." *Genome Res* **13**(9): 2129-2141.



- Thomas, P. D., Kejariwal, A., Guo, N., Mi, H., Campbell, M. J., Muruganujan, A. and Lazareva-Ulitsky, B. (2006). "Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W645-650.
- Thomaz-Soccol, V., Ferreira da Costa, E. S., Karp, S. G., Junior Letti, L. A., Soccol, F. T. and Soccol, C. R. (2018). "Recent Advances in Vaccines Against Leishmania Based on Patent Applications." Recent Pat Biotechnol **12**(1): 21-32.
- Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B., Assolini, J. P., Goncalves, M. D., Carloto, A. C. M., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J. and Pavanelli, W. R. (2018). "Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons." Front Immunol **9**: 2529.
- Torpiano, P. and Pace, D. (2015). "Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe." Expert Rev Anti Infect Ther **13**(9): 1123-1138.
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J. and Pachter, L. (2010). "Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation." Nat Biotechnol **28**(5): 511-515.
- Turchetti, A. P., da Costa, L. F., Romao Ede, L., Fujiwara, R. T., da Paixao, T. A. and Santos, R. L. (2015). "Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*." Vet Immunol Immunopathol **163**(1-2): 67-76.
- Varani, S., Cagarelli, R., Melchionda, F., Attard, L., Salvadori, C., Finarelli, A. C., Gentilomi, G. A., Tigani, R., Rangoni, R., Todeschini, R., Scalone, A., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Viale, P. and Landini, M. P. (2013). "Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013." Euro Surveill **18**(29): 20530.
- Vogt, F., Mengesha, B., Asmamaw, H., Mekonnen, T., Fikre, H., Takele, Y., Adem, E., Mohammed, R., Ritmeijer, K., Adriaensen, W., Melsew, Y., van Griensven, J. and Diro, E. (2018). "Antigen Detection in Urine for Noninvasive Diagnosis and Treatment Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Coinfected Patients: An Exploratory Analysis from Ethiopia." Am J Trop Med Hyg **99**(4): 957-966.
- Vucic, D. (2018). "XIAP at the crossroads of cell death and inflammation." Oncotarget **9**(44): 27319-27320.
- Wamai, R. G., Kahn, J., McGloin, J., Ziaggi, G. (2020). "Visceral Leishmaniasis: a global overview." Journal of Global Health Science **Jun;2(1):e3**.
- Wanasen, N. and Soong, L. (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection." Immunol Res **41**(1): 15-25.

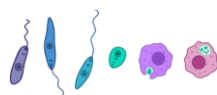


- Westermann, A. J., Gorski, S. A. and Vogel, J. (2012). "Dual RNA-seq of pathogen and host." Nat Rev Microbiol **10**(9): 618-630.
- Wheeler, R. J., Gluenz, E. and Gull, K. (2013). "The limits on trypanosomatid morphological diversity." PLoS One **8**(11): e79581.
- Wheeler, R. J., Gluenz, E. and Gull, K. (2015). "Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum." Nat Commun **6**: 8964.
- WHO. "Epidemiological situation." 2020, from <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
- WHO. "Leishmaniasis country profiles (Spain)." 2020, from https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Spain/en/.
- WHO. "Neglected tropical diseases." 2020, from https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.
- WHO. "Resolution WHA60.13." Retrieved 2020, from https://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Eng.pdf.
- WHO. "Weekly Epidemiological Record (WER)." 2020, from <https://www.who.int/wer/en/>.
- WHO (2018). "Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018."
- WHO (2018). "Surveillance of Leishmaniasis in the WHO European Region, 2016 and Global leishmaniasis surveillance update, 1998-2016." Weekly Epidemiological Record **40**(93):521-40.
- Williams, A. G., Thomas, S., Wyman, S. K. and Holloway, A. K. (2014). "RNA-seq Data: Challenges in and Recommendations for Experimental Design and Analysis." Curr Protoc Hum Genet **83**: 11 13 11-20.
- Yasur-Landau, D., Jaffe, C. L., David, L. and Baneth, G. (2016). "Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse." PLoS Negl Trop Dis **10**(1): e0004341.
- Young, J. and Kima, P. E. (2019). "The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface." Yale J Biol Med **92**(3): 511-521.
- Yurchenko, V., Votycka, J., Tesarova, M., Klepetkova, H., Kraeva, N., Jirku, M. and Lukes, J. (2014). "Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*." Folia Parasitol (Praha) **61**(2): 97-112.
- Zakai, H. A., Chance, M. L. and Bates, P. A. (1998). "In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*." Parasitology **116** (Pt 4): 305-309.
- Zheng, X., Zhu, Y., Zhao, Z., Yan, L., Xu, T., Wang, X., He, H., Xia, X., Zheng, W. and Xue, X. (2020). "RNA sequencing analyses of gene expressions in a canine macrophages cell line DH82 infected with canine distemper virus." Infect Genet Evol **80**: 104206.



BIBLIOGRAFÍA

- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. and Tschopp, J. (2010). "Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation." Nat Immunol **11**(2): 136-140.
- Zijlstra, E. E. (2016). "Visceral leishmaniasis: a forgotten epidemic." Arch Dis Child **101**(6): 561-567.
- Zijlstra, E. E., Alves, F., Rijal, S., Arana, B. and Alvar, J. (2017). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Indian subcontinent: A threat to the South-East Asia Region Kala-azar Elimination Programme." PLoS Negl Trop Dis **11**(11): e0005877.



ANEXO I: MATERIAL
SUPLEMENTARIO

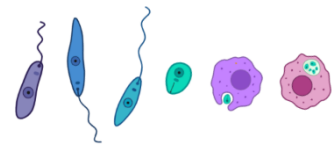


Tabla S1. Resultados del mapeo de las lecturas frente al genoma de referencia del perro (*Canis lupus familiaris*).

Muestra	Lecturas totales	Lecturas mapeadas	% de Mapeo
NI R1	85.606.752	81.804.853	95,56
NI R2	84.356.860	80.920.542	95,93
NI R3	93.253.244	89.230.524	95,69
BCN R1	89.101.392	70.090.761	78,66
BCN R2	93.735.740	73.992.850	78,94
BCN R3	82.088.190	64.195.954	78,20
BOS R1	86.499.804	68.713.256	79,44
BOS R2	80.736.160	64.485.975	79,87
BOS R3	81.701.352	64.312.991	78,72

Tabla S2. Análisis de calidad de lecturas mapeadas frente al genoma del perro.

Muestra	Lecturas Crudas	Lecturas limpias	Tasa de error (%)	Q20(%)	Q30 (%)	GC (%)
NI R1	43175966	42803376	0,02	98,03	94,52	50,00
NI R2	42524308	42178430	0,02	98,05	94,53	49,04
NI R3	47038553	46626622	0,02	98,01	94,39	49,58
BCN R1	45166943	44550696	0,02	97,92	94,34	51,69
BCN R2	47368713	46867870	0,03	97,87	94,21	51,88
BCN R3	41440103	41044095	0,03	97,88	94,23	51,80
BOS R1	43741209	43249902	0,02	97,91	94,30	51,41
BOS R2	40854656	40368080	0,02	97,99	94,49	51,50
BOS R3	41435550	40850676	0,02	98,05	94,65	51,56

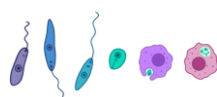
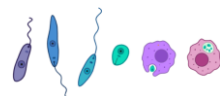


Tabla S3. Genes diferencialmente expresados en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BCN150 con respecto al control de células no infectadas.

ID_Gen	Lecturas norm. BCN1	Lecturas norm. BCN2	Lecturas norm. BCN3	Lecturas norm. NI1	Lecturas norm. NI2	Lecturas norm. NI3	log ₂ FC	p-Valor	FDR
ENSCAFG00000032469	1594,538	1242,102	1345,709	609,833	491,623	489,129	1,3956	4,04E-30	4,42E-26
ENSCAFG00000030931	6857,052	6681,020	7068,814	3528,183	4181,125	4073,543	0,8062	1,05E-25	5,75E-22
ENSCAFG00000013918	8041,875	6459,544	7061,725	3511,831	4108,361	3860,658	0,9092	1,47E-22	5,35E-19
ENSCAFG00000007539	1127,527	904,275	1120,046	529,035	505,616	435,908	1,1003	1,61E-20	4,40E-17
ENSCAFG00000017916	2731,794	2798,557	2898,178	1941,078	2097,093	2052,822	0,4683	1,94E-12	3,58E-09
ENSCAFG00000013182	412,958	318,435	320,182	126,968	180,044	118,270	1,3078	1,96E-12	3,58E-09
ENSCAFG00000029853	5154,411	5308,278	5323,763	4034,133	3430,164	3484,729	0,5281	5,33E-12	8,34E-09
ENSCAFG00000012012	2533,964	2421,946	2439,763	1829,500	1877,868	1853,454	0,4113	6,98E-11	9,55E-08
ENSCAFG00000005621	5088,467	5133,751	5128,819	3258,856	3831,299	3818,418	0,4926	1,23E-10	1,49E-07
ENSCAFG00000008586	4559,837	4612,210	4482,547	3567,621	3462,815	3186,521	0,4188	1,99E-10	2,18E-07
ENSCAFG00000008265	4018,235	3617,100	3785,472	2991,453	2710,921	2718,511	0,4397	1,62E-09	1,61E-06
ENSCAFG00000001938	45643,775	46810,007	48191,519	35339,547	37204,738	38467,186	0,3413	2,12E-09	1,66E-06
ENSCAFG00000030565	3458,255	3440,531	3616,520	2331,602	2767,826	2501,402	0,4681	2,00E-09	1,66E-06
ENSCAFG00000024645	2127,492	1822,839	1951,810	1327,397	1471,137	1268,864	0,5373	1,99E-09	1,66E-06
ENSCAFG00000019676	7266,768	7707,770	7971,467	6117,570	5753,945	5877,154	0,3705	2,41E-09	1,76E-06
ENSCAFG00000010639	7364,061	7000,476	7311,018	9344,684	8902,382	8899,787	-0,3247	6,33E-09	4,33E-06
ENSCAFG00000009739	936,183	992,049	932,190	580,015	694,988	665,689	0,5594	7,15E-09	4,61E-06
ENSCAFG00000030025	2526,396	2314,781	2404,318	3095,337	3086,868	3149,350	-0,3652	1,15E-08	6,62E-06
ENSCAFG00000003989	6427,879	6361,564	6437,902	5270,152	5148,512	5245,257	0,2957	1,11E-08	6,62E-06
ENSCAFG00000006065	6038,703	6213,573	6078,731	4507,379	4972,199	4872,707	0,3529	1,30E-08	7,11E-06
ENSCAFG00000028636	11209,329	11243,220	11736,854	9510,128	9165,452	9173,497	0,2959	2,83E-08	1,48E-05
ENSCAFG00000018466	436,741	434,787	393,434	783,934	604,500	642,035	-0,6812	3,16E-08	1,57E-05
ENSCAFG00000000192	1086,448	1010,420	992,446	1346,635	1360,125	1439,510	-0,4246	6,98E-08	3,32E-05
ENSCAFG00000005073	1822,638	1995,325	1937,632	1456,289	1319,079	1499,490	0,4289	8,13E-08	3,71E-05
ENSCAFG00000003606	317,826	342,930	381,619	228,928	199,634	206,127	0,7154	1,25E-07	5,46E-05



ENSCAFG00000002576	1649,671	1862,643	1805,306	1287,960	1290,160	1399,805	0,4184	1,91E-07	8,04E-05
ENSCAFG00000018622	1191,309	1040,018	1150,765	1748,702	1480,465	1518,075	-0,4893	2,02E-07	8,19E-05
ENSCAFG00000000160	1591,295	1609,528	1584,369	1285,074	1137,169	1214,798	0,3960	2,15E-07	8,40E-05
ENSCAFG00000011405	3052,864	3055,755	3000,967	3934,098	3657,785	3711,976	-0,3111	3,62E-07	1,37E-04
ENSCAFG00000016734	2298,296	2212,718	2344,063	1697,722	1876,002	1780,802	0,3561	4,58E-07	1,67E-04
ENSCAFG00000016129	8602,936	8908,027	8966,276	7524,803	7147,653	7273,580	0,2708	6,53E-07	2,31E-04
ENSCAFG00000003871	2729,632	2700,577	2706,778	3385,825	3219,336	3361,391	-0,2926	8,50E-07	2,91E-04
ENSCAFG00000007338	245,397	266,383	259,926	139,473	152,991	174,870	0,7212	1,72E-06	5,69E-04
ENSCAFG00000010241	4040,937	4011,062	3855,180	3168,440	3307,958	3312,393	0,2827	1,88E-06	6,05E-04
ENSCAFG00000012922	2543,693	2575,040	2642,978	2072,856	2024,329	2171,937	0,3077	1,99E-06	6,23E-04
ENSCAFG00000016456	2893,951	3101,683	2892,271	2375,849	2334,975	2462,542	0,3093	2,24E-06	6,82E-04
ENSCAFG00000032027	3657,167	3798,771	3731,124	2634,595	3044,889	3056,424	0,3566	2,61E-06	7,71E-04
ENSCAFG00000016475	1434,543	1553,393	1624,539	912,826	1097,056	1219,866	0,5131	2,82E-06	8,13E-04
ENSCAFG00000004510	537,278	588,901	548,208	435,733	355,424	347,206	0,5585	3,33E-06	9,36E-04
ENSCAFG00000014175	1868,041	1944,293	1841,932	2285,432	2357,364	2309,636	-0,2978	3,51E-06	9,62E-04
ENSCAFG00000005770	2736,119	2685,268	2885,182	2181,549	2107,354	2333,290	0,3263	3,72E-06	9,93E-04
ENSCAFG00000013410	1086,448	1013,482	947,550	1677,522	1292,958	1362,635	-0,5071	4,21E-06	1,10E-03
ENSCAFG00000030120	2995,569	3290,499	3295,157	2389,315	2551,401	2649,239	0,3358	4,42E-06	1,12E-03
ENSCAFG00000019187	4392,276	4645,891	4253,340	3714,789	3630,732	3575,966	0,2837	5,03E-06	1,22E-03
ENSCAFG00000009793	1721,020	1668,724	1632,810	1400,500	1195,007	1279,001	0,3748	4,98E-06	1,22E-03
ENSCAFG00000029842	3675,544	3758,967	3894,169	3252,123	2735,176	2712,598	0,3811	5,44E-06	1,29E-03
ENSCAFG00000001611	3003,136	3157,818	3195,912	2539,369	2258,479	2591,794	0,3403	5,95E-06	1,39E-03
ENSCAFG00000006404	3082,052	3323,159	3187,642	2085,360	2352,699	2699,081	0,4262	7,33E-06	1,67E-03
ENSCAFG00000001007	540,521	521,540	521,034	322,230	367,551	408,875	0,5253	7,59E-06	1,70E-03
ENSCAFG00000032206	5540,343	5557,310	5569,512	9998,764	7052,500	7052,247	-0,5321	8,13E-06	1,74E-03
ENSCAFG00000005123	748,081	810,377	797,501	612,719	577,447	596,417	0,3993	8,11E-06	1,74E-03
ENSCAFG00000031319	155,670	164,321	165,408	378,982	241,613	251,745	-0,8444	9,09E-06	1,88E-03
ENSCAFG00000029394	12095,784	11955,617	12379,581	10219,997	10616,998	10273,404	0,2277	9,36E-06	1,88E-03

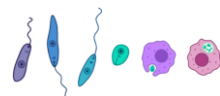


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000012775	3284,207	3358,881	3256,168	2613,434	2808,873	2759,061	0,2750	9,49E-06	1,88E-03
ENSCAFG00000018931	809,701	786,903	702,983	616,566	473,898	506,870	0,5271	9,52E-06	1,88E-03
ENSCAFG00000002588	358,906	412,333	398,160	258,746	280,794	266,951	0,5361	9,62E-06	1,88E-03
ENSCAFG00000011698	1797,774	1825,901	1746,232	3126,117	2238,889	2314,705	-0,5158	1,19E-05	2,29E-03
ENSCAFG00000000060	2804,224	2647,505	2793,026	2236,376	2341,505	2180,384	0,2868	1,36E-05	2,56E-03
ENSCAFG00000001307	415,120	466,426	394,615	289,527	295,720	307,501	0,5164	1,44E-05	2,67E-03
ENSCAFG00000032695	1058,341	1083,905	1102,324	1700,608	1335,870	1377,841	-0,4438	1,53E-05	2,79E-03
ENSCAFG00000020200	473,497	434,787	476,138	908,979	624,090	623,450	-0,6390	1,87E-05	3,31E-03
ENSCAFG00000000643	7858,098	7724,100	7574,489	8831,039	9031,118	9192,927	-0,2245	1,87E-05	3,31E-03
ENSCAFG00000010491	5092,791	5273,576	5166,626	4493,913	4389,155	4324,443	0,2341	2,16E-05	3,75E-03
ENSCAFG00000014961	595,654	644,015	609,645	494,407	429,120	446,890	0,4334	2,52E-05	4,31E-03
ENSCAFG00000019798	3807,432	3813,060	3758,298	2590,348	3140,042	3151,885	0,3571	2,71E-05	4,56E-03
ENSCAFG00000015190	30651,878	30401,397	30534,253	27310,718	25881,557	25715,189	0,2150	2,84E-05	4,60E-03
ENSCAFG00000015351	1338,331	1357,433	1404,784	914,750	1139,035	1061,892	0,3957	2,81E-05	4,60E-03
ENSCAFG00000014882	1700,480	1809,571	1654,077	1467,832	1140,901	1259,571	0,4174	2,86E-05	4,60E-03
ENSCAFG00000018487	3381,501	3429,305	3510,187	4430,429	3891,935	4277,980	-0,2880	3,46E-05	5,40E-03
ENSCAFG00000008630	3059,350	3279,272	3422,757	2441,257	2764,095	2639,102	0,3151	3,42E-05	5,40E-03
ENSCAFG00000007417	18023,140	17639,485	17521,396	20685,274	20143,471	20267,185	-0,2001	3,58E-05	5,44E-03
ENSCAFG00000018924	752,406	849,161	847,123	596,367	625,956	646,259	0,3894	3,57E-05	5,44E-03
ENSCAFG00000030617	139,454	139,826	131,145	55,789	85,824	81,099	0,8798	4,29E-05	6,43E-03
ENSCAFG00000004127	427,012	405,189	391,071	655,042	545,729	518,697	-0,4898	4,60E-05	6,81E-03
ENSCAFG00000003169	5465,751	5256,226	5147,722	6833,210	5977,834	6421,194	-0,2772	5,90E-05	8,49E-03
ENSCAFG00000005147	3623,654	3842,658	3831,550	3220,381	2822,866	3171,315	0,2940	5,85E-05	8,49E-03
ENSCAFG00000014968	1439,949	1519,713	1530,021	1304,312	997,238	1054,289	0,4204	6,62E-05	9,41E-03
ENSCAFG00000028815	1961,011	1849,375	1898,644	2258,499	2267,808	2275,845	-0,2529	7,36E-05	1,02E-02
ENSCAFG00000032748	3869,051	3702,832	3798,469	4721,879	4498,301	4303,324	-0,2501	7,26E-05	1,02E-02
ENSCAFG00000012052	3991,209	3999,835	4052,487	3323,303	3486,137	3477,126	0,2273	7,43E-05	1,02E-02
ENSCAFG00000023455	2856,114	2947,569	3002,149	3871,575	3465,614	3401,940	-0,2862	7,76E-05	1,05E-02

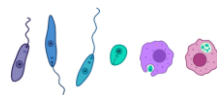


ENSCAFG00000015925	1357,789	1256,391	1390,606	1770,825	1637,188	1582,278	-0,3176	8,19E-05	1,09E-02
ENSCAFG00000009242	403,229	391,921	400,523	550,197	568,118	488,284	-0,4254	8,60E-05	1,13E-02
ENSCAFG00000002001	2286,405	2214,759	2152,662	2575,920	2665,211	2650,084	-0,2459	9,48E-05	1,22E-02
ENSCAFG00000006491	24021,845	23965,327	23959,298	19441,561	21248,922	21016,507	0,2215	9,37E-05	1,22E-02
ENSCAFG00000006091	3127,456	3062,900	3113,208	3888,889	3488,935	3733,940	-0,2563	9,72E-05	1,24E-02
ENSCAFG00000029989	636,734	628,706	663,994	492,484	461,771	524,610	0,3824	1,02E-04	1,28E-02
ENSCAFG00000012813	241,072	240,868	259,926	433,809	307,847	367,481	-0,5805	1,03E-04	1,28E-02
ENSCAFG00000014584	212,965	199,022	174,860	320,307	278,928	269,486	-0,5631	1,15E-04	1,41E-02
ENSCAFG00000019430	1577,241	1633,002	1595,002	1320,664	1347,998	1339,826	0,2616	1,19E-04	1,45E-02
ENSCAFG00000029846	823,754	774,655	802,227	1052,299	1026,157	941,933	-0,3309	1,23E-04	1,48E-02
ENSCAFG00000011187	1837,772	1790,179	1778,132	2633,633	2084,032	2213,331	-0,3582	1,33E-04	1,59E-02
ENSCAFG00000030747	4378,222	4394,817	4295,873	3834,062	3418,970	3726,337	0,2514	1,38E-04	1,61E-02
ENSCAFG00000004794	1428,057	1549,311	1414,235	1183,115	1220,194	1197,902	0,2868	1,38E-04	1,61E-02
ENSCAFG00000005560	2940,436	2891,434	3013,964	5155,688	3421,769	3764,352	-0,4804	1,45E-04	1,66E-02
ENSCAFG00000004176	1515,622	1408,464	1543,017	1904,527	1761,259	1776,578	-0,2852	1,47E-04	1,66E-02
ENSCAFG00000008643	1291,846	1251,288	1232,287	1506,307	1500,056	1529,902	-0,2648	1,47E-04	1,66E-02
ENSCAFG00000006979	1249,685	1168,617	1218,109	853,189	1022,426	983,327	0,3464	1,56E-04	1,74E-02
ENSCAFG00000012327	3060,431	3032,281	3034,049	3610,905	3528,116	3466,989	-0,2166	1,59E-04	1,75E-02
ENSCAFG00000015266	6671,113	6712,659	6415,454	5751,093	5453,560	5812,951	0,2185	1,58E-04	1,75E-02
ENSCAFG00000004620	4290,658	4372,363	4554,618	3443,538	3753,871	3868,261	0,2560	1,76E-04	1,91E-02
ENSCAFG00000003717	1263,739	1175,762	1248,828	1521,697	1456,211	1478,370	-0,2732	1,87E-04	1,97E-02
ENSCAFG00000015043	81986,261	83617,876	82918,856	94253,863	91486,601	95584,643	-0,1789	1,87E-04	1,97E-02
ENSCAFG00000005088	1149,148	1136,978	1220,472	983,043	931,938	947,846	0,2922	1,85E-04	1,97E-02
ENSCAFG00000005856	609,708	618,500	628,549	747,382	781,745	796,630	-0,3255	1,93E-04	2,02E-02
ENSCAFG00000001757	156,751	186,775	173,678	392,448	220,157	267,796	-0,7661	2,02E-04	2,06E-02
ENSCAFG00000008028	635,653	630,747	539,938	948,416	736,968	779,735	-0,4471	2,02E-04	2,06E-02
ENSCAFG00000007235	5906,816	5889,014	6045,650	7400,721	6717,600	6804,726	-0,2298	2,07E-04	2,09E-02
ENSCAFG00000001870	2355,592	2344,379	2295,622	2595,158	2875,107	2933,931	-0,2649	2,13E-04	2,14E-02



ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000012409	1150,229	1087,988	1072,787	924,369	847,979	911,521	0,3030	2,15E-04	2,14E-02
ENSCAFG00000004443	263,774	330,683	322,545	187,567	227,620	212,040	0,5473	2,18E-04	2,15E-02
ENSCAFG00000005212	2479,911	2624,030	2555,548	2257,537	1979,551	2111,112	0,2711	2,22E-04	2,17E-02
ENSCAFG00000013968	5138,195	5360,330	5062,656	8405,887	5961,975	6380,645	-0,4149	2,27E-04	2,20E-02
ENSCAFG00000011677	2251,811	2323,966	2163,296	3540,688	2543,005	2856,211	-0,4074	2,31E-04	2,21E-02
ENSCAFG00000031999	6097,080	6001,283	6169,705	9186,936	7028,246	7236,410	-0,3603	2,32E-04	2,21E-02
ENSCAFG00000023478	219,452	195,960	106,333	297,222	296,653	307,501	-0,7852	2,36E-04	2,23E-02
ENSCAFG00000013121	618,356	596,046	578,927	1113,859	747,229	751,857	-0,5422	2,49E-04	2,27E-02
ENSCAFG00000000374	382,689	473,571	385,164	514,607	566,252	651,328	-0,4802	2,46E-04	2,27E-02
ENSCAFG00000018832	7000,831	7336,262	7138,522	6275,319	6031,007	6343,474	0,2035	2,49E-04	2,27E-02
ENSCAFG00000006224	438,903	433,766	465,504	311,650	317,176	364,946	0,4270	2,45E-04	2,27E-02
ENSCAFG00000008700	2386,942	2356,626	2379,507	1923,764	1915,183	2121,250	0,2566	2,57E-04	2,32E-02
ENSCAFG00000015822	4918,743	5152,122	4970,500	4217,853	4337,847	4446,092	0,2102	2,63E-04	2,36E-02
ENSCAFG00000018219	8639,691	8986,615	8275,109	13006,569	10034,887	10181,323	-0,3590	2,73E-04	2,43E-02
ENSCAFG00000007270	391,337	354,157	381,619	534,806	499,086	461,251	-0,4073	2,78E-04	2,44E-02
ENSCAFG00000006250	170,805	168,403	177,222	130,816	92,354	99,684	0,6794	2,79E-04	2,44E-02
ENSCAFG00000017455	992,397	1024,709	942,824	1206,200	1153,028	1295,897	-0,3042	2,82E-04	2,45E-02
ENSCAFG00000031209	1177,255	1130,854	1218,109	939,759	927,273	1009,515	0,2927	2,86E-04	2,47E-02
ENSCAFG00000012028	772,945	828,749	762,057	630,033	644,613	620,071	0,3200	2,91E-04	2,49E-02
ENSCAFG00000005078	3277,721	3263,963	3285,705	2758,678	2879,771	2853,676	0,2106	2,99E-04	2,52E-02
ENSCAFG00000031552	2525,315	2408,678	2401,955	2122,874	2068,174	2072,252	0,2282	2,99E-04	2,52E-02
ENSCAFG00000003397	983,749	992,049	988,901	1260,066	1152,095	1187,765	-0,2798	3,23E-04	2,70E-02
ENSCAFG00000001002	116119,097	114476,513	114911,059	200113,794	130670,889	142015,596	-0,4525	3,33E-04	2,70E-02
ENSCAFG00000016627	1769,667	1754,457	1690,702	1443,785	1405,836	1520,609	0,2548	3,32E-04	2,70E-02
ENSCAFG00000019715	1299,413	1364,577	1330,350	1116,745	1106,384	1116,803	0,2583	3,34E-04	2,70E-02
ENSCAFG00000025555	389,175	390,900	373,349	321,269	260,271	232,315	0,5056	3,30E-04	2,70E-02
ENSCAFG00000031938	455,119	516,437	505,675	212,576	396,470	323,552	0,6628	3,43E-04	2,76E-02
ENSCAFG00000005157	3349,070	3606,894	3458,201	3070,328	2747,303	2954,206	0,2477	3,78E-04	3,00E-02



ENSCAFG00000030441	1037,801	1125,751	1049,157	833,952	914,213	866,747	0,2974	3,78E-04	3,00E-02
ENSCAFG00000003025	1690,750	1622,796	1711,969	2836,590	1985,148	2017,341	-0,4443	3,99E-04	3,12E-02
ENSCAFG00000007621	247,559	238,827	276,467	177,948	162,319	190,921	0,5195	3,97E-04	3,12E-02
ENSCAFG00000023062	447,552	386,817	453,690	535,768	595,171	553,333	-0,3884	4,05E-04	3,12E-02
ENSCAFG00000019791	1967,497	2055,541	1993,162	1601,534	1769,655	1684,497	0,2510	4,02E-04	3,12E-02
ENSCAFG00000014195	1837,772	1772,828	1878,558	1611,152	1436,620	1525,678	0,2631	4,29E-04	3,29E-02
ENSCAFG00000015416	1072,394	1035,936	1027,890	811,828	853,576	899,694	0,2894	4,41E-04	3,33E-02
ENSCAFG00000019919	877,806	915,502	879,024	750,268	731,370	697,791	0,2950	4,42E-04	3,33E-02
ENSCAFG00000032121	837,808	884,883	939,279	696,403	710,847	740,030	0,3089	4,52E-04	3,39E-02
ENSCAFG00000003564	76,754	102,063	128,782	135,625	206,164	197,679	-0,8145	4,62E-04	3,42E-02
ENSCAFG00000032033	8264,570	8805,964	8809,139	7612,335	7429,380	7564,185	0,1951	4,62E-04	3,42E-02
ENSCAFG00000019226	1358,870	1358,454	1415,417	1149,449	1141,833	1180,162	0,2510	4,71E-04	3,46E-02
ENSCAFG00000013504	424,850	458,261	464,323	779,124	598,903	527,989	-0,4994	4,80E-04	3,48E-02
ENSCAFG00000011943	1091,853	1099,215	1137,768	1592,877	1308,817	1305,189	-0,3374	4,78E-04	3,48E-02
ENSCAFG00000013084	1852,907	1869,787	1899,825	1640,971	1480,465	1604,243	0,2506	4,94E-04	3,56E-02
ENSCAFG00000008755	7364,061	7502,624	7346,463	6811,087	6056,195	5975,149	0,2376	5,04E-04	3,60E-02
ENSCAFG00000032326	1516,703	1477,867	1459,132	979,196	1299,488	1185,230	0,3623	5,07E-04	3,60E-02
ENSCAFG00000000121	1397,788	1437,042	1377,609	1764,092	1640,919	1617,759	-0,2532	5,17E-04	3,64E-02
ENSCAFG00000008713	2438,832	2310,698	2453,941	2941,435	2867,644	2682,185	-0,2373	5,22E-04	3,64E-02
ENSCAFG00000005849	2680,985	2765,897	2626,437	2988,568	3238,926	3229,605	-0,2282	5,20E-04	3,64E-02
ENSCAFG00000008833	2060,467	2084,119	2068,777	2818,314	2332,176	2447,336	-0,2900	5,36E-04	3,69E-02
ENSCAFG00000015444	1651,833	1560,538	1492,213	1824,690	1867,607	1894,848	-0,2478	5,34E-04	3,69E-02
ENSCAFG00000007894	291,881	291,899	285,919	396,295	383,410	366,636	-0,3975	5,53E-04	3,70E-02
ENSCAFG00000007160	569,709	575,633	603,738	764,696	715,512	700,325	-0,3181	5,41E-04	3,70E-02
ENSCAFG00000003833	4780,370	4915,336	5063,837	4113,008	4410,611	4250,947	0,2082	5,54E-04	3,70E-02
ENSCAFG00000004034	4554,432	4461,158	4406,932	3525,298	4073,845	3731,406	0,2444	5,54E-04	3,70E-02
ENSCAFG00000031326	3649,599	3970,236	3870,539	3424,300	2421,732	2969,412	0,3824	5,53E-04	3,70E-02
ENSCAFG00000006006	10542,326	11228,931	11298,524	9343,722	8916,375	9998,005	0,2267	5,61E-04	3,72E-02



ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000006973	399,986	392,941	446,601	287,603	322,773	321,017	0,4103	5,67E-04	3,74E-02
ENSCAFG00000019536	3585,818	3662,007	3655,509	3205,953	3037,426	3216,088	0,2049	5,73E-04	3,75E-02
ENSCAFG00000010370	11607,153	11224,849	11690,777	15737,353	13146,010	13010,500	-0,2791	6,06E-04	3,95E-02
ENSCAFG00000024944	4745,776	4975,553	4639,685	7500,756	5458,225	5685,388	-0,3764	6,11E-04	3,96E-02
ENSCAFG00000004773	1179,417	1255,370	1291,361	1057,108	1041,083	993,465	0,2694	6,29E-04	4,05E-02
ENSCAFG00000004384	3368,528	3482,377	3415,668	4034,133	3901,264	3842,072	-0,1979	6,48E-04	4,11E-02
ENSCAFG00000001521	2723,146	2757,732	2619,348	2428,752	2092,428	2258,104	0,2571	6,54E-04	4,11E-02
ENSCAFG00000030544	1156,715	1005,317	1081,057	837,799	925,407	859,144	0,3062	6,43E-04	4,11E-02
ENSCAFG00000002330	289,719	308,229	334,360	220,271	219,225	242,453	0,4490	6,51E-04	4,11E-02
ENSCAFG00000019456	1296,170	1338,041	1400,058	1163,877	1015,896	1129,475	0,2854	6,66E-04	4,16E-02
ENSCAFG00000002007	3310,152	3105,766	3305,790	5404,815	3906,861	3694,235	-0,4197	6,86E-04	4,27E-02
ENSCAFG00000019591	2358,835	2328,049	2401,955	2072,856	2017,799	2041,840	0,2089	7,08E-04	4,38E-02
ENSCAFG00000007492	3089,619	3035,343	3101,393	4116,855	3318,220	3819,263	-0,2867	7,40E-04	4,55E-02
ENSCAFG00000005354	2220,461	2330,090	2139,666	1986,286	1846,151	1824,731	0,2427	7,53E-04	4,59E-02
ENSCAFG00000016426	5976,003	6104,366	6037,379	5587,573	4895,704	4746,835	0,2507	7,54E-04	4,59E-02
ENSCAFG00000000185	1229,145	1261,494	1284,272	1471,680	1472,070	1496,110	-0,2344	7,70E-04	4,63E-02
ENSCAFG00000001047	3726,353	3653,842	3643,694	4214,005	4139,146	4174,917	-0,1845	7,68E-04	4,63E-02
ENSCAFG00000017669	1764,261	1721,797	1628,084	1926,650	2042,053	2066,339	-0,2387	7,80E-04	4,67E-02
ENSCAFG00000013102	2762,064	2800,599	2732,771	4469,866	3043,023	3438,266	-0,4005	7,92E-04	4,71E-02
ENSCAFG00000003190	1511,297	1463,578	1417,780	1262,951	1160,491	1257,882	0,2550	7,96E-04	4,71E-02
ENSCAFG00000000886	3140,428	3094,539	2861,552	3833,100	3478,674	3458,541	-0,2432	8,11E-04	4,72E-02
ENSCAFG00000010304	9903,430	9791,889	9660,988	7871,081	8730,734	8752,795	0,2113	8,07E-04	4,72E-02
ENSCAFG00000012082	3263,667	3283,355	3436,935	3099,184	2352,699	2379,753	0,3505	8,10E-04	4,72E-02
ENSCAFG00000011727	1241,037	1204,339	1225,198	1669,827	1416,097	1419,235	-0,2952	8,27E-04	4,79E-02
ENSCAFG00000019218	857,267	958,368	932,190	758,925	617,560	767,063	0,3580	8,49E-04	4,89E-02
ENSCAFG00000017553	4039,856	2815,908	3453,475	2472,999	2918,952	2306,257	0,4213	8,52E-04	4,89E-02



Tabla S4. Genes diferencialmente expresados en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas.

ID_Gen	Lecturas norm. BOS1	Lecturas norm. BOS2	Lecturas norm. BOS3	Lecturas norm. NI1	Lecturas norm. NI2	Lecturas norm. NI3	Log ₂ FC	p-Valor	FDR
ENSCAFG00000030931	6513,391	6484,288	7258,086	3421,439	4054,305	3955,399	0,8252	2,95E-23	3,02E-19
ENSCAFG00000032469	1163,801	923,880	990,423	591,383	476,711	474,943	0,9976	3,12E-16	1,59E-12
ENSCAFG00000013918	6308,968	5447,350	5635,922	3405,582	3983,748	3748,688	0,6430	1,09E-14	3,73E-11
ENSCAFG00000030565	3637,418	3551,627	3749,953	2261,060	2683,874	2428,854	0,5689	2,97E-13	7,60E-10
ENSCAFG00000007539	1030,764	743,443	873,562	513,029	490,280	423,265	0,8936	8,98E-12	1,84E-08
ENSCAFG00000029853	4975,356	5059,069	5261,042	3912,081	3326,122	3383,662	0,5262	1,21E-11	2,05E-08
ENSCAFG00000002576	1726,232	1888,872	1873,241	1248,993	1251,027	1359,207	0,5074	7,71E-11	1,13E-07
ENSCAFG00000030025	2273,522	2354,808	2177,541	3001,688	2993,239	3058,010	-0,4116	1,51E-10	1,94E-07
ENSCAFG00000008586	4361,008	4314,484	4642,028	3459,683	3357,782	3094,103	0,4264	9,96E-10	1,13E-06
ENSCAFG00000009739	909,625	959,282	937,199	562,467	673,908	646,382	0,5750	3,05E-09	3,12E-06
ENSCAFG00000012012	2260,542	2395,920	2433,246	1774,149	1820,909	1799,698	0,3939	4,36E-09	4,06E-06
ENSCAFG00000018466	412,089	408,837	347,111	760,216	586,165	623,414	-0,7529	5,75E-09	4,90E-06
ENSCAFG00000000643	7164,513	7045,011	6743,205	8563,858	8757,190	8926,306	-0,3250	8,26E-09	6,50E-06
ENSCAFG00000005621	5007,804	4687,919	4804,013	3160,260	3715,089	3707,674	0,4541	9,06E-09	6,62E-06
ENSCAFG00000017916	2582,859	2482,713	2602,174	1882,351	2033,485	1993,285	0,3757	2,58E-08	1,76E-05
ENSCAFG00000019676	7100,699	7055,289	7188,664	5932,484	5579,418	5706,700	0,3100	3,05E-08	1,95E-05
ENSCAFG00000001938	44201,715	44011,620	44643,071	34270,356	36076,259	37351,531	0,3028	4,42E-08	2,66E-05
ENSCAFG00000000060	2766,731	2748,799	2830,110	2168,715	2270,483	2117,147	0,3483	6,94E-08	3,94E-05
ENSCAFG00000008643	1048,070	1176,262	1023,977	1460,734	1454,557	1485,530	-0,4383	8,53E-08	4,59E-05
ENSCAFG00000003989	6049,384	6318,698	6250,308	5110,704	4992,349	5093,130	0,2930	1,12E-07	5,73E-05
ENSCAFG00000018622	1157,311	1083,760	1065,630	1695,795	1435,560	1474,046	-0,4773	1,21E-07	5,89E-05
ENSCAFG00000023478	190,361	115,342	155,043	288,229	287,655	298,583	-0,9228	1,47E-07	6,85E-05
ENSCAFG00000006091	2826,219	2805,899	2838,209	3771,232	3383,110	3625,645	-0,3478	1,93E-07	8,58E-05
ENSCAFG00000032695	1027,519	974,128	940,670	1649,156	1295,351	1337,880	-0,5408	2,59E-07	1,10E-04
ENSCAFG00000013410	965,868	983,264	933,728	1626,769	1253,741	1323,115	-0,5437	2,88E-07	1,18E-04

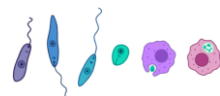


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000003606	302,848	367,725	335,540	222,002	193,579	200,149	0,7085	3,21E-07	1,26E-04
ENSCAFG00000008265	3511,953	3352,918	3552,100	2900,947	2628,695	2639,667	0,3509	3,99E-07	1,51E-04
ENSCAFG00000007770	1669,989	1732,417	1472,907	2237,740	2090,473	2163,083	-0,4128	4,14E-07	1,51E-04
ENSCAFG00000011405	2997,111	2900,685	2699,365	3815,072	3546,838	3604,318	-0,3509	4,31E-07	1,52E-04
ENSCAFG00000004127	308,256	389,423	358,681	635,224	529,176	503,653	-0,6590	7,41E-07	2,53E-04
ENSCAFG00000005073	1717,580	1866,031	1855,885	1412,230	1279,069	1456,000	0,3908	1,43E-06	4,70E-04
ENSCAFG00000000374	308,256	405,411	357,524	499,038	549,077	632,437	-0,6515	1,60E-06	4,96E-04
ENSCAFG00000015444	1461,241	1436,639	1423,154	1769,485	1810,959	1839,892	-0,3271	1,58E-06	4,96E-04
ENSCAFG00000003871	2673,713	2628,889	2569,777	3283,387	3121,688	3263,901	-0,2965	1,76E-06	5,30E-04
ENSCAFG00000007417	16382,983	17005,554	16809,417	20059,445	19532,487	19679,380	-0,2397	2,04E-06	5,96E-04
ENSCAFG00000019187	4267,991	4250,532	4240,536	3602,398	3520,606	3472,253	0,2682	2,20E-06	6,25E-04
ENSCAFG00000002588	374,233	368,867	443,145	250,918	272,277	259,209	0,5998	2,76E-06	7,62E-04
ENSCAFG00000018931	801,465	726,313	732,404	597,912	459,524	492,169	0,5456	2,88E-06	7,76E-04
ENSCAFG00000001870	2154,546	2198,354	1948,448	2516,642	2787,900	2848,839	-0,3719	3,73E-06	9,30E-04
ENSCAFG00000023455	2772,139	2768,213	2731,762	3754,442	3360,496	3303,275	-0,3325	3,65E-06	9,30E-04
ENSCAFG00000010639	7491,156	7352,210	7082,216	9061,963	8632,359	8641,669	-0,2643	3,55E-06	9,30E-04
ENSCAFG00000032206	5438,281	5385,682	5196,248	9696,253	6838,587	6847,712	-0,5454	3,83E-06	9,33E-04
ENSCAFG00000007338	235,789	239,820	278,846	135,253	148,350	169,798	0,7318	4,19E-06	9,95E-04
ENSCAFG00000014175	1773,823	1875,167	1826,960	2216,287	2285,861	2242,650	-0,3008	4,68E-06	1,09E-03
ENSCAFG00000030829	464,006	330,039	393,392	166,035	188,152	282,177	0,8977	4,81E-06	1,09E-03
ENSCAFG00000006404	3004,683	3182,760	3134,410	2022,268	2281,338	2620,800	0,4284	5,35E-06	1,19E-03
ENSCAFG00000000160	1479,628	1497,165	1542,329	1246,195	1102,677	1179,565	0,3570	5,78E-06	1,26E-03
ENSCAFG00000018219	7984,365	8245,255	7602,883	12613,058	9730,513	9886,036	-0,4354	8,09E-06	1,67E-03
ENSCAFG00000000192	1068,620	1083,760	984,638	1305,893	1318,870	1397,760	-0,3588	8,15E-06	1,67E-03
ENSCAFG00000012922	2513,637	2459,873	2478,371	2010,142	1962,928	2108,944	0,2928	8,05E-06	1,67E-03
ENSCAFG00000015925	1289,266	1244,782	1287,781	1717,249	1587,529	1536,388	-0,3406	1,06E-05	2,08E-03
ENSCAFG00000018487	3369,182	3290,108	3149,452	4296,387	3773,887	4153,907	-0,3175	1,06E-05	2,08E-03
ENSCAFG00000008028	564,595	590,415	525,294	919,722	714,614	757,120	-0,5085	1,27E-05	2,44E-03



ENSCAFG00000008700	2410,885	2443,885	2340,684	1865,561	1857,092	2059,728	0,3150	1,29E-05	2,44E-03
ENSCAFG00000011187	1689,458	1726,707	1646,462	2553,953	2020,820	2149,138	-0,4091	1,40E-05	2,54E-03
ENSCAFG00000002758	1394,181	1466,331	1297,037	1989,621	1673,464	1782,472	-0,3891	1,41E-05	2,54E-03
ENSCAFG00000006979	1194,086	1277,900	1196,375	827,376	991,414	954,808	0,4028	1,37E-05	2,54E-03
ENSCAFG00000008284	1101,068	1226,510	1082,986	1882,351	1396,664	1519,162	-0,4922	1,47E-05	2,60E-03
ENSCAFG00000003169	5130,025	5139,010	4944,014	6626,473	5796,516	6234,962	-0,2944	1,67E-05	2,89E-03
ENSCAFG00000003717	1169,209	1124,872	1180,177	1475,659	1412,042	1435,493	-0,3153	1,70E-05	2,89E-03
ENSCAFG00000018731	825,260	859,928	784,470	1020,462	1049,307	1120,505	-0,3698	1,73E-05	2,89E-03
ENSCAFG00000011677	2174,014	2039,616	2045,639	3433,565	2465,871	2773,373	-0,4703	1,87E-05	3,08E-03
ENSCAFG00000030120	2901,931	3041,152	3133,253	2317,027	2474,013	2572,404	0,3013	2,02E-05	3,18E-03
ENSCAFG00000032027	3439,486	3552,769	3687,473	2554,886	2952,533	2967,780	0,3332	1,98E-05	3,18E-03
ENSCAFG00000013182	272,563	219,264	230,250	123,127	174,583	114,839	0,8097	1,99E-05	3,18E-03
ENSCAFG00000031868	947,481	912,460	922,158	1089,488	1254,645	1284,561	-0,3837	2,25E-05	3,48E-03
ENSCAFG00000031999	5639,458	5885,879	5568,814	8908,987	6815,068	7026,534	-0,4123	2,47E-05	3,69E-03
ENSCAFG00000014345	61021,665	62071,242	60210,988	76357,413	68225,758	80422,887	-0,2957	2,50E-05	3,69E-03
ENSCAFG00000029394	11658,558	11618,730	11816,807	9910,793	10294,968	9975,447	0,2176	2,43E-05	3,69E-03
ENSCAFG00000019798	3620,113	3800,583	3660,861	2511,978	3044,799	3060,471	0,3626	2,53E-05	3,69E-03
ENSCAFG00000016129	8219,072	8318,344	8391,981	7297,142	6930,853	7062,626	0,2276	2,58E-05	3,71E-03
ENSCAFG00000005883	439,129	473,931	468,600	635,224	606,065	600,446	-0,4148	2,61E-05	3,71E-03
ENSCAFG00000013121	576,492	533,315	538,022	1080,160	724,565	730,051	-0,6204	2,80E-05	3,90E-03
ENSCAFG00000003776	7752,903	8113,925	7326,351	12819,203	9044,845	10081,263	-0,4618	2,83E-05	3,90E-03
ENSCAFG00000017315	2892,196	3081,122	2879,862	3573,482	3436,480	3665,019	-0,2701	3,10E-05	4,22E-03
ENSCAFG00000004820	849,055	881,626	823,810	1072,698	1063,780	1076,210	-0,3307	3,28E-05	4,41E-03
ENSCAFG00000012775	3138,801	3199,890	3174,906	2534,365	2723,675	2679,040	0,2612	3,35E-05	4,44E-03
ENSCAFG00000016863	34935,655	35518,550	35461,992	30488,864	31098,383	30796,659	0,1972	3,40E-05	4,45E-03
ENSCAFG00000007669	1426,629	1460,621	1427,782	1869,292	1718,692	1729,974	-0,3013	3,48E-05	4,50E-03
ENSCAFG00000011698	1844,127	1755,257	1735,554	3031,537	2170,980	2247,572	-0,4814	3,88E-05	4,96E-03
ENSCAFG00000008894	2177,259	2262,306	2027,127	2689,206	2529,192	2740,561	-0,2996	4,05E-05	5,11E-03

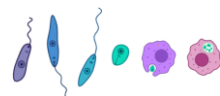


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000012813	209,830	219,264	258,019	420,684	298,510	356,823	-0,6474	4,39E-05	5,48E-03
ENSCAFG00000013504	426,150	385,997	418,847	755,552	580,737	512,676	-0,5856	4,78E-05	5,61E-03
ENSCAFG00000011751	3062,007	2984,052	2771,101	5060,334	3611,063	3648,613	-0,4824	4,75E-05	5,61E-03
ENSCAFG00000012327	2837,035	2979,484	2834,738	3501,658	3421,103	3366,436	-0,2501	4,57E-05	5,61E-03
ENSCAFG00000008630	3064,171	3051,430	3174,906	2367,397	2680,256	2562,560	0,2876	4,75E-05	5,61E-03
ENSCAFG00000025555	396,947	382,571	393,392	311,549	252,376	225,577	0,5733	4,62E-05	5,61E-03
ENSCAFG00000008833	1968,511	1951,682	1880,183	2733,047	2261,437	2376,356	-0,3454	4,95E-05	5,75E-03
ENSCAFG00000006099	454,272	452,233	418,847	599,778	572,596	581,580	-0,4037	5,44E-05	6,25E-03
ENSCAFG00000001611	2909,502	3005,750	2903,003	2462,541	2189,976	2516,625	0,2985	6,17E-05	6,99E-03
ENSCAFG00000016475	1483,954	1411,515	1339,848	885,209	1063,780	1184,487	0,4340	6,22E-05	6,99E-03
ENSCAFG00000020200	464,006	455,659	474,385	881,478	605,161	605,368	-0,5848	6,70E-05	7,31E-03
ENSCAFG00000013968	5029,436	5048,791	4697,566	8151,569	5781,139	6195,588	-0,4459	6,72E-05	7,31E-03
ENSCAFG00000032748	3754,231	3678,389	3483,835	4579,020	4361,860	4178,515	-0,2649	6,67E-05	7,31E-03
ENSCAFG00000005037	2112,363	2064,740	2219,195	1773,216	1748,543	1792,316	0,2673	7,44E-05	7,95E-03
ENSCAFG00000019715	1319,551	1317,870	1314,393	1082,958	1072,826	1084,413	0,2864	7,54E-05	7,95E-03
ENSCAFG00000006349	767,935	745,727	760,173	614,702	575,310	590,603	0,3530	7,47E-05	7,95E-03
ENSCAFG00000015190	29339,461	29331,183	29718,466	26484,437	25096,528	24969,378	0,2075	7,63E-05	7,96E-03
ENSCAFG00000001211	15018,005	15533,513	16495,860	10428,486	12941,754	13255,754	0,3612	7,94E-05	8,20E-03
ENSCAFG00000000886	3009,009	2802,473	2756,059	3717,130	3373,160	3358,234	-0,2860	8,18E-05	8,37E-03
ENSCAFG00000018924	752,793	782,271	780,999	578,324	606,970	627,516	0,3527	8,69E-05	8,80E-03
ENSCAFG00000002663	3574,685	3666,969	3450,281	4195,647	4123,053	4246,599	-0,2329	8,78E-05	8,80E-03
ENSCAFG000000008713	2333,010	2296,566	2200,682	2852,443	2780,663	2604,395	-0,2699	8,97E-05	8,83E-03
ENSCAFG00000007235	5682,722	5853,903	5450,796	7176,813	6513,844	6607,370	-0,2568	8,98E-05	8,83E-03
ENSCAFG00000013102	2659,652	2582,067	2441,346	4334,631	2950,724	3338,547	-0,4674	9,38E-05	8,96E-03
ENSCAFG00000007160	552,697	518,469	561,162	741,561	693,809	680,014	-0,3734	9,31E-05	8,96E-03
ENSCAFG00000006224	428,313	433,961	473,228	302,221	307,555	354,362	0,4682	9,21E-05	8,96E-03
ENSCAFG00000004443	313,664	269,513	312,400	181,892	220,716	205,891	0,5572	1,00E-04	9,48E-03
ENSCAFG00000001047	3409,201	3585,887	3259,370	4086,511	4013,599	4053,833	-0,2451	1,05E-04	9,87E-03



ENSCAFG00000014882	1640,786	1582,815	1653,404	1423,423	1106,295	1223,040	0,3784	1,09E-04	1,01E-02
ENSCAFG00000005560	3027,396	2833,307	2627,628	4999,704	3317,981	3655,176	-0,4960	1,12E-04	1,02E-02
ENSCAFG00000004496	1193,004	1188,824	1056,374	1811,460	1404,805	1414,166	-0,4289	1,12E-04	1,02E-02
ENSCAFG00000002554	1264,389	1289,320	1309,765	1484,054	1630,949	1616,775	-0,2929	1,13E-04	1,02E-02
ENSCAFG00000017669	1665,663	1604,513	1579,354	1868,359	1980,115	2006,409	-0,2719	1,17E-04	1,05E-02
ENSCAFG00000018615	5045,660	4938,017	4876,906	5825,214	5669,876	5709,982	-0,2113	1,19E-04	1,06E-02
ENSCAFG00000004176	1466,649	1482,319	1378,030	1846,905	1707,838	1725,053	-0,2868	1,22E-04	1,08E-02
ENSCAFG000000031552	2349,234	2505,553	2376,552	2058,647	2005,443	2012,151	0,2511	1,27E-04	1,11E-02
ENSCAFG00000014475	1412,569	1355,557	1478,692	1206,085	1125,291	1119,685	0,2996	1,32E-04	1,15E-02
ENSCAFG00000002001	2212,952	2165,236	2032,912	2497,986	2584,371	2573,224	-0,2558	1,37E-04	1,18E-02
ENSCAFG00000003397	953,971	967,276	857,364	1221,942	1117,150	1153,316	-0,3294	1,45E-04	1,22E-02
ENSCAFG00000008101	8260,173	7572,616	7543,874	8925,777	9538,743	9181,414	-0,2419	1,45E-04	1,22E-02
ENSCAFG00000029842	3653,642	3349,492	3571,770	3153,731	2652,214	2633,925	0,3257	1,45E-04	1,22E-02
ENSCAFG00000004530	1370,386	1320,154	1354,889	1578,265	1658,990	1631,540	-0,2673	1,54E-04	1,28E-02
ENSCAFG00000015351	1324,959	1233,362	1338,690	887,074	1104,486	1031,094	0,3662	1,63E-04	1,34E-02
ENSCAFG00000023062	399,110	427,109	418,847	519,559	577,119	537,285	-0,3925	1,80E-04	1,44E-02
ENSCAFG00000004186	4991,580	4890,053	4823,682	6080,796	5482,629	5769,042	-0,2370	1,82E-04	1,44E-02
ENSCAFG00000028636	10091,321	10600,064	11791,352	9222,401	8887,449	8907,440	0,2657	1,79E-04	1,44E-02
ENSCAFG00000005770	2519,045	2526,109	2721,348	2115,546	2043,435	2265,618	0,2732	1,82E-04	1,44E-02
ENSCAFG00000004510	486,720	507,049	518,352	422,550	344,643	337,136	0,4546	1,79E-04	1,44E-02
ENSCAFG00000013940	1845,208	1677,601	1688,115	2895,351	2066,049	2142,576	-0,4467	1,85E-04	1,46E-02
ENSCAFG00000016982	1078,354	1014,098	985,795	1426,221	1228,413	1238,625	-0,3382	1,88E-04	1,46E-02
ENSCAFG00000019954	1049,151	1123,730	1107,283	1318,952	1321,584	1340,340	-0,2797	1,91E-04	1,47E-02
ENSCAFG00000003483	726,835	677,207	719,676	405,760	560,836	554,510	0,4805	1,90E-04	1,47E-02
ENSCAFG00000000245	3656,887	3730,921	3627,307	4340,228	4281,353	4159,649	-0,2144	2,05E-04	1,55E-02
ENSCAFG00000019704	2027,999	2166,378	2067,623	1833,846	1687,032	1660,250	0,2736	2,05E-04	1,55E-02
ENSCAFG00000010769	842,566	802,827	765,958	1019,529	990,510	979,416	-0,3094	2,20E-04	1,65E-02
ENSCAFG00000016456	2588,267	2865,283	2971,268	2303,968	2264,151	2391,121	0,2753	2,27E-04	1,69E-02



ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000006065	5572,399	5341,144	5477,408	4371,009	4821,385	4731,385	0,2353	2,29E-04	1,70E-02
ENSCAFG00000000094	2066,936	2059,030	2074,565	2448,549	2390,792	2425,573	-0,2285	2,32E-04	1,71E-02
ENSCAFG00000000445	1929,573	1894,582	1917,208	2344,077	2171,884	2300,070	-0,2475	2,34E-04	1,71E-02
ENSCAFG00000028476	10095,647	10337,403	10211,998	8928,575	9143,444	8544,875	0,2034	2,42E-04	1,76E-02
ENSCAFG00000002105	2573,125	2505,553	2714,406	1953,242	2200,831	2237,729	0,2856	2,44E-04	1,76E-02
ENSCAFG00000010476	5618,908	6289,006	5684,517	6926,828	6799,690	7046,221	-0,2398	2,57E-04	1,84E-02
ENSCAFG00000013324	1527,218	1543,987	1416,212	1736,837	1797,390	1915,358	-0,2805	2,65E-04	1,88E-02
ENSCAFG00000006790	2371,947	2479,287	2417,048	2947,586	2842,175	2760,248	-0,2342	2,72E-04	1,89E-02
ENSCAFG00000015266	6347,906	6380,366	6335,928	5577,095	5288,145	5644,359	0,2075	2,70E-04	1,89E-02
ENSCAFG00000031938	472,659	480,783	476,699	206,144	384,444	314,168	0,6597	2,71E-04	1,89E-02
ENSCAFG00000019218	862,035	947,862	909,430	735,964	598,829	744,816	0,3863	2,82E-04	1,95E-02
ENSCAFG00000023287	772,262	749,153	797,198	1003,672	930,808	937,582	-0,3086	2,88E-04	1,97E-02
ENSCAFG00000020062	1535,871	1710,719	1541,172	2431,759	1871,566	1942,427	-0,3833	2,91E-04	1,99E-02
ENSCAFG00000018282	5093,251	5036,229	4775,087	5739,399	5725,960	5741,973	-0,2072	3,00E-04	2,03E-02
ENSCAFG00000015043	79633,824	80046,355	81471,522	91402,230	88711,667	92812,423	-0,1786	3,06E-04	2,06E-02
ENSCAFG00000010241	3543,319	3764,039	3829,789	3072,579	3207,623	3216,325	0,2297	3,21E-04	2,15E-02
ENSCAFG00000011821	13455,094	13195,835	13526,906	11533,831	11637,357	12094,235	0,1881	3,40E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000015228	521,331	553,871	498,682	852,561	584,355	768,604	-0,4867	3,48E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000007907	509,433	462,511	437,360	609,106	583,451	633,258	-0,3732	3,54E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000006211	616,512	677,207	644,469	838,570	792,408	792,392	-0,3223	3,52E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000014559	3051,191	3087,974	2960,855	3471,809	3597,495	3488,658	-0,2143	3,44E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000000240	1929,573	1966,528	1941,506	1570,802	1684,319	1668,453	0,2454	3,51E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000016734	2105,874	1980,232	2164,814	1646,358	1819,100	1729,154	0,2670	3,54E-04	2,26E-02
ENSCAFG00000010768	1287,103	1348,705	1371,087	1540,021	1604,716	1678,297	-0,2681	3,57E-04	2,27E-02
ENSCAFG00000014584	184,953	192,998	211,738	310,616	270,468	261,670	-0,5148	3,67E-04	2,32E-02
ENSCAFG00000013421	1127,026	1251,634	1129,267	1344,137	1471,743	1507,678	-0,3021	3,76E-04	2,33E-02
ENSCAFG00000010370	11201,042	11005,475	11136,470	15261,222	12747,270	12633,160	-0,2855	3,73E-04	2,33E-02
ENSCAFG00000001432	1684,050	1633,063	1681,173	2090,361	1917,699	1947,349	-0,2525	3,73E-04	2,33E-02



ENSCAFG00000010883	196,851	196,424	189,754	289,162	248,758	286,278	-0,4995	3,96E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000006941	1781,394	1725,565	1675,388	2603,390	1959,309	2122,069	-0,3669	3,94E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000007617	842,566	901,040	753,230	1134,261	983,273	1063,085	-0,3489	4,02E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000011265	9765,759	9845,200	9484,223	12210,097	11393,122	10661,202	-0,2358	3,97E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000014597	18796,031	19645,863	18661,831	22518,254	21410,385	21433,143	-0,1948	3,81E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000001480	2976,561	3003,466	2916,887	2634,172	2368,177	2530,569	0,2402	3,99E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000004034	4361,008	4264,236	4496,241	3418,641	3950,279	3623,185	0,2554	4,00E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000005088	1102,150	1149,996	1114,226	953,302	903,670	920,356	0,2776	3,84E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000019791	1869,003	1974,522	2105,805	1553,080	1715,979	1635,642	0,2782	3,87E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000013762	5827,657	5485,036	5966,834	5287,000	4276,830	4037,427	0,3455	4,00E-04	2,35E-02
ENSCAFG00000003518	2703,998	2406,198	2496,883	3214,362	3046,608	2889,853	-0,2661	4,07E-04	2,37E-02
ENSCAFG000000031319	179,545	179,294	175,869	367,516	234,285	244,444	-0,6608	4,11E-04	2,38E-02
ENSCAFG00000006052	512,678	586,989	585,460	867,486	685,668	699,700	-0,4187	4,29E-04	2,47E-02
ENSCAFG00000018832	6937,377	6829,173	6921,388	6085,460	5848,077	6159,496	0,1933	4,40E-04	2,52E-02
ENSCAFG00000006695	519,168	539,025	444,302	765,813	570,787	734,152	-0,4626	4,47E-04	2,54E-02
ENSCAFG00000001308	1316,306	1422,935	1288,938	1857,166	1585,720	1576,582	-0,3170	4,59E-04	2,59E-02
ENSCAFG00000014278	489,964	464,795	423,475	898,268	502,944	693,958	-0,6037	4,63E-04	2,60E-02
ENSCAFG000000032033	8080,628	8461,094	8497,271	7382,025	7204,035	7344,803	0,1912	4,66E-04	2,60E-02
ENSCAFG00000007775	635,980	647,515	585,460	743,426	767,984	916,255	-0,3781	5,10E-04	2,83E-02
ENSCAFG00000019116	208,749	218,122	224,465	140,850	142,018	164,877	0,5384	5,21E-04	2,88E-02
ENSCAFG00000009264	214,157	187,288	168,927	286,364	241,522	302,684	-0,5417	5,31E-04	2,92E-02
ENSCAFG00000001007	464,006	483,067	479,013	312,481	356,403	397,016	0,4181	5,35E-04	2,92E-02
ENSCAFG000000005749	8241,786	7869,537	8102,722	7436,126	6481,280	6206,252	0,2671	5,45E-04	2,96E-02
ENSCAFG00000019226	1280,613	1346,421	1478,692	1114,673	1107,200	1145,934	0,2853	5,64E-04	3,05E-02
ENSCAFG000000031890	10933,887	11054,581	10973,328	9456,529	9547,789	9997,594	0,1846	5,72E-04	3,08E-02
ENSCAFG00000001757	139,526	198,708	172,398	380,574	213,480	260,029	-0,7421	5,76E-04	3,08E-02
ENSCAFG00000029621	1255,737	1256,202	1174,391	1466,331	1551,346	1419,087	-0,2669	5,83E-04	3,10E-02
ENSCAFG00000000185	1233,023	1203,670	1198,689	1427,154	1427,419	1452,719	-0,2447	5,85E-04	3,10E-02

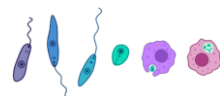


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000025580	215,238	253,524	237,192	326,473	327,456	309,246	-0,4486	5,95E-04	3,14E-02
ENSCAFG00000003816	1585,624	1498,307	1634,892	1373,986	1204,894	1306,709	0,2804	6,03E-04	3,16E-02
ENSCAFG00000002416	302,848	272,939	285,788	418,818	368,162	369,127	-0,4230	6,08E-04	3,17E-02
ENSCAFG000000032121	864,198	814,248	888,604	675,333	689,286	718,567	0,3009	6,17E-04	3,19E-02
ENSCAFG000000011629	817,689	758,289	868,934	498,105	658,531	666,889	0,4221	6,17E-04	3,19E-02
ENSCAFG000000019825	1598,604	1534,851	1618,693	1793,737	1951,168	1888,289	-0,2455	6,35E-04	3,24E-02
ENSCAFG00000000507	3197,207	3276,404	3233,915	3558,558	3899,623	3861,887	-0,2219	6,34E-04	3,24E-02
ENSCAFG000000010491	4918,032	4856,935	4841,038	4357,951	4256,025	4199,022	0,1901	6,36E-04	3,24E-02
ENSCAFG000000007894	270,400	299,205	263,804	384,306	371,780	356,002	-0,4157	6,52E-04	3,29E-02
ENSCAFG000000015715	1189,759	1316,728	1277,368	1099,748	1001,364	1001,564	0,2865	6,50E-04	3,29E-02
ENSCAFG000000032626	2673,713	2779,633	2714,406	2150,059	2294,907	2444,440	0,2451	6,66E-04	3,34E-02
ENSCAFG000000015237	1619,154	1740,411	1595,552	1947,646	1981,924	1922,741	-0,2401	6,70E-04	3,34E-02
ENSCAFG000000006703	1608,338	1728,991	1571,255	1877,687	1943,932	2020,354	-0,2515	6,79E-04	3,36E-02
ENSCAFG000000005849	2630,449	2652,871	2576,719	2898,149	3140,684	3135,937	-0,2233	6,81E-04	3,36E-02
ENSCAFG000000005078	3111,761	3188,470	3199,204	2675,215	2792,423	2770,912	0,2053	6,91E-04	3,40E-02
ENSCAFG000000003550	10319,538	10693,708	11369,034	10045,113	7310,775	7956,733	0,3554	7,03E-04	3,44E-02
ENSCAFG000000004973	233,625	247,814	204,795	333,935	313,888	296,122	-0,4587	7,60E-04	3,69E-02
ENSCAFG000000009242	385,049	428,251	381,822	533,550	550,886	474,123	-0,3824	7,64E-04	3,69E-02
ENSCAFG000000010917	3164,759	3132,512	3093,914	4468,951	3490,755	3695,369	-0,3114	7,66E-04	3,69E-02
ENSCAFG000000008371	684,652	694,337	667,610	838,570	793,312	899,029	-0,3069	7,74E-04	3,71E-02
ENSCAFG000000030307	723,590	757,147	711,577	847,897	892,815	976,956	-0,3107	7,81E-04	3,73E-02
ENSCAFG000000011326	750,630	704,615	696,536	910,394	846,682	880,162	-0,2930	7,91E-04	3,73E-02
ENSCAFG000000006006	10385,516	10590,928	10799,773	9061,030	8645,928	9708,035	0,2129	7,90E-04	3,73E-02
ENSCAFG000000004620	4165,239	4177,444	4202,354	3339,354	3640,010	3756,070	0,2245	7,84E-04	3,73E-02
ENSCAFG000000013490	3266,430	3461,408	3298,709	3833,728	3812,783	3867,629	-0,1997	7,97E-04	3,74E-02
ENSCAFG000000019016	7122,331	7391,038	6944,529	7715,028	8689,347	8963,219	-0,2416	8,44E-04	3,90E-02
ENSCAFG000000012052	3882,941	3768,607	3800,863	3222,757	3380,397	3376,280	0,1986	8,46E-04	3,90E-02
ENSCAFG000000018376	2099,384	2226,904	2369,609	1530,693	1848,951	1949,810	0,3287	8,40E-04	3,90E-02



ENSCAFG00000000820	1869,003	1828,345	2185,641	1774,149	1188,612	1383,815	0,4369	8,39E-04	3,90E-02
ENSCAFG00000015822	4726,589	4751,871	5198,562	4090,243	4206,274	4317,143	0,2184	8,83E-04	4,03E-02
ENSCAFG00000019919	837,158	863,354	875,876	727,569	709,187	677,553	0,2855	8,81E-04	4,03E-02
ENSCAFG00000012374	1143,250	1084,902	1165,135	1494,314	1268,214	1383,815	-0,2890	9,35E-04	4,25E-02
ENSCAFG00000004076	12825,604	12826,968	12506,400	13981,447	14420,734	14544,416	-0,1705	9,46E-04	4,28E-02
ENSCAFG00000011356	453,190	400,843	378,351	543,811	492,089	575,018	-0,3861	9,60E-04	4,33E-02
ENSCAFG00000002825	786,323	808,538	797,198	1067,101	909,098	972,854	-0,3018	9,67E-04	4,34E-02
ENSCAFG00000004354	1241,676	1226,510	1302,822	1409,431	1571,247	1533,107	-0,2597	9,79E-04	4,34E-02
ENSCAFG00000017181	1770,578	1612,507	1800,348	2164,984	2000,920	2010,511	-0,2526	9,79E-04	4,34E-02
ENSCAFG00000016387	1661,336	1529,141	1596,709	1831,981	1968,355	1857,118	-0,2408	9,79E-04	4,34E-02
ENSCAFG00000011943	1130,271	1015,240	1100,341	1544,685	1269,119	1267,335	-0,3297	9,87E-04	4,34E-02
ENSCAFG00000006491	22726,563	22739,546	22800,548	18853,360	20604,409	20406,970	0,1894	9,89E-04	4,34E-02
ENSCAFG00000000121	1416,895	1362,409	1316,707	1710,719	1591,147	1570,840	-0,2500	1,00E-03	4,37E-02
ENSCAFG00000008123	5584,297	5654,053	5248,315	8849,289	6010,901	6704,983	-0,3873	1,01E-03	4,40E-02
ENSCAFG00000015300	5160,310	5268,056	5013,436	6358,765	5775,711	5778,065	-0,2140	1,03E-03	4,45E-02
ENSCAFG00000017913	3004,683	2961,212	3187,634	2123,941	2703,775	2570,763	0,3068	1,03E-03	4,45E-02
ENSCAFG00000018577	1468,812	1434,355	1441,667	1715,383	1688,841	1668,453	-0,2232	1,04E-03	4,46E-02
ENSCAFG00000030576	1031,846	1044,932	1114,226	866,553	862,965	916,255	0,2697	1,05E-03	4,48E-02
ENSCAFG00000019974	2543,921	2576,357	2426,304	2989,562	2844,888	2893,134	-0,2096	1,06E-03	4,51E-02
ENSCAFG00000008582	7289,979	7087,265	7118,085	7694,506	8806,942	8586,710	-0,2230	1,07E-03	4,53E-02
ENSCAFG00000001866	2647,755	2606,049	2673,910	3054,856	3133,448	2943,991	-0,2039	1,07E-03	4,53E-02
ENSCAFG00000004944	290,950	276,365	276,532	362,852	358,212	382,251	-0,3869	1,10E-03	4,63E-02
ENSCAFG00000018946	1294,674	1149,996	1229,929	1094,152	950,708	931,840	0,3047	1,14E-03	4,77E-02
ENSCAFG00000012666	301,766	269,513	268,432	439,340	360,021	346,159	-0,4462	1,15E-03	4,78E-02
ENSCAFG00000010793	482,393	465,937	441,988	373,112	358,212	360,104	0,3498	1,15E-03	4,78E-02
ENSCAFG00000006266	947,481	970,702	861,992	1377,717	1024,883	1186,127	-0,3679	1,16E-03	4,79E-02
ENSCAFG00000007179	947,481	1079,192	953,398	1200,489	1198,562	1200,893	-0,2728	1,16E-03	4,79E-02
ENSCAFG00000002921	7001,192	6789,203	6797,586	8135,712	7917,745	7477,689	-0,1926	1,18E-03	4,85E-02



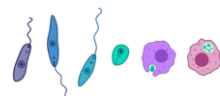
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

ENSCAFG00000006022	256,339	275,223	285,788	465,457	317,506	373,228	-0,5001	1,19E-03	4,85E-02
ENSCAFG00000007083	1137,842	1261,912	1123,482	1353,465	1450,938	1424,829	-0,2637	1,20E-03	4,85E-02
ENSCAFG00000005707	2005,285	1925,416	1899,853	2121,143	2445,971	2375,536	-0,2520	1,21E-03	4,85E-02
ENSCAFG00000001100	2701,835	2842,443	2786,142	3061,386	3261,897	3334,445	-0,2136	1,21E-03	4,85E-02
ENSCAFG00000003967	15052,616	15604,317	15504,280	13655,907	13754,062	13824,209	0,1628	1,20E-03	4,85E-02
ENSCAFG00000024219	1720,824	1754,115	1767,951	1393,574	1487,121	1556,075	0,2403	1,21E-03	4,85E-02
ENSCAFG00000013170	853,382	883,910	904,802	1004,605	1080,063	1095,896	-0,2683	1,23E-03	4,93E-02
ENSCAFG00000006370	2079,915	2119,556	2061,838	2378,590	2436,925	2387,020	-0,2020	1,26E-03	4,97E-02
ENSCAFG00000002366	14501,001	15197,764	14790,389	13465,620	12948,991	13120,407	0,1703	1,27E-03	4,97E-02
ENSCAFG00000016880	4372,906	4933,449	4729,963	4045,469	4045,259	4014,459	0,2134	1,27E-03	4,97E-02
ENSCAFG00000014567	7045,537	7033,591	7564,700	5453,968	6289,510	6443,313	0,2509	1,26E-03	4,97E-02
ENSCAFG00000015002	3667,703	3685,241	3845,987	2751,703	3305,317	3258,159	0,2654	1,27E-03	4,97E-02
ENSCAFG00000029475	981,010	1064,346	1099,184	500,903	876,533	807,978	0,5242	1,28E-03	5,00E-02



Tabla S5. Términos GO enriquecidos en la categoría de procesos biológicos en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BCN150 con respecto al control de células no infectadas.

ID_GO	Descripción término GO (Procesos biológicos)	Nº genes ref	Nº DEG BCN-NI	Nº de genes esperados	FC	p-Valor	FDR
GO:0043407	Negative regulation of MAP kinase activity	51	6	0,48	12,41	1,54E-05	5,01E-03
GO:0001755	Neural crest cell migration	48	5	0,45	10,99	1,38E-04	2,09E-02
GO:0061180	Mammary gland epithelium development	49	5	0,46	10,77	1,51E-04	2,18E-02
GO:0007229	Integrin-mediated signaling pathway	74	6	0,7	8,56	1,07E-04	1,88E-02
GO:0071901	Negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	94	7	0,89	7,86	4,70E-05	1,14E-02
GO:0030879	Mammary gland development	87	6	0,82	7,28	2,45E-04	3,10E-02
GO:0050731	Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	138	9	1,31	6,88	1,06E-05	4,20E-03
GO:0048762	Mesenchymal cell differentiation	111	7	1,05	6,65	1,26E-04	2,00E-02
GO:0001667	Ameboidal-type cell migration	143	9	1,36	6,64	1,39E-05	4,61E-03
GO:0051607	Defense response to virus	112	7	1,06	6,59	1,33E-04	2,04E-02
GO:0043409	Negative regulation of MAPK cascade	118	7	1,12	6,26	1,81E-04	2,48E-02
GO:0050730	Regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	190	11	1,8	6,11	3,26E-06	2,59E-03
GO:0006469	Negative regulation of protein kinase activity	164	9	1,55	5,79	3,87E-05	9,87E-03
GO:0043405	Regulation of MAP kinase activity	209	11	1,98	5,55	7,73E-06	3,45E-03
GO:0051348	Negative regulation of transferase activity	197	10	1,87	5,36	2,71E-05	7,59E-03
GO:0033673	Negative regulation of kinase activity	178	9	1,69	5,33	7,07E-05	1,42E-02
GO:0007411	Axon guidance	182	9	1,72	5,22	8,32E-05	1,61E-02
GO:0097485	Neuron projection guidance	183	9	1,73	5,19	8,66E-05	1,63E-02
GO:0050920	Regulation of chemotaxis	173	8	1,64	4,88	3,19E-04	3,93E-02
GO:0070663	Regulation of leukocyte proliferation	179	8	1,7	4,72	3,97E-04	4,81E-02
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	382	16	3,62	4,42	1,18E-06	1,41E-03
GO:0071900	Regulation of protein serine/threonine kinase activity	340	14	3,22	4,34	6,79E-06	3,13E-03
GO:2000147	Positive regulation of cell motility	396	16	3,75	4,26	1,85E-06	1,89E-03
GO:0043408	Regulation of MAPK cascade	500	20	4,74	4,22	1,05E-07	2,14E-04
GO:0051272	Positive regulation of cellular component movement	402	16	3,81	4,2	2,24E-06	2,00E-03
GO:0040017	Positive regulation of locomotion	407	16	3,86	4,15	2,60E-06	2,19E-03
GO:0007169	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	314	12	2,98	4,03	6,26E-05	1,38E-02
GO:0043410	Positive regulation of MAPK cascade	369	14	3,5	4	1,65E-05	4,90E-03

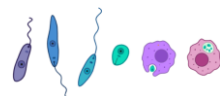


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0001933	Negative regulation of protein phosphorylation	298	11	2,82	3,89	1,70E-04	2,38E-02
GO:0042326	Negative regulation of phosphorylation	328	12	3,11	3,86	9,34E-05	1,71E-02
GO:0022603	Regulation of anatomical structure morphogenesis	650	23	6,16	3,73	9,34E-08	2,23E-04
GO:0006935	Chemotaxis	358	12	3,39	3,54	2,05E-04	2,79E-02
GO:0042330	Taxis	359	12	3,4	3,53	2,10E-04	2,84E-02
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	553	18	5,24	3,43	7,75E-06	3,36E-03
GO:0030334	Regulation of cell migration	662	21	6,27	3,35	1,93E-06	1,83E-03
GO:0034097	Response to cytokine	572	18	5,42	3,32	1,21E-05	4,42E-03
GO:0071345	Cellular response to cytokine stimulus	509	16	4,82	3,32	3,80E-05	1,00E-02
GO:0001944	Vasculature development	382	12	3,62	3,31	3,63E-04	4,43E-02
GO:0010563	Negative regulation of phosphorus metabolic process	417	13	3,95	3,29	2,22E-04	2,89E-02
GO:0045936	Negative regulation of phosphate metabolic process	417	13	3,95	3,29	2,22E-04	2,86E-02
GO:2000145	Regulation of cell motility	696	21	6,6	3,18	4,11E-06	2,45E-03
GO:0008284	Positive regulation of cell population proliferation	603	18	5,71	3,15	2,39E-05	6,96E-03
GO:0043549	Regulation of kinase activity	642	19	6,08	3,12	1,58E-05	4,89E-03
GO:0060548	Negative regulation of cell death	642	19	6,08	3,12	1,58E-05	4,79E-03
GO:0001932	Regulation of protein phosphorylation	1070	31	10,14	3,06	3,95E-08	1,88E-04
GO:0040012	Regulation of locomotion	732	21	6,94	3,03	8,70E-06	3,65E-03
GO:0051270	Regulation of cellular component movement	746	21	7,07	2,97	1,15E-05	4,43E-03
GO:0042325	Regulation of phosphorylation	1184	33	11,22	2,94	3,31E-08	4,73E-04
GO:0001934	Positive regulation of protein phosphorylation	726	20	6,88	2,91	2,54E-05	7,25E-03
GO:0032101	Regulation of response to external stimulus	623	17	5,9	2,88	1,18E-04	1,98E-02
GO:1902533	Positive regulation of intracellular signal transduction	664	18	6,29	2,86	8,00E-05	1,59E-02
GO:2000026	Regulation of multicellular organismal development	936	25	8,87	2,82	3,88E-06	2,52E-03
GO:0051338	Regulation of transferase activity	719	19	6,81	2,79	7,00E-05	1,43E-02
GO:0016477	Cell migration	656	17	6,22	2,73	2,14E-04	2,83E-02
GO:0051240	Positive regulation of multicellular organismal process	967	25	9,16	2,73	6,75E-06	3,21E-03
GO:0042327	Positive regulation of phosphorylation	781	20	7,4	2,7	6,83E-05	1,44E-02
GO:0019220	Regulation of phosphate metabolic process	1328	34	12,59	2,7	1,45E-07	2,30E-04
GO:0051174	Regulation of phosphorus metabolic process	1329	34	12,6	2,7	1,47E-07	2,10E-04
GO:0009605	Response to external stimulus	1410	36	13,36	2,69	6,19E-08	1,77E-04



GO:0009888	Tissue development	1193	30	11,31	2,65	1,26E-06	1,39E-03
GO:0010941	Regulation of cell death	1009	25	9,56	2,61	1,37E-05	4,66E-03
GO:0040011	Locomotion	902	22	8,55	2,57	5,89E-05	1,34E-02
GO:0051130	Positive regulation of cellular component organization	785	19	7,44	2,55	2,12E-04	2,83E-02
GO:0010562	Positive regulation of phosphorus metabolic process	827	20	7,84	2,55	1,45E-04	2,14E-02
GO:0045937	Positive regulation of phosphate metabolic process	827	20	7,84	2,55	1,45E-04	2,12E-02
GO:0002682	Regulation of immune system process	926	22	8,78	2,51	8,56E-05	1,63E-02
GO:0044092	Negative regulation of molecular function	800	19	7,58	2,51	2,67E-04	3,35E-02
GO:0043067	Regulation of programmed cell death	931	22	8,82	2,49	9,24E-05	1,71E-02
GO:0051094	Positive regulation of developmental process	892	21	8,45	2,48	1,41E-04	2,13E-02
GO:0045944	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	942	22	8,93	2,46	1,09E-04	1,90E-02
GO:0044419	Interspecies interaction between organisms	858	20	8,13	2,46	2,33E-04	2,97E-02
GO:0045595	Regulation of cell differentiation	1040	24	9,86	2,43	9,56E-05	1,73E-02
GO:0042127	Regulation of cell population proliferation	1086	25	10,29	2,43	6,58E-05	1,42E-02
GO:0042981	Regulation of apoptotic process	914	21	8,66	2,42	3,15E-04	3,92E-02
GO:0031399	Regulation of protein modification process	1398	32	13,25	2,42	4,61E-06	2,63E-03
GO:1902531	Regulation of intracellular signal transduction	1143	26	10,83	2,4	4,96E-05	1,18E-02
GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process	1861	42	17,64	2,38	1,24E-07	2,22E-04
GO:0050793	Regulation of developmental process	1714	38	16,24	2,34	8,67E-07	1,13E-03
GO:0009653	Anatomical structure morphogenesis	1638	36	15,52	2,32	3,37E-06	2,53E-03
GO:0048585	Negative regulation of response to stimulus	1153	25	10,93	2,29	1,25E-04	2,01E-02
GO:0071310	Cellular response to organic substance	1417	30	13,43	2,23	4,51E-05	1,11E-02
GO:0010033	Response to organic substance	1749	37	16,58	2,23	3,97E-06	2,46E-03
GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	1401	29	13,28	2,18	8,24E-05	1,61E-02
GO:0065009	Regulation of molecular function	2207	43	20,92	2,06	6,61E-06	3,26E-03
GO:0030154	Cell differentiation	2329	45	22,07	2,04	3,63E-06	2,59E-03
GO:0048513	Animal organ development	2142	41	20,3	2,02	1,55E-05	4,92E-03
GO:0050790	Regulation of catalytic activity	1727	33	16,37	2,02	1,29E-04	2,00E-02
GO:0048869	Cellular developmental process	2368	45	22,44	2,01	4,86E-06	2,67E-03
GO:0032268	Regulation of cellular protein metabolic process	1973	37	18,7	1,98	6,98E-05	1,44E-02
GO:0051246	Regulation of protein metabolic process	2082	39	19,73	1,98	3,81E-05	9,89E-03
GO:0070887	Cellular response to chemical stimulus	1817	34	17,22	1,97	1,25E-04	2,02E-02
GO:0048583	Regulation of response to stimulus	2729	50	25,86	1,93	3,64E-06	2,48E-03
GO:0032879	Regulation of localization	1965	36	18,62	1,93	1,23E-04	2,03E-02



ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0006950	Response to stress	2099	38	19,89	1,91	1,13E-04	1,94E-02
GO:0009966	Regulation of signal transduction	2053	37	19,46	1,9	1,59E-04	2,27E-02
GO:0048522	Positive regulation of cellular process	4099	72	38,85	1,85	3,70E-08	2,65E-04
GO:0031325	Positive regulation of cellular metabolic process	2512	44	23,81	1,85	6,01E-05	1,34E-02
GO:0051173	Positive regulation of nitrogen compound metabolic process	2377	41	22,53	1,82	1,68E-04	2,37E-02
GO:0007275	Multicellular organism development	3163	54	29,98	1,8	1,34E-05	4,68E-03
GO:0048731	System development	2872	49	27,22	1,8	4,03E-05	1,01E-02
GO:0048518	Positive regulation of biological process	4475	76	42,41	1,79	5,87E-08	2,10E-04
GO:0010604	Positive regulation of macromolecule metabolic process	2641	44	25,03	1,76	2,14E-04	2,80E-02
GO:0042221	Response to chemical	2884	48	27,33	1,76	1,03E-04	1,84E-02
GO:0009893	Positive regulation of metabolic process	2836	47	26,88	1,75	1,43E-04	2,12E-02
GO:0032502	Developmental process	3783	62	35,85	1,73	6,43E-06	3,28E-03
GO:0048856	Anatomical structure development	3499	57	33,16	1,72	3,01E-05	8,28E-03
GO:0048519	Negative regulation of biological process	3852	62	36,51	1,7	1,17E-05	4,39E-03
GO:0048523	Negative regulation of cellular process	3521	55	33,37	1,65	1,15E-04	1,95E-02
GO:0051171	Regulation of nitrogen compound metabolic process	4484	67	42,5	1,58	5,22E-05	1,20E-02
GO:0031323	Regulation of cellular metabolic process	4744	70	44,96	1,56	4,98E-05	1,17E-02
GO:0080090	Regulation of primary metabolic process	4580	67	43,41	1,54	1,19E-04	1,98E-02
GO:0050896	Response to stimulus	5856	85	55,5	1,53	6,18E-06	3,27E-03
GO:0060255	Regulation of macromolecule metabolic process	4899	70	46,43	1,51	1,71E-04	2,37E-02
GO:0019222	Regulation of metabolic process	5251	74	49,77	1,49	1,27E-04	2,00E-02
GO:0050789	Regulation of biological process	9256	118	87,72	1,35	1,33E-05	4,76E-03
GO:0050794	Regulation of cellular process	8874	113	84,1	1,34	3,39E-05	9,15E-03
GO:0065007	Biological regulation	9881	124	93,65	1,32	1,03E-05	4,20E-03
GO:0009987	Cellular process	12768	147	121,01	1,21	6,61E-05	1,41E-02

Los términos GO enriquecidos con un valor FDR < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Nº genes ref, número de genes presentes en el genoma de referencia del perro asociados al término GO; Nº DEG BCN-NI, número de genes diferencialmente expresados presentes en la muestra asociados al término GO.

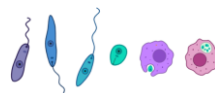
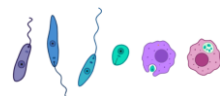


Tabla S6. Términos GO enriquecidos en la categoría de procesos biológicos en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas.

ID_GO	Descripción términos GO (Procesos biológicos)	Nº genes ref	Nº de DEG BOS-NI	Nº de genes esperados	FC	p-Valor	FDR
GO:0048522	Positive regulation of cellular process	4099	113	53,24	2,12	1,28E-16	1,83E-12
GO:0048518	Positive regulation of biological process	4475	117	58,12	2,01	1,40E-15	1,00E-11
GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process	1861	64	24,17	2,65	6,30E-13	3,00E-09
GO:0001932	Regulation of protein phosphorylation	1070	46	13,9	3,31	1,73E-12	6,17E-09
GO:0031399	Regulation of protein modification process	1398	53	18,16	2,92	2,90E-12	8,30E-09
GO:0042325	Regulation of phosphorylation	1184	48	15,38	3,12	3,95E-12	9,40E-09
GO:0009987	Cellular process	12768	216	165,83	1,3	9,20E-12	1,88E-08
GO:0009605	Response to external stimulus	1410	52	18,31	2,84	1,32E-11	2,35E-08
GO:0008284	Positive regulation of cell population proliferation	603	32	7,83	4,09	4,12E-11	5,35E-08
GO:0009888	Tissue development	1193	46	15,49	2,97	6,08E-11	5,43E-08
GO:0051174	Regulation of phosphorus metabolic process	1329	49	17,26	2,84	5,85E-11	5,57E-08
GO:0048583	Regulation of response to stimulus	2729	77	35,44	2,17	3,96E-11	5,66E-08
GO:0042127	Regulation of cell population proliferation	1086	44	14,1	3,12	3,69E-11	5,85E-08
GO:0050793	Regulation of developmental process	1714	57	22,26	2,56	5,80E-11	5,93E-08
GO:0001934	Positive regulation of protein phosphorylation	726	35	9,43	3,71	5,79E-11	6,36E-08
GO:0019220	Regulation of phosphate metabolic process	1328	49	17,25	2,84	5,70E-11	6,79E-08
GO:0050896	Response to stimulus	5856	126	76,06	1,66	1,03E-10	8,66E-08
GO:0009966	Regulation of signal transduction	2053	63	26,66	2,36	1,23E-10	9,79E-08
GO:0051240	Positive regulation of multicellular organismal process	967	40	12,56	3,18	1,81E-10	1,29E-07
GO:0010941	Regulation of cell death	1009	41	13,1	3,13	1,74E-10	1,31E-07
GO:0048519	Negative regulation of biological process	3852	94	50,03	1,88	2,28E-10	1,48E-07
GO:0031325	Positive regulation of cellular metabolic process	2512	71	32,63	2,18	2,24E-10	1,53E-07
GO:0032502	Developmental process	3783	93	49,13	1,89	2,66E-10	1,65E-07
GO:0031401	Positive regulation of protein modification process	897	38	11,65	3,26	2,87E-10	1,71E-07
GO:0048869	Cellular developmental process	2368	68	30,75	2,21	3,00E-10	1,72E-07
GO:0048523	Negative regulation of cellular process	3521	88	45,73	1,92	4,20E-10	2,00E-07
GO:0010033	Response to organic substance	1749	56	22,72	2,47	3,83E-10	2,03E-07
GO:1902533	Positive regulation of intracellular signal transduction	664	32	8,62	3,71	4,19E-10	2,07E-07
GO:0042327	Positive regulation of phosphorylation	781	35	10,14	3,45	3,80E-10	2,09E-07

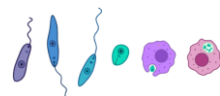


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0009653	Anatomical structure morphogenesis	1638	54	21,27	2,54	4,11E-10	2,10E-07
GO:0009967	Positive regulation of signal transduction	1051	41	13,65	3	5,64E-10	2,52E-07
GO:1902531	Regulation of intracellular signal transduction	1143	43	14,84	2,9	5,91E-10	2,56E-07
GO:0009893	Positive regulation of metabolic process	2836	76	36,83	2,06	5,62E-10	2,59E-07
GO:0048856	Anatomical structure development	3499	87	45,44	1,91	6,77E-10	2,84E-07
GO:0051173	Positive regulation of nitrogen compound metabolic process	2377	67	30,87	2,17	1,04E-09	4,01E-07
GO:0043408	Regulation of MAPK cascade	500	27	6,49	4,16	1,07E-09	4,02E-07
GO:0010604	Positive regulation of macromolecule metabolic process	2641	72	34,3	2,1	9,87E-10	4,03E-07
GO:0022603	Regulation of anatomical structure morphogenesis	650	31	8,44	3,67	1,02E-09	4,07E-07
GO:0007275	Multicellular organism development	3163	81	41,08	1,97	1,14E-09	4,17E-07
GO:0050731	Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	138	15	1,79	8,37	1,27E-09	4,55E-07
GO:0065007	Biological regulation	9881	177	128,33	1,38	1,35E-09	4,58E-07
GO:0030154	Cell differentiation	2329	66	30,25	2,18	1,32E-09	4,59E-07
GO:0045937	Positive regulation of phosphate metabolic process	827	35	10,74	3,26	1,61E-09	5,23E-07
GO:0010562	Positive regulation of phosphorus metabolic process	827	35	10,74	3,26	1,61E-09	5,36E-07
GO:0048731	System development	2872	75	37,3	2,01	2,32E-09	7,36E-07
GO:0008150	Biological_process	15171	235	197,04	1,19	2,43E-09	7,55E-07
GO:0010646	Regulation of cell communication	2329	65	30,25	2,15	2,81E-09	8,36E-07
GO:0010647	Positive regulation of cell communication	1161	42	15,08	2,79	2,96E-09	8,47E-07
GO:0032270	Positive regulation of cellular protein metabolic process	1161	42	15,08	2,79	2,96E-09	8,64E-07
GO:0023051	Regulation of signaling	2340	65	30,39	2,14	3,25E-09	9,12E-07
GO:0023056	Positive regulation of signaling	1169	42	15,18	2,77	3,60E-09	9,89E-07
GO:0051247	Positive regulation of protein metabolic process	1225	43	15,91	2,7	4,44E-09	1,20E-06
GO:0051246	Regulation of protein metabolic process	2082	60	27,04	2,22	4,91E-09	1,30E-06
GO:0042981	Regulation of apoptotic process	914	36	11,87	3,03	5,69E-09	1,48E-06
GO:0042221	Response to chemical	2884	74	37,46	1,98	7,57E-09	1,90E-06
GO:0043410	Positive regulation of MAPK cascade	369	22	4,79	4,59	7,56E-09	1,93E-06
GO:0048584	Positive regulation of response to stimulus	1438	47	18,68	2,52	9,02E-09	2,18E-06
GO:0043067	Regulation of programmed cell death	931	36	12,09	2,98	9,01E-09	2,22E-06

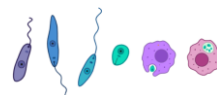


GO:2000026	Regulation of multicellular organismal development	936	36	12,16	2,96	1,03E-08	2,45E-06
GO:0050730	Regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	190	16	2,47	6,48	1,06E-08	2,48E-06
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	382	22	4,96	4,43	1,36E-08	3,15E-06
GO:0048513	Animal organ development	2142	60	27,82	2,16	1,49E-08	3,17E-06
GO:0065009	Regulation of molecular function	2207	61	28,66	2,13	1,45E-08	3,18E-06
GO:0019222	Regulation of metabolic process	5251	111	68,2	1,63	1,47E-08	3,18E-06
GO:0045595	Regulation of cell differentiation	1040	38	13,51	2,81	1,44E-08	3,22E-06
GO:0032268	Regulation of cellular protein metabolic process	1973	57	25,62	2,22	1,43E-08	3,23E-06
GO:0006950	Response to stress	2099	59	27,26	2,16	2,03E-08	4,26E-06
GO:0030334	Regulation of cell migration	662	29	8,6	3,37	2,23E-08	4,63E-06
GO:0051716	Cellular response to stimulus	4855	104	63,06	1,65	2,40E-08	4,90E-06
GO:2000147	Positive regulation of cell motility	396	22	5,14	4,28	2,51E-08	5,05E-06
GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	1401	45	18,2	2,47	2,88E-08	5,71E-06
GO:0070887	Cellular response to chemical stimulus	1817	53	23,6	2,25	3,04E-08	5,94E-06
GO:0002376	Immune system process	1348	44	17,51	2,51	3,15E-08	6,07E-06
GO:0051272	Positive regulation of cellular component movement	402	22	5,22	4,21	3,24E-08	6,16E-06
GO:0051094	Positive regulation of developmental process	892	34	11,58	2,93	3,41E-08	6,41E-06
GO:0050789	Regulation of biological process	9256	165	120,21	1,37	3,70E-08	6,88E-06
GO:0060255	Regulation of macromolecule metabolic process	4899	104	63,63	1,63	4,02E-08	7,27E-06
GO:0040017	Positive regulation of locomotion	407	22	5,29	4,16	3,98E-08	7,29E-06
GO:0031323	Regulation of cellular metabolic process	4744	102	61,61	1,66	4,08E-08	7,30E-06
GO:0040012	Regulation of locomotion	732	30	9,51	3,16	5,20E-08	9,17E-06
GO:2000145	Regulation of cell motility	696	29	9,04	3,21	6,30E-08	1,10E-05
GO:0050794	Regulation of cellular process	8874	159	115,25	1,38	7,00E-08	1,20E-05
GO:0051172	Negative regulation of nitrogen compound metabolic process	1761	51	22,87	2,23	7,27E-08	1,24E-05
GO:0030155	Regulation of cell adhesion	538	25	6,99	3,58	7,62E-08	1,28E-05
GO:0051171	Regulation of nitrogen compound metabolic process	4484	97	58,24	1,67	7,96E-08	1,32E-05
GO:0080090	Regulation of primary metabolic process	4580	98	59,48	1,65	1,02E-07	1,67E-05

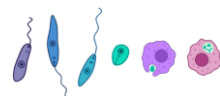


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0060548	Negative regulation of cell death	642	27	8,34	3,24	1,55E-07	2,52E-05
GO:0051270	Regulation of cellular component movement	746	29	9,69	2,99	2,56E-07	4,12E-05
GO:0071310	Cellular response to organic substance	1417	43	18,4	2,34	3,17E-07	4,98E-05
GO:0007169	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	314	18	4,08	4,41	3,16E-07	5,02E-05
GO:0050790	Regulation of catalytic activity	1727	49	22,43	2,18	3,40E-07	5,29E-05
GO:0031324	Negative regulation of cellular metabolic process	1900	52	24,68	2,11	3,59E-07	5,51E-05
GO:0044419	Interspecies interaction between organisms	858	31	11,14	2,78	4,46E-07	6,79E-05
GO:0031400	Negative regulation of protein modification process	450	21	5,84	3,59	8,23E-07	1,23E-04
GO:0034097	Response to cytokine	572	24	7,43	3,23	8,21E-07	1,23E-04
GO:0043066	Negative regulation of apoptotic process	575	24	7,47	3,21	8,97E-07	1,32E-04
GO:0010628	Positive regulation of gene expression	1692	47	21,98	2,14	9,37E-07	1,37E-04
GO:0032879	Regulation of localization	1965	52	25,52	2,04	9,79E-07	1,41E-04
GO:0045936	Negative regulation of phosphate metabolic process	417	20	5,42	3,69	1,01E-06	1,43E-04
GO:0072359	Circulatory system development	622	25	8,08	3,09	1,02E-06	1,43E-04
GO:0010563	Negative regulation of phosphorus metabolic process	417	20	5,42	3,69	1,01E-06	1,45E-04
GO:0001944	Vasculature development	382	19	4,96	3,83	1,14E-06	1,58E-04
GO:0007229	Integrin-mediated signaling pathway	74	9	0,96	9,36	1,17E-06	1,61E-04
GO:0043405	Regulation of MAP kinase activity	209	14	2,71	5,16	1,20E-06	1,64E-04
GO:0009892	Negative regulation of metabolic process	2200	56	28,57	1,96	1,22E-06	1,64E-04
GO:0040011	Locomotion	902	31	11,71	2,65	1,24E-06	1,66E-04
GO:0007167	Enzyme linked receptor protein signaling pathway	465	21	6,04	3,48	1,36E-06	1,80E-04
GO:0043069	Negative regulation of programmed cell death	590	24	7,66	3,13	1,38E-06	1,82E-04
GO:0045785	Positive regulation of cell adhesion	315	17	4,09	4,16	1,49E-06	1,93E-04
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	553	23	7,18	3,2	1,62E-06	2,09E-04
GO:0007155	Cell adhesion	597	24	7,75	3,1	1,69E-06	2,15E-04
GO:0006935	Chemotaxis	358	18	4,65	3,87	1,90E-06	2,38E-04
GO:0022610	Biological adhesion	601	24	7,81	3,07	1,89E-06	2,38E-04
GO:0042330	Taxis	359	18	4,66	3,86	1,97E-06	2,45E-04



GO:0048646	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	647	25	8,4	2,98	2,01E-06	2,48E-04
GO:0051130	Positive regulation of cellular component organization	785	28	10,2	2,75	2,14E-06	2,61E-04
GO:0042326	Negative regulation of phosphorylation	328	17	4,26	3,99	2,50E-06	3,03E-04
GO:0010837	Regulation of keratinocyte proliferation	26	6	0,34	17,77	2,87E-06	3,45E-04
GO:0009607	Response to biotic stimulus	755	27	9,81	2,75	3,13E-06	3,73E-04
GO:0001933	Negative regulation of protein phosphorylation	298	16	3,87	4,13	3,24E-06	3,83E-04
GO:0071900	Regulation of protein serine/threonine kinase activity	340	17	4,42	3,85	3,96E-06	4,64E-04
GO:0032501	Multicellular organismal process	4679	94	60,77	1,55	4,21E-06	4,89E-04
GO:0023052	Signaling	3767	80	48,92	1,64	4,54E-06	5,23E-04
GO:0001667	Ameboidal-type cell migration	143	11	1,86	5,92	4,97E-06	5,68E-04
GO:0051707	Response to other organism	729	26	9,47	2,75	5,05E-06	5,73E-04
GO:0007154	Cell communication	3842	81	49,9	1,62	5,35E-06	5,92E-04
GO:0071345	Cellular response to cytokine stimulus	509	21	6,61	3,18	5,27E-06	5,93E-04
GO:0043207	Response to external biotic stimulus	732	26	9,51	2,73	5,42E-06	5,96E-04
GO:0009790	Embryo development	778	27	10,1	2,67	5,35E-06	5,97E-04
GO:0043549	Regulation of kinase activity	642	24	8,34	2,88	5,58E-06	6,04E-04
GO:0001817	Regulation of cytokine production	469	20	6,09	3,28	5,57E-06	6,07E-04
GO:0051128	Regulation of cellular component organization	1714	45	22,26	2,02	6,72E-06	7,23E-04
GO:0045597	Positive regulation of cell differentiation	561	22	7,29	3,02	6,78E-06	7,24E-04
GO:0009887	Animal organ morphogenesis	745	26	9,68	2,69	7,33E-06	7,76E-04
GO:0044092	Negative regulation of molecular function	800	27	10,39	2,6	8,72E-06	9,16E-04
GO:0002682	Regulation of immune system process	926	30	12,03	2,49	9,09E-06	9,48E-04
GO:0051248	Negative regulation of protein metabolic process	804	27	10,44	2,59	9,51E-06	9,85E-04
GO:0048514	Blood vessel morphogenesis	289	15	3,75	4	9,69E-06	9,97E-04
GO:0043086	Negative regulation of catalytic activity	576	22	7,48	2,94	1,01E-05	1,03E-03
GO:0032101	Regulation of response to external stimulus	623	23	8,09	2,84	1,07E-05	1,08E-03
GO:0045944	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	942	30	12,23	2,45	1,07E-05	1,08E-03
GO:0098609	Cell-cell adhesion	330	16	4,29	3,73	1,10E-05	1,10E-03

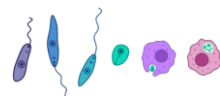


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0010605	Negative regulation of macromolecule metabolic process	2036	50	26,44	1,89	1,23E-05	1,22E-03
GO:0044093	Positive regulation of molecular function	1263	36	16,4	2,19	1,58E-05	1,56E-03
GO:0060429	Epithelium development	740	25	9,61	2,6	1,88E-05	1,83E-03
GO:0007165	Signal transduction	3532	74	45,87	1,61	1,88E-05	1,84E-03
GO:0070665	Positive regulation of leukocyte proliferation	108	9	1,4	6,42	2,02E-05	1,95E-03
GO:0001773	Myeloid dendritic cell activation	22	5	0,29	17,5	2,14E-05	2,05E-03
GO:0002684	Positive regulation of immune system process	561	21	7,29	2,88	2,15E-05	2,05E-03
GO:0016477	Cell migration	656	23	8,52	2,7	2,36E-05	2,23E-03
GO:0048762	Mesenchymal cell differentiation	111	9	1,44	6,24	2,47E-05	2,32E-03
GO:0048585	Negative regulation of response to stimulus	1153	33	14,97	2,2	2,58E-05	2,41E-03
GO:0051179	Localization	4097	82	53,21	1,54	2,78E-05	2,58E-03
GO:0001706	Endoderm formation	41	6	0,53	11,27	2,90E-05	2,67E-03
GO:0001568	Blood vessel development	361	16	4,69	3,41	3,15E-05	2,89E-03
GO:0098542	Defense response to other organism	489	19	6,35	2,99	3,30E-05	3,01E-03
GO:0051338	Regulation of transferase activity	719	24	9,34	2,57	3,35E-05	3,01E-03
GO:0006955	Immune response	719	24	9,34	2,57	3,35E-05	3,03E-03
GO:0070663	Regulation of leukocyte proliferation	179	11	2,32	4,73	3,59E-05	3,21E-03
GO:0034113	Heterotypic cell-cell adhesion	25	5	0,32	15,4	3,65E-05	3,24E-03
GO:0032269	Negative regulation of cellular protein metabolic process	772	25	10,03	2,49	3,69E-05	3,26E-03
GO:0001704	Formation of primary germ layer	91	8	1,18	6,77	4,10E-05	3,60E-03
GO:0001952	Regulation of cell-matrix adhesion	92	8	1,19	6,7	4,41E-05	3,84E-03
GO:0007369	Gastrulation	121	9	1,57	5,73	4,65E-05	4,03E-03
GO:0000902	Cell morphogenesis	550	20	7,14	2,8	5,01E-05	4,31E-03
GO:0060560	Developmental growth involved in morphogenesis	94	8	1,22	6,55	5,08E-05	4,35E-03
GO:0010648	Negative regulation of cell communication	936	28	12,16	2,3	5,15E-05	4,38E-03
GO:0023057	Negative regulation of signaling	938	28	12,18	2,3	5,32E-05	4,50E-03
GO:0002252	Immune effector process	300	14	3,9	3,59	5,82E-05	4,90E-03
GO:2001236	Regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	125	9	1,62	5,54	5,90E-05	4,93E-03
GO:0000904	Cell morphogenesis involved in differentiation	427	17	5,55	3,07	6,47E-05	5,31E-03

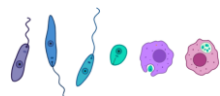


GO:0006952	Defense response	702	23	9,12	2,52	6,45E-05	5,32E-03
GO:0060485	Mesenchyme development	158	10	2,05	4,87	6,43E-05	5,35E-03
GO:0050679	Positive regulation of epithelial cell proliferation	128	9	1,66	5,41	7,01E-05	5,69E-03
GO:0048863	Stem cell differentiation	128	9	1,66	5,41	7,01E-05	5,72E-03
GO:0045765	Regulation of angiogenesis	194	11	2,52	4,37	7,15E-05	5,77E-03
GO:0050865	Regulation of cell activation	431	17	5,6	3,04	7,22E-05	5,79E-03
GO:0045860	Positive regulation of protein kinase activity	349	15	4,53	3,31	7,75E-05	6,19E-03
GO:1901342	Regulation of vasculature development	197	11	2,56	4,3	8,15E-05	6,47E-03
GO:0043085	Positive regulation of catalytic activity	1013	29	13,16	2,2	9,09E-05	7,06E-03
GO:0022008	Neurogenesis	1013	29	13,16	2,2	9,09E-05	7,10E-03
GO:0048008	Platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	31	5	0,4	12,42	9,08E-05	7,13E-03
GO:2000249	Regulation of actin cytoskeleton reorganization	31	5	0,4	12,42	9,08E-05	7,17E-03
GO:0050678	Regulation of epithelial cell proliferation	239	12	3,1	3,87	1,02E-04	7,90E-03
GO:0045348	Positive regulation of MHC class II biosynthetic process	5	3	0,06	46,2	1,11E-04	8,55E-03
GO:0051049	Regulation of transport	1193	32	15,49	2,07	1,17E-04	8,94E-03
GO:0001501	Skeletal system development	363	15	4,71	3,18	1,18E-04	8,95E-03
GO:0030099	Myeloid cell differentiation	171	10	2,22	4,5	1,20E-04	9,00E-03
GO:2001237	Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	79	7	1,03	6,82	1,19E-04	9,01E-03
GO:0035295	Tube development	638	21	8,29	2,53	1,27E-04	9,49E-03
GO:0001819	Positive regulation of cytokine production	284	13	3,69	3,52	1,28E-04	9,56E-03
GO:0050920	Regulation of chemotaxis	173	10	2,25	4,45	1,31E-04	9,70E-03
GO:0048286	Lung alveolus development	34	5	0,44	11,32	1,34E-04	9,85E-03
GO:0035987	Endodermal cell differentiation	34	5	0,44	11,32	1,34E-04	9,90E-03
GO:0002274	Myeloid leukocyte activation	81	7	1,05	6,65	1,38E-04	1,00E-02
GO:0033674	Positive regulation of kinase activity	412	16	5,35	2,99	1,40E-04	1,01E-02
GO:0048598	Embryonic morphogenesis	457	17	5,94	2,86	1,42E-04	1,03E-02
GO:0033135	Regulation of peptidyl-serine phosphorylation	112	8	1,45	5,5	1,60E-04	1,14E-02
GO:0002521	Leukocyte differentiation	251	12	3,26	3,68	1,58E-04	1,14E-02
GO:0036302	Atrioventricular canal development	6	3	0,08	38,5	1,65E-04	1,18E-02

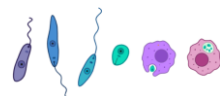


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0044089	Positive regulation of cellular component biogenesis	379	15	4,92	3,05	1,85E-04	1,30E-02
GO:0009891	Positive regulation of biosynthetic process	1480	37	19,22	1,92	1,84E-04	1,30E-02
GO:0034341	Response to interferon-gamma	86	7	1,12	6,27	1,95E-04	1,32E-02
GO:1902532	Negative regulation of intracellular signal transduction	381	15	4,95	3,03	1,95E-04	1,32E-02
GO:0000187	Activation of MAPK activity	86	7	1,12	6,27	1,95E-04	1,33E-02
GO:0002573	Myeloid leukocyte differentiation	86	7	1,12	6,27	1,95E-04	1,34E-02
GO:0007411	Axon guidance	182	10	2,36	4,23	1,94E-04	1,34E-02
GO:0045087	Innate immune response	338	14	4,39	3,19	1,94E-04	1,34E-02
GO:0001954	Positive regulation of cell-matrix adhesion	37	5	0,48	10,4	1,92E-04	1,35E-02
GO:0007492	Endoderm development	60	6	0,78	7,7	2,00E-04	1,35E-02
GO:0060284	Regulation of cell development	338	14	4,39	3,19	1,94E-04	1,35E-02
GO:0097485	Neuron projection guidance	183	10	2,38	4,21	2,02E-04	1,36E-02
GO:0010557	Positive regulation of macromolecule biosynthetic process	1394	35	18,1	1,93	2,09E-04	1,40E-02
GO:0009968	Negative regulation of signal transduction	894	26	11,61	2,24	2,13E-04	1,42E-02
GO:0043406	Positive regulation of MAP kinase activity	150	9	1,95	4,62	2,18E-04	1,44E-02
GO:0048608	Reproductive structure development	301	13	3,91	3,33	2,22E-04	1,46E-02
GO:0051674	Localization of cell	757	23	9,83	2,34	2,24E-04	1,46E-02
GO:0048870	Cell motility	757	23	9,83	2,34	2,24E-04	1,46E-02
GO:0043409	Negative regulation of MAPK cascade	118	8	1,53	5,22	2,24E-04	1,47E-02
GO:0061458	Reproductive system development	302	13	3,92	3,31	2,29E-04	1,48E-02
GO:0048468	Cell development	1235	32	16,04	2	2,41E-04	1,55E-02
GO:0010468	Regulation of gene expression	3603	71	46,79	1,52	2,41E-04	1,55E-02
GO:0007399	Nervous system development	1441	36	18,72	1,92	2,50E-04	1,58E-02
GO:0048534	Hematopoietic or lymphoid organ development	480	17	6,23	2,73	2,49E-04	1,59E-02
GO:0030097	Hemopoiesis	437	16	5,68	2,82	2,65E-04	1,67E-02
GO:0031328	Positive regulation of cellular biosynthetic process	1458	36	18,94	1,9	2,71E-04	1,70E-02
GO:0010720	Positive regulation of cell development	192	10	2,49	4,01	2,92E-04	1,81E-02
GO:0007409	Axonogenesis	269	12	3,49	3,43	2,91E-04	1,82E-02
GO:0070848	Response to growth factor	310	13	4,03	3,23	2,91E-04	1,82E-02

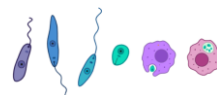


GO:0048812	Neuron projection morphogenesis	353	14	4,58	3,05	2,96E-04	1,82E-02
GO:0045893	Positive regulation of transcription, DNA-templated	1185	31	15,39	2,01	2,94E-04	1,82E-02
GO:0048864	Stem cell development	65	6	0,84	7,11	2,99E-04	1,83E-02
GO:0080134	Regulation of response to stress	864	25	11,22	2,23	3,11E-04	1,89E-02
GO:2001233	Regulation of apoptotic signaling pathway	271	12	3,52	3,41	3,10E-04	1,90E-02
GO:0035239	Tube morphogenesis	490	17	6,36	2,67	3,13E-04	1,90E-02
GO:0010838	Positive regulation of keratinocyte proliferation	8	3	0,1	28,87	3,19E-04	1,91E-02
GO:0045346	Regulation of MHC class II biosynthetic process	8	3	0,1	28,87	3,19E-04	1,92E-02
GO:0071901	Negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	94	7	1,22	5,73	3,24E-04	1,94E-02
GO:0010810	Regulation of cell-substrate adhesion	159	9	2,07	4,36	3,28E-04	1,95E-02
GO:0120039	Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis	357	14	4,64	3,02	3,30E-04	1,95E-02
GO:0006928	Movement of cell or subcellular component	1098	29	14,26	2,03	3,30E-04	1,95E-02
GO:0032147	Activation of protein kinase activity	196	10	2,55	3,93	3,41E-04	2,00E-02
GO:0014033	Neural crest cell differentiation	67	6	0,87	6,9	3,48E-04	2,03E-02
GO:0048858	Cell projection morphogenesis	359	14	4,66	3	3,49E-04	2,03E-02
GO:0002694	Regulation of leukocyte activation	403	15	5,23	2,87	3,48E-04	2,04E-02
GO:0001666	Response to hypoxia	127	8	1,65	4,85	3,58E-04	2,07E-02
GO:0046579	Positive regulation of Ras protein signal transduction	43	5	0,56	8,95	3,64E-04	2,08E-02
GO:0051336	Regulation of hydrolase activity	945	26	12,27	2,12	3,66E-04	2,08E-02
GO:0007159	Leukocyte cell-cell adhesion	43	5	0,56	8,95	3,64E-04	2,09E-02
GO:0090092	Regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	198	10	2,57	3,89	3,68E-04	2,09E-02
GO:0008285	Negative regulation of cell population proliferation	450	16	5,84	2,74	3,62E-04	2,09E-02
GO:0010631	Epithelial cell migration	68	6	0,88	6,79	3,75E-04	2,11E-02
GO:0036293	Response to decreased oxygen levels	128	8	1,66	4,81	3,76E-04	2,11E-02
GO:0071346	Cellular response to interferon-gamma	68	6	0,88	6,79	3,75E-04	2,12E-02
GO:0006469	Negative regulation of protein kinase activity	164	9	2,13	4,23	4,07E-04	2,27E-02
GO:0090132	Epithelium migration	70	6	0,91	6,6	4,33E-04	2,41E-02
GO:0009615	Response to virus	166	9	2,16	4,17	4,42E-04	2,43E-02

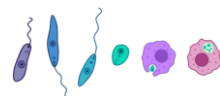


ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0070372	Regulation of ERK1 and ERK2 cascade	203	10	2,64	3,79	4,44E-04	2,43E-02
GO:0002011	Morphogenesis of an epithelial sheet	45	5	0,58	8,56	4,41E-04	2,44E-02
GO:0051241	Negative regulation of multicellular organismal process	690	21	8,96	2,34	4,41E-04	2,44E-02
GO:0002520	Immune system development	507	17	6,58	2,58	4,56E-04	2,49E-02
GO:0032946	Positive regulation of mononuclear cell proliferation	100	7	1,3	5,39	4,61E-04	2,50E-02
GO:0007162	Negative regulation of cell adhesion	206	10	2,68	3,74	4,95E-04	2,68E-02
GO:0098742	Cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	169	9	2,19	4,1	5,00E-04	2,69E-02
GO:0032944	Regulation of mononuclear cell proliferation	169	9	2,19	4,1	5,00E-04	2,70E-02
GO:0032990	Cell part morphogenesis	374	14	4,86	2,88	5,16E-04	2,75E-02
GO:0030856	Regulation of epithelial cell differentiation	102	7	1,32	5,28	5,15E-04	2,76E-02
GO:0030182	Neuron differentiation	759	22	9,86	2,23	5,22E-04	2,77E-02
GO:0048667	Cell morphogenesis involved in neuron differentiation	331	13	4,3	3,02	5,29E-04	2,80E-02
GO:0050673	Epithelial cell proliferation	73	6	0,95	6,33	5,33E-04	2,81E-02
GO:0002696	Positive regulation of leukocyte activation	248	11	3,22	3,42	5,42E-04	2,83E-02
GO:0061564	Axon development	289	12	3,75	3,2	5,39E-04	2,83E-02
GO:0032060	Bleb assembly	10	3	0,13	23,1	5,42E-04	2,84E-02
GO:0090596	Sensory organ morphogenesis	209	10	2,71	3,68	5,51E-04	2,85E-02
GO:0071902	Positive regulation of protein serine/threonine kinase activity	209	10	2,71	3,68	5,51E-04	2,86E-02
GO:0034110	Regulation of homotypic cell-cell adhesion	26	4	0,34	11,85	5,57E-04	2,87E-02
GO:1901700	Response to oxygen-containing compound	858	24	11,14	2,15	5,60E-04	2,88E-02
GO:0048699	Generation of neurons	921	25	11,96	2,09	5,71E-04	2,91E-02
GO:0051057	Positive regulation of small gtpase mediated signal transduction	48	5	0,62	8,02	5,79E-04	2,92E-02
GO:0048771	Tissue remodeling	74	6	0,96	6,24	5,70E-04	2,92E-02
GO:0010942	Positive regulation of cell death	334	13	4,34	3	5,74E-04	2,92E-02
GO:0001755	Neural crest cell migration	48	5	0,62	8,02	5,79E-04	2,93E-02
GO:0010638	Positive regulation of organelle organization	425	15	5,52	2,72	5,92E-04	2,98E-02
GO:0051347	Positive regulation of transferase activity	472	16	6,13	2,61	5,97E-04	2,99E-02
GO:0048589	Developmental growth	294	12	3,82	3,14	6,23E-04	3,12E-02



GO:0097028	Dendritic cell differentiation	27	4	0,35	11,41	6,33E-04	3,14E-02
GO:0070482	Response to oxygen levels	139	8	1,81	4,43	6,31E-04	3,14E-02
GO:0050867	Positive regulation of cell activation	253	11	3,29	3,35	6,35E-04	3,14E-02
GO:0045321	Leukocyte activation	338	13	4,39	2,96	6,39E-04	3,15E-02
GO:0051254	Positive regulation of RNA metabolic process	1313	32	17,05	1,88	6,43E-04	3,16E-02
GO:0090130	Tissue migration	76	6	0,99	6,08	6,50E-04	3,18E-02
GO:1903508	Positive regulation of nucleic acid-templated transcription	1243	31	16,14	1,92	6,71E-04	3,26E-02
GO:0032103	Positive regulation of response to external stimulus	255	11	3,31	3,32	6,76E-04	3,27E-02
GO:1902680	Positive regulation of RNA biosynthetic process	1243	31	16,14	1,92	6,71E-04	3,27E-02
GO:0061081	Positive regulation of myeloid leukocyte cytokine production involved in immune response	11	3	0,14	21	6,83E-04	3,28E-02
GO:0040007	Growth	297	12	3,86	3,11	6,79E-04	3,28E-02
GO:0010935	Regulation of macrophage cytokine production	11	3	0,14	21	6,83E-04	3,29E-02
GO:0045682	Regulation of epidermis development	50	5	0,65	7,7	6,87E-04	3,29E-02
GO:0007507	Heart development	386	14	5,01	2,79	6,96E-04	3,31E-02
GO:0045123	Cellular extravasation	28	4	0,36	11	7,16E-04	3,39E-02
GO:0033673	Negative regulation of kinase activity	178	9	2,31	3,89	7,13E-04	3,39E-02
GO:0071363	Cellular response to growth factor stimulus	299	12	3,88	3,09	7,19E-04	3,39E-02
GO:0044087	Regulation of cellular component biogenesis	726	21	9,43	2,23	7,25E-04	3,41E-02
GO:0043407	Negative regulation of MAP kinase activity	51	5	0,66	7,55	7,47E-04	3,49E-02
GO:0007423	Sensory organ development	435	15	5,65	2,66	7,45E-04	3,49E-02
GO:0032989	Cellular component morphogenesis	436	15	5,66	2,65	7,62E-04	3,55E-02
GO:0070374	Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	144	8	1,87	4,28	7,85E-04	3,64E-02
GO:0051249	Regulation of lymphocyte activation	346	13	4,49	2,89	7,86E-04	3,64E-02
GO:0051251	Positive regulation of lymphocyte activation	221	10	2,87	3,48	8,31E-04	3,83E-02
GO:0048729	Tissue morphogenesis	440	15	5,71	2,62	8,33E-04	3,83E-02
GO:0010839	Negative regulation of keratinocyte proliferation	12	3	0,16	19,25	8,46E-04	3,87E-02
GO:0051607	Defense response to virus	112	7	1,45	4,81	8,69E-04	3,97E-02
GO:0043542	Endothelial cell migration	53	5	0,69	7,26	8,78E-04	3,99E-02



ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

GO:0001775	Cell activation	396	14	5,14	2,72	8,83E-04	4,01E-02
GO:0050918	Positive chemotaxis	30	4	0,39	10,27	9,05E-04	4,09E-02
GO:0002221	Pattern recognition receptor signaling pathway	54	5	0,7	7,13	9,49E-04	4,26E-02
GO:0033138	Positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	82	6	1,06	5,63	9,44E-04	4,26E-02
GO:0031175	Neuron projection development	495	16	6,43	2,49	9,72E-04	4,33E-02
GO:0045935	Positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	1432	34	18,6	1,83	9,70E-04	4,33E-02
GO:1901888	Regulation of cell junction assembly	149	8	1,94	4,13	9,69E-04	4,34E-02
GO:0002755	Myd88-dependent toll-like receptor signaling pathway	13	3	0,17	17,77	1,03E-03	4,58E-02
GO:0022407	Regulation of cell-cell adhesion	314	12	4,08	2,94	1,08E-03	4,78E-02
GO:0002009	Morphogenesis of an epithelium	360	13	4,68	2,78	1,11E-03	4,91E-02
GO:0022612	Gland morphogenesis	85	6	1,1	5,44	1,13E-03	4,95E-02
GO:0043588	Skin development	153	8	1,99	4,03	1,14E-03	5,00E-02

Los términos GO enriquecidos con un valor FDR < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. N° genes ref, número de genes presentes en el genoma de referencia del perro asociados al término GO; N° DEG BOS-NI, número de genes diferencialmente expresados presentes en la muestra asociados al término GO.



Tabla S7. Rutas biológicas enriquecidas en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BCN150 con respecto al control de células no infectadas.

Ruta biológica	Descripción	Nº DEG BCN-NI	Nº de genes ruta	FDR
map04015	Rap1 signaling pathway	9	193	0,0156
map04151	PI3K-Akt signaling pathway	12	319	0,0156
map04640	Hematopoietic cell lineage	6	83	0,0156
map05205	Proteoglycans in cancer	7	183	0,0177
map04370	VEGF signaling pathway	4	51	0,0216
map05211	Renal cell carcinoma	4	62	0,0289
map05206	MicroRNAs in cancer	5	134	0,0384
map05219	Bladder cancer	3	39	0,0459
map04621	NOD-like receptor signaling pathway	5	129	0,0165



Tabla S8. Rutas biológicas enriquecidas en las células DH82 infectadas por *L. infantum* BOS1FL1 con respecto al control de células no infectadas.

Ruta biológica	Descripción	Nº DEG BOS-NI	Nº de genes ruta	FDR
map04151	PI3K-Akt signaling pathway	20	319	4,80E-06
map04510	Focal adhesion	12	184	0,00098
map05165	Human papillomavirus infection	15	282	0,00098
map05205	Proteoglycans in cancer	12	183	0,00098
map05200	Pathways in cancer	19	475	0,0012
map05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	7	64	0,0014
map05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	7	70	0,0021
map04015	Rap1 signaling pathway	11	193	0,0022
map04360	Axon guidance	10	164	0,0023
map05206	MicroRNAs in cancer	9	134	0,0023
map05414	Dilated cardiomyopathy (DCM)	7	74	0,0023
map04014	Ras signaling pathway	11	212	0,0032
map04640	Hematopoietic cell lineage	7	83	0,0032
map04010	MAPK signaling pathway	12	273	0,0061
map04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	8	126	0,0061
map04621	NOD-like receptor signaling pathway	8	129	0,0061
map04810	Regulation of actin cytoskeleton	10	197	0,0061
map05164	Influenza A	8	134	0,007
map04370	VEGF signaling pathway	5	51	0,0084
map04512	ECM-receptor interaction	6	76	0,0084
map04670	Leukocyte transendothelial migration	7	106	0,0084
map05323	Rheumatoid arthritis	6	76	0,0084
map04064	NF-kappa B signaling pathway	6	84	0,0109
map04380	Osteoclast differentiation	7	115	0,0109
map05167	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	8	152	0,011
map05133	Pertussis	5	62	0,0158
map05211	Renal cell carcinoma	5	62	0,0158
map04066	HIF-1 signaling pathway	6	94	0,0161
map04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	9	208	0,0174
map04630	Jak-STAT signaling pathway	7	136	0,0207
map01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	5	76	0,0304
map04071	Sphingolipid signaling pathway	6	110	0,0304
map04620	Toll-like receptor signaling pathway	5	79	0,0334
map05161	Hepatitis B	6	123	0,0464
map04145	Phagosome	6	125	0,0485
map04217	Necroptosis	6	126	0,0489
map05219	Bladder cancer	3	39	0,0305
map04978	Mineral absorption	3	38	0,0375
map04668	TNF signaling pathway	4	99	0,0323



Tabla S9. Resultados del mapeo de las lecturas frente el genoma de referencia de *L. infantum* JPCM5.

Muestra	Lecturas totales	Lecturas mapeadas totales	% total de Mapeo
BCN R1	21.413.648	8.182.463	38,21
BCN R2	22.326.356	8.500.058	38,07
BCN R3	20.144.002	7.761.730	38,53
BOS R1	20.096.416	7.566.644	37,65
BOS R2	18.457.056	6.840.244	37,06
BOS R3	19.497.644	7.480.189	38,36

Tabla S10. Análisis de calidad de lecturas mapeadas frente al genoma de *L. infantum*.

Muestra	Lecturas crudas	Lecturas limpias	Tasa de error (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
BCN R1	10706824	10706824	0,03	95,89	91,53	57,93
BCN R2	11163178	11163178	0,03	95,80	91,34	57,97
BCN R3	10072001	10072001	0,03	95,91	91,49	57,98
BOS R1	10048208	10048208	0,03	95,79	91,36	57,67
BOS R2	9228528	9228528	0,03	95,91	91,58	57,77
BOS R3	9748822	9748822	0,03	96,16	92,01	57,84

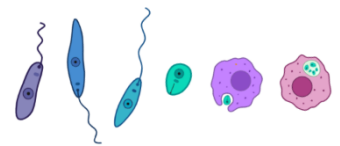


Tabla S11. Genes diferencialmente expresados al comparar *L. infantum* BCN150 y BOS1FL1 tras la infección de células DH82.

ID_Gen	Descripción	Lecturas norm. BCN1	Lecturas norm. BCN2	Lecturas norm. BCN3	Lecturas norm. BOS1	Lecturas norm. BOS2	Lecturas norm. BOS3	Log ₂ FC	p-Valor	FDR
S33-1	Putative 40S ribosomal protein S33	410,562	379,815	426,020	492,467	479,395	635,472	-0,4039	8,38E-05	1,41E-02
LINJ_27_1070	Putative histone H1	1586,006	1750,918	1798,200	2158,493	2006,483	2103,773	-0,2885	8,53E-08	5,74E-05
LINJ_06_0590	Putative 60S ribosomal protein L23a	1092,957	1127,771	1084,865	1156,226	1330,153	1440,403	-0,2479	3,24E-04	3,73E-02
LINJ_21_0020	Histone H4	1323,546	1229,235	1295,893	1356,068	1548,469	1558,198	-0,2133	4,73E-04	4,16E-02
LINJ_29_1870	Putative histone H2A	1401,347	1322,617	1470,264	1530,420	1740,902	1586,096	-0,2115	3,58E-04	3,73E-02
LINJ_33_2880	Putative translation initiation factor IF-2	1607,565	1733,858	1729,839	1869,946	2071,753	1868,184	-0,1954	3,14E-04	3,73E-02
LINJ_21_1160	Histone H2A	1605,690	1592,887	1704,079	1897,476	1889,447	1795,854	-0,1878	2,07E-04	2,99E-02
LINJ_21_1310	Putative 40S ribosomal protein S23	2870,183	3286,339	3222,890	3576,757	3383,900	3639,239	-0,1768	3,77E-04	3,73E-02
HSP83	Heat shock protein 83	13650,713	13589,821	13291,819	12600,217	12117,672	12200,026	0,1347	4,81E-06	1,39E-03
LINJ_08_1280	Beta tubulin	4051,252	4143,840	3947,123	3795,971	3649,481	3505,945	0,1491	2,42E-04	3,27E-02
LINJ_13_1460	Alpha tubulin	5940,024	6831,276	6691,484	5808,661	5666,092	5583,886	0,1902	2,72E-05	5,89E-03
LINJ_05_0960	Metallo-peptidase Family M49	869,866	884,438	850,058	766,739	744,976	689,203	0,2433	3,87E-04	3,73E-02
LINJ_05_1110	Conserved hypothetical protein	1169,820	1210,378	1095,763	1012,463	922,780	959,924	0,2637	2,91E-05	5,89E-03
LINJ_05_0100	Putative phosphoprotein phosphatase	553,977	477,686	482,492	413,958	365,736	419,515	0,3350	3,35E-04	3,73E-02
LINJ_05_0890	Conserved hypothetical protein	676,771	703,061	716,308	569,956	545,790	519,744	0,3577	2,47E-06	8,33E-04
LINJ_05_0570	Conserved hypothetical protein	342,135	344,796	356,668	272,233	274,583	264,522	0,3631	4,06E-04	3,73E-02
LINJ_05_1080	Conserved hypothetical protein	477,114	486,666	535,992	399,683	397,245	357,517	0,3772	3,52E-05	6,48E-03
LINJ_05_0140	Putative nucleolar RNA helicase II	354,320	372,631	365,584	284,468	262,204	284,154	0,3941	1,09E-04	1,70E-02
LINJ_05_0400	Putative structural maintenance of chromosome (SMC)	487,425	530,663	566,705	380,311	407,373	394,716	0,4226	2,35E-06	8,33E-04
LINJ_05_0060	Putative major vault protein	676,771	697,674	643,983	539,368	482,771	482,545	0,4235	1,13E-07	5,74E-05
LINJ_05_1170	Conserved hypothetical protein	362,757	350,184	331,899	249,802	228,444	280,021	0,4612	2,42E-05	5,89E-03
LINJ_05_0500	ATPase alpha subunit	1708,800	1820,057	1717,950	1261,245	1217,619	1266,811	0,4862	5,07E-20	1,03E-16
LINJ_05_0510	ATPase alpha subunit	1135,138	1156,504	1259,235	733,092	840,630	790,465	0,5875	4,64E-18	4,70E-15

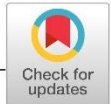


ANEXO II: ARTÍCULOS
CIENTÍFICOS DERIVADOS DE
LA TESIS DOCTORAL



Received: 5 June 2020 | Revised: 4 July 2020 | Accepted: 10 July 2020

DOI: 10.1111/tbed.13733



ORIGINAL ARTICLE

Transboundary and Emerging Diseases

WILEY

Properties of virulence emergence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* collected during the human leishmaniosis outbreak in Madrid, Spain. Hepatic histopathology and immunological parameters as virulence markers in the mouse model

Alicia Mas¹ | Abel Martínez-Rodrigo¹ | José Antonio Orden¹ |
Ricardo Molina² | Maribel Jiménez² | María Ángeles Jiménez³ |
Javier Carrión¹ | Gustavo Domínguez-Bernal¹

¹INMIVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

²Laboratorio de Entomología Médica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain

³Servicio de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Hospital Clínico Veterinario, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Javier Carrión, INMIVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.
Email: javier.carrion@ucm.es

Funding information

fellowship from the Complutense University of Madrid-Santander; PLATESA Comunidad Madrid, Grant/Award Number: S2018/BAA-4370; UCM-Santander, Grant/Award Number: PR75/18-21558

Abstract

Recent anthropic activity related to the construction of the Bosquesur Green Park in a large urban setting in Madrid (Spain) has resulted in the largest reported community outbreak of human leishmaniosis in Europe. Previous phylogenetic and molecular-typing studies of parasite isolates have implicated the *Leishmania infantum* ITS-Lombardi genotype in this outbreak. In an unusual scenario, visceral leishmaniosis (VL) is affecting a significant number of individuals, suggesting that an increase in parasite virulence has occurred. In this work, using an in vivo BALB/c model of VL, we aimed to investigate the properties of emergent virulence of the *L. infantum* POL2FL7 and BOS1FL1 isolates obtained from *Phlebotomus perniciosus* collected in the outbreak area and compare them with those of the well-characterized strain BCN150 MON-1 isolated from a dog. The *P. perniciosus* specimens were collected during an entomological survey conducted in the transmission season of 2012. We observed a range of virulence phenotypes from moderately to highly aggressive after 5 weeks of infection. IV challenge of mice with outbreak isolates from sand flies induced higher splenic and liver parasite burdens, higher serological titres of specific anti-*Leishmania* antibodies and impaired capacities to control infection, as revealed by the arginine metabolism and low ratios of Th1/Th2 cytokine profiles analysed, compared with the corresponding measures evaluated in mice infected with the BCN150 strain. The BOS1FL1 isolate showed the highest degree of virulence among the isolates, superior to that of POL2FL7, as evidenced by the analysed biomarkers and the histopathological severity of liver lesions. These results provide insight into how *L. infantum* isolates from sand flies collected in the outbreak area have been able to affect not only immunosuppressed patients but also middle-aged people with normal immunocompetence in the largest human VL outbreak in Europe.

KEYWORDS

Bosquesur, *Leishmania infantum*, leishmaniosis, outbreak, *Phlebotomus perniciosus*, virulence





Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

A further investigation of the leishmaniosis outbreak in Madrid (Spain): low-infectivity phenotype of the *Leishmania infantum* BOS1FL1 isolate to establish infection in canine cells

Alicia Mas^a, Abel Martínez-Rodrigo^a, Jose Antonio Orden^a, Luis Miguel Viñals^b, Gustavo Domínguez-Bernal^{a,*}, Javier Carrión^a

^a INMIVET, Department of Animal Health, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Centro de Transfusión Veterinaria, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmania infantum
ROS
Monocytes
Dogs
Virulence
Tropism

ABSTRACT

Human leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* is a zoonotic disease, with dogs as the main reservoir in Mediterranean Basin countries. The largest European outbreak of human leishmaniosis declared in the southwestern Madrid region (Spain) is characterized by unusual epidemiological and clinical features, such as the emergence of new wild reservoirs (hares and rabbits), whereas the seroprevalence, infection, and severity of canine leishmaniosis have not substantially changed since the first studies conducted in Madrid before the outbreak. Previous studies reported that *L. infantum* isolates from the Madrid leishmaniosis focus displayed elevated virulence in *in vivo* models of infection and increased infectivity in murine target cells. With the aim of studying whether changes in the host-parasite interaction and virulence profile have developed, we first assessed the behaviour of one circulating isolate of the outbreak, IPER/ES/2012/BOS1FL1 (BOS1FL1), compared to that of a well-characterized strain from canine leishmaniosis, MCAN/ES/1996/BCN150 (BCN150), in terms of infection capacity (percentage of infected cells, representing infectivity, and number of amastigotes per infected cell, representing the intensity of infection) in canine monocytes and macrophages. BCN150 displayed significantly higher infectivity (76.82 ± 4.40 vs 38.58 ± 2.19 ; $P < 0.0001$) and intensity of infection (3.64 ± 0.13 vs 1.83 ± 0.12 ; $P < 0.0001$) than BOS1FL1 when interacting with canine cells. Our ROS induction results did not differ significantly between the two isolates or with the responses previously described for other *L. infantum* isolates. Paradoxically, increased resilience to hydrogen peroxide exposure was observed for BOS1FL1 (% viability 40.62 ± 5.54 vs 26.37 ± 2.93 ; $P = 0.039$). Finally, we demonstrated that a decreased intracellular load of BOS1FL1 was associated with increased IFN- γ (261.21 ± 26.29 vs 69.80 ± 9.02 ; $P = 0.0151$) and decreased IL-10 production (165.06 ± 23.87 vs 264.41 ± 30.58 ; $P = 0.0002$). In this study, we provide the first detailed insight into the differences between the isolate BOS1FL1 from the outbreak in Madrid and the well-characterized strain BCN150 MON-1 obtained from a dog in their response to interacting with canine cells. However, further studies are necessary to shed light on the immune mechanisms resulting in BOS1FL1 exhibiting less virulent behaviour in canine cells than in cells derived from other host species.

1. Introduction

Visceral leishmaniosis (VL) (Kassai et al., 1988) in the Mediterranean basin is a protozoan zoonotic disease caused by *Leishmania infantum* and transmitted by *Phlebotomus* species of sandfly vectors to humans and other mammals. Dogs are considered the main domestic reservoir for *L. infantum* (Ashford, 1996). In Spain, canine leishmaniosis (CanL) is endemic, and human leishmaniosis (HumL) has significantly increased

in incidence since 2009 due to the human leishmaniosis outbreak in the southwestern region of Madrid (Spain). This outbreak is the largest outbreak in Europe to date, with more than 700 cases (corresponding to a great increase in VL incidence (35.9%), with 64.1 % increase in cutaneous leishmaniosis (CL) incidence). Remarkably, 70% of the patients are immunocompetent and atypical localized lymphadenopathic leishmaniosis (LLL) has appeared in 19% of the VL cases (Arce et al., 2013; Horrillo et al., 2015). Even though the dog is the main reservoir in

* Corresponding author.

E-mail address: gdbernal@ucm.es (G. Domínguez-Bernal).

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110148>

Received 14 February 2020; Received in revised form 28 October 2020; Accepted 3 November 2020

Available online 7 November 2020

0165-2427/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Received: 23 January 2019 | Revised: 9 April 2019 | Accepted: 10 May 2019

DOI: 10.1002/jbio.201900030

FULL ARTICLE



Label-free bioanalysis of *Leishmania infantum* using refractive index tomography with partially coherent illumination

Juan M. Soto^{1*} | Alicia Mas² | José A. Rodrigo¹ | Tatiana Alieva¹ | Gustavo Domínguez-Bernal²

¹Department of Optics, Faculty of Physical Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Science, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

*Correspondence

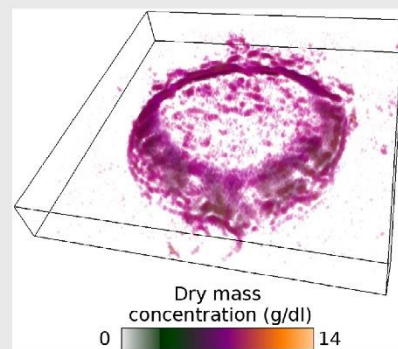
Juan M. Soto, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.
Email: juansoto@ucm.es

Funding information

Banco Santander, Grant/Award Number: PR75/18-21567; Comunidad de Madrid, Grant/Award Number: S2013/ABI-2906; Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España, Grant/Award Number: TEC2014-57394-P; Comunidad de Madrid (Spain) PLATESA, Grant/Award Number: S2013/ABI-2906; Santander-UCM 2018 project, Grant/Award Number: PR75/18-21567

Abstract

In this work, we report the use of refractive index (RI) tomography for quantitative analysis of unstained DH82 cell line infected with *Leishmania infantum*. The cell RI is reconstructed by using a modality of optical diffraction tomography technique that employs partially coherent illumination, thus enabling inherent compatibility with conventional wide-field microscopes. The experimental results demonstrate that the cell dry mass concentration (DMC) obtained from the RI allows for reliable detection and quantitative characterization of the infection and its temporal evolution. The RI provides important insight for studying morphological changes, particularly membrane blebbing linked to an apoptosis (cell death) process induced by the disease. Moreover, the results evidence that infected DH82 cells exhibit a higher DMC than healthy samples. These findings open up promising perspectives for clinical diagnosis of *Leishmania*.



KEYWORDS

optical microscopy, optical properties, optical tomography, partially coherent illumination, refractive index, scattering measurement

1 | INTRODUCTION

The study of *Leishmania* infection has attracted great attention from the scientific community because, according to the World Health Organization, 20 000 people die annually from this disease [1]. To date, there is still no vaccine on the market capable of preventing human leishmaniasis, and although there are vaccines for veterinary use, their effectiveness is quite limited [2]. The antileishmanial treatments

present important disadvantages such as the appearance of resistances and their high toxicity making necessary the development of new drugs [3]. Consequently, a tool that provides an accurate intracellular screening of the sample is needed and, in this regard, bioanalysis based on refractive index (RI) emerges as an attractive alternative to traditional staining techniques.

In this work, for the first time, we apply optical diffraction tomography (ODT) based on partially coherent



illumination (PC-ODT) for three-dimensional (3D) RI imaging and detection of *Leishmania* parasites in DH82 cell line (blood macrophages) for a better understanding of the disease spreading in host cells. Leishmaniasis is a vector-borne zoonosis widely distributed throughout the world whose responsible etiological agent is a protozoan belonging to the genus *Leishmania* with several species according to their geographical distribution [4]. *Leishmania* is a dimorphic parasite with an intracellular phase called amastigote, and an extracellular flagellated phase known as promastigote. The promastigotes need over a period of 4 to 24 hours in order to transform into amastigotes. Thereafter, the infection is sustained by amastigote forms in the infected hosts. The sizes of these intracellular amastigotes typically measures 1–5 μm in length by 1–2 μm in width. Vector transmission is carried out from a diptera known as Sandfly and the main species affected are human and canines, whereas more than 50 species have been described worldwide as reservoirs [5].

ODT is a computational imaging technique that allows reconstructing the specimen 3D RI distribution, which has been widely adopted for obtaining quantitative biological information such as the shape, density, volume, dry and wet mass, membrane deformability and chemical composition of cells [6–11]. This enables the label-free study of the sample without using any chemical marker or fluorescent tagging, thus avoiding photobleaching or modifying its behaviour. Thanks to its noninvasive nature, the 3D RI analysis has been recently exploited in several biomedicine applications. For instance, in Ref. [12] RI tomograms have been applied to find morphological and behavioral differences between diabetic and non-diabetic red blood cells. It has also led to promising results in cancerous epithelial cells bioanalysis [13] and influenza virus presence in human alveolar epithelial cells [14]. In this way, RI changes have even been considered a biomarker for the monitorization and diagnosis of certain diseases, such as malaria infection induced by the *Plasmodium falciparum* parasite and detected by blood screening [15–17]. Note that the so-called quantitative two-dimensional (2D) phase imaging is an alternative label-free imaging tool that has been also considered for the study of the specimen morphology and dynamics [18].

Most implementations of ODT available in the literature apply a coherent laser source for illuminating the sample, see for example [19–21]. Nevertheless, it has been recently demonstrated the benefits of using partially coherent and quasi-monochromatic illumination (eg, halogen or light-emitting diode [LED] lamp) for ODT (referred to as PC-ODT) providing speckle-free imaging [22–25]. Here we consider the PC-ODT technique reported in [23, 24] that allows for straightforward 3D label-free imaging at video-rate (10 fps, a rate about 5 \times faster than in C-ODT with similar spatial resolution). The experimental setup comprises an

affordable high-speed optical scanning system enabling compatibility with commercial wide-field microscopes. These advantages of PC-ODT encourage its application in 3D analysis of living cells, in particular for the monitorization and diagnosis of certain diseases including *Leishmania* infection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample description

2.1.1 | Cell culture preparation

DH82 (ATCC CRL-10389TM) is a macrophage cell line obtained from a dog with a neoplasm of histiocytic origin [26]. It was maintained in dulbecco's modified eagle medium medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Then, it was incubated at 37°C 5% CO₂ in six-well plates.

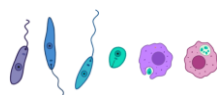
Leishmania infantum BCN150 strain cells (M/CAN/ES/96/BCN150 zymodeme MON-1), previously reported in [27], were cultivated in Schneider's Insect Medium (Biowest, France) supplemented with 20% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin at 26°C until the stationary phase and they were used to infect DH82 cells.

2.1.2 | Infection protocol

DH82 macrophages were cultured in 24-well plates overnight at a concentration of 1×10^6 cells per well. On the following day, promastigotes were added to the cells at a ratio 10:1 (parasites: cells) according to the protocol previously described in [28]. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4 hours and, subsequently, extracellular parasites were eliminated by washing twice with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline establishing the initial infection time point. Then, fresh medium was added, and cells were cultivated for 24 and 72 hours. Finally, the cells were fixed using methanol 70% during 5 minutes at room temperature.

2.1.3 | Staining and fixation of the samples

The samples were divided into two groups according to whether they undergo staining or not. For those ones that were stained, each slide is immersed in 250 μL 5% Giemsa's stain improved R66 solution Gurr and stored for 15 minutes at ambient temperature. After that, we washed five times each sample with distilled water and let it dry out. After the procedure of staining, the sample is fixed with methanol and all the cytoplasm water content has been replaced by the fixation medium.



2.2 | Tomographic reconstruction of the sample

2.2.1 | Experimental setup

The 3D RI distribution ($n(\mathbf{r})$, where $\mathbf{r} = (x, y, z)$ denotes the spatial coordinates vector) of a transparent (weakly absorbing) sample was reconstructed by using the PC-ODT technique. Particularly, PC-ODT allows the RI reconstruction from the measurement of a through focus-series intensity images provided by a wide-field microscope under partially coherent illumination. Here we applied the experimental setup reported in [23, 24] consisting of a microscope equipped with a fast optical refocusing module as sketched in Figure 1, in which the illumination is provided by a quasi-monochromatic LED source (central wavelength $\lambda_0 = 450$ nm and full width at half maximum of 20 nm). The microscope includes two high numerical aperture (NA) lenses, an Abbe condenser lens of $NA_c = 0.95$ (Nikon) and an objective lens of $NA_o = 1.4$ (100x magnification, Olympus UPLSAPO). The optical refocusing module comprises a relay lens and an electrically tunable lens (ETL, Optotune EL-10-30-C) used for optical axial scanning of the sample, by modifying the focal length of the ETL. It is worth underlining that this experimental module can be easily included in a common wide-field microscope. The sCMOS camera (Hamamatsu, Orca Flash 4.0, 16-bit gray-level) has a pixel size of $6.5 \mu\text{m}$.

A Gaussian illumination has been used instead of the conventional bright-field illumination since, as it has been demonstrated in [29], it allows for proper collection of relevant object spatial frequency content otherwise attenuated by the optical transfer function (OTF) of the microscope when bright-field illumination is applied. Here, as in Ref. [24], each measurement of the intensity stack of axially

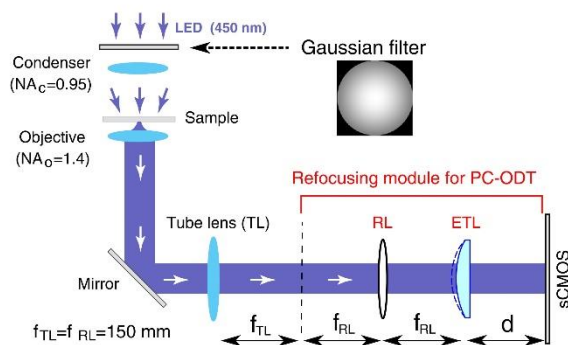


FIGURE 1 Sketch of the wide-field microscope including two high-NA lenses (condenser and objective) and a refocusing module comprising the lenses relay lens and electrically tunable lens required for axial scanning in PC-ODT. PC, coherent illumination; ODT, optical diffraction tomography

scanned images has a size of $400 \times 400 \times 50$ voxels, that corresponds to a 3D volume of $40 \times 40 \times 12 \mu\text{m}^3$. The transverse Δx , Δy and axial Δz Nyquist distances [30] are often used for the estimation of the spatial resolution limits of ODT (see for example [31]). In our case $\Delta x = \Delta y = \lambda_0/2$ ($NA_o + NA_c$) ≈ 100 nm and $\Delta z = \lambda_0/2(n_{imm} - (n_{imm}^2 - NA_o^2)^{1/2}) \approx 250$ nm, where $n_{imm} = 1.518$ is the RI of the objective immersion oil (Olympus Type F) and $\lambda_0 = 450$ nm.

2.2.2 | RI deconvolution

The intensity images obtained with the setup from Figure 1 are described by the convolution of object scattering potential and the microscope OTF itself. A reliable 3D reconstruction of the object RI can be obtained by performing a direct (non-iterative) Wiener deconvolution algorithm that is described in the frequency domain ($\boldsymbol{\rho} = [\rho_x, \rho_y, \rho_z]$) as follows,

$$P(\boldsymbol{\rho}) = \frac{I(\boldsymbol{\rho})H_E^*(\boldsymbol{\rho})}{|H_E(\boldsymbol{\rho})|^2 + \beta}, \quad (1)$$

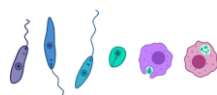
where P denotes the scattering potential, I is the measured intensity stack and β serves as a regularization parameter. Note that $H_E(\boldsymbol{\rho})$ is an effective transfer function of the system which takes into account the phase and amplitude OTFs of the microscope in the approximation of weakly absorbing sample [23]. Then, the inverse Fourier transform is applied over Equation (1) and the result is inserted in the following expression,

$$n^2(\mathbf{r}) = P(\mathbf{r})k_0^{-2} + n_m^2, \quad (2)$$

where n_m is the RI of the immersion medium (typically water or an aqueous solution) and k_0 is the wavenumber. Finally, we only use the real part of $n(\mathbf{r})$ as the sample is almost transparent and the imaginary part of $n(\mathbf{r})$ is negligible. We underline that deconvolution process has been performed by using both the phase and absorption OTFs (included in the function $H_E(\boldsymbol{\rho})$) which have been calculated taking into account the illumination pattern measured in the back focal plane of the condenser lens, as reported in Ref. [29]. This allows for a realistic OTFs calculation that better approximates the experimental conditions of the microscope and therefore yields a more reliable RI reconstruction. More details regarding this PC-ODT technique can be found in Refs. [23, 24, 29].

2.2.3 | Segmentation procedure based on the RI gradient

For accurate cell structure analysis, first a proper segmentation must be performed to separate the cell from the



surrounding medium (background). For this purpose, the RI gradient modulus ($|\nabla n|$) has been computed:

By normalizing the gradient modulus to the range $[0, 1]$ ($|\nabla n_n(\mathbf{r})| = |\nabla n(\mathbf{r})|/\max[|\nabla n(\mathbf{r})|]$) and fixing a low threshold (τ) for $|\nabla n_n|$ the RI background can be suppressed. In this way, we can define a refined version of the RI (further referred to as $\hat{n}(r)$) as

$$|\nabla n(\mathbf{r})| = \sqrt{\left(\frac{n_{x+1,y,z} - n_{x-1,y,z}}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{n_{x,y+1,z} - n_{x,y-1,z}}{\Delta y}\right)^2 + \left(\frac{n_{x,y,z+1} - n_{x,y,z-1}}{\Delta z}\right)^2}. \quad (3)$$

$$\hat{n}(\mathbf{r}) = \begin{cases} n(\mathbf{r}), & |\nabla n_n| > \tau \text{ and } n(\mathbf{r}) > n_m, \\ n_m, & \text{elsewhere} \end{cases}, \quad (4)$$

where in this case, $\tau = 0.01$ has been considered. This RI gradient modulus has been successfully applied in similar segmentation tasks as it accounts for RI local variations that are different for the background and for sample itself, typically involving little variations in background in comparison with steep changes in the cell [32–34]. By taking into account the gradient along with the RI itself, one gets a better discrimination of cell structures. For instance, regions with low RI and low RI gradient modulus values correspond to the background. Rather, high RI and high RI gradient modulus are associated with fine details (mainly vesicles and organelles dissolved within the cytoplasm). This gradient information can be easily obtained and incorporated to enhance the detection of different sample components.

2.2.4 | Derivation of dry mass concentration

As reported in [6, 35, 36], for biological samples immersed in an aqueous medium it exists a linear relationship linking the dry mass concentration (or density, further referred to as DMC) of the sample and its RI, as follows:

$$C(\mathbf{r}) = \left(\frac{\hat{n}(\mathbf{r}) - n_m}{\alpha}\right), \quad (5)$$

where $C(\mathbf{r})$ is the DMC, α represents the so-called specific RI increment and n_m accounts for the surrounding medium RI. We underline that the RI contrast of the cell is indeed $\Delta n(\mathbf{r}) = \hat{n}(\mathbf{r}) - n_m$. Let us recall that only the real part of the reconstructed RI, $n(\mathbf{r})$, has been used for the estimation of cell dry mass concentration. The imaginary part of $n(\mathbf{r})$ is

negligible, according with the weak absorption approximation.

As stated by Barer [36], the main solid components of the cell protoplasm are proteins, lipids and carbohydrates (typically conforming complexes with proteins), and other components (such as amino acids or nucleic acids) whose RI is close to that of proteins. Although this chemical composi-

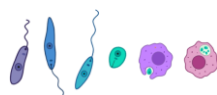
tion is variable, an average value of $\alpha = 0.002 \text{ dL/g}$ is widely accepted within the visible range when nucleated cells are considered [6, 33, 36]. Moreover, as explained in Ref. [37], the communication between *Leishmania* and the macrophages is regulated by proteins, so their effect is expected to prevail in the cell RI.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The samples of DH82 cells were divided into four categories, according to the presence of the parasite (parasited or healthy groups) and the period of time (24 or 72 hours) from the preparation, and labeled as *P24*, *H24*, *P72* and *H72* respectively. The four groups have been analyzed with the same microscope shown in Figure 1 by considering stained and unstained cells separately.

3.1 | Stained cells results

In conventional clinical practice, staining techniques are considered mandatory when it comes to *Leishmania* study. Straightforward inspection of unstained samples intensity distribution obtained with an optical microscope (eg. under conventional bright field illumination) does not provide enough contrast to permit the parasite observation. For this reason, firstly stained samples are displayed in Figure 2, that have been acquired with a conventional CMOS camera (Thorlabs DCC1240C, exposure time 10 ms). Note that the images shown in Figure 2 correspond to stained cells as they are usually observed for clinical diagnosis of *Leishmania*. Other non-quantitative imaging modalities such as differential interference contrast (DIC) could be used as well. We underline that either the nucleus, some intracellular structures and the parasites are dyed by Giemsa in a purple bluish color.



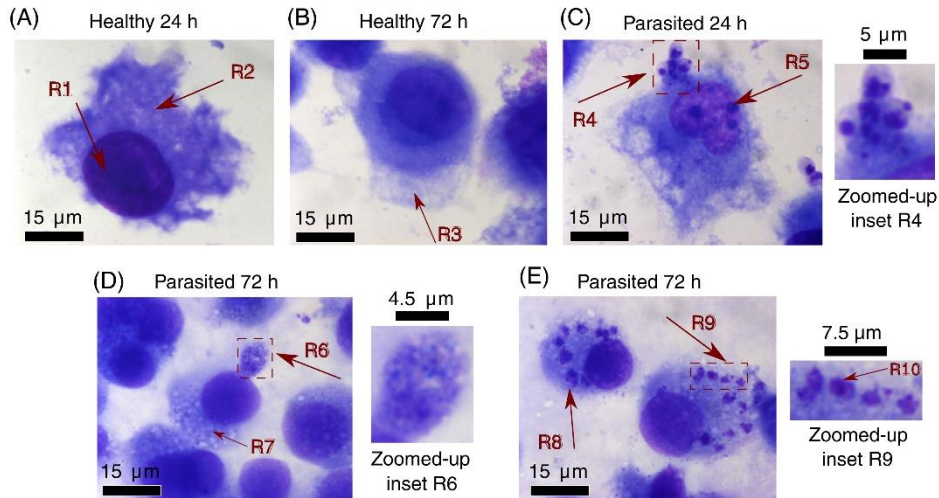


FIGURE 2 DH82 cell images, corresponding to the healthy control (A and B) and parasitized groups (C-E). Cells were infected with promastigotes of *Leishmania infantum* BCN150 at a ratio 10:1 (parasites: cells). After 24 hours (A, C) or 72 hours (B, D, E) cells were fixed in methanol, stained with Giemsa and evaluated by optic microscopy (100 \times magnification, $NA_c = 1.4$). Particular features of the cells are marked with red arrows while a close-up view of the intracellular amastigotes within the dashed boxes have been shown in the insets (C-E)

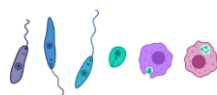
Healthy DH82 cells (see Figure 2A) are composed of a big nucleus (R1, dyed in dark purple) that occupies most of the cell volume (R2). Moreover, some samples present recognizable membrane projections (see R3 in Figure 2B) regulated by proteins (particularly actin) that they need to perform phagocytosis.

After applying Giemsa stain to infected samples, one is able to recognize the *Leishmania* into the apoptosis blebs (see R4 in Figure 2C) and other intranuclear inclusions immersed within the nucleus plasma (see R5). Particularly, these blebs or membrane extrusions are used for the egress of amastigotes from the host cell to neighboring cells. In this way, other cells uptake these parasites and the infection is spread. The apoptotic structures appear into the 24 to 72 hours after the infection, as also shown in regions R6-R7 in Figure 2D. Indeed, parasitized cells manifest certain amastigotes located within the cytoplasm (see R8-R9 in Figure 2E) that have been engulfed by the host. Once stained, the parasites identification can also be achieved by identifying certain structures, such as their nuclei (see R10) or their kinetoplast (typically rounded shaped). Other studies have also reported morphological changes between parasitized and healthy macrophages like a certain cell shrinkage that takes place as the infection progresses, see for example [38]. In this way, the staining procedure helps to localize the parasite and some cell structures providing qualitative information. Conversely, in this work we consider a quantitative characterization of the cell by analyzing its RI and its DMC along with their temporal evolution in order to obtain information about the parasite spreading in the host cell.

3.2 | Analysis of unstained cells via 3D RI contrast distribution

The ODT techniques are based on a deconvolution process that only provides the function $P(\mathbf{r})$ and therefore a priori knowledge of the value of the surrounding medium n_m is required to estimate the cell's RI from the expression Equation (2). In our case the surrounding medium is methanol with $n_m = 1.333$ (at a wavelength of $\lambda = 450 \text{ nm}$ and 300 K) according to Ref. [39]. Other works (for example Ref. [40]) have reported slightly different values of n_m for the same wavelength and temperature. Thus, in our analysis we have considered the 3D RI contrast of the cell given by $\Delta n(\mathbf{r})$ in order to avoid possible uncertainties arising from a tabulated value of n_m . The 3D RI contrast $\Delta n(\mathbf{r})$, directly calculated from $P(\mathbf{r})$ without using the value of n_m , has been represented in Figure 3. Specifically, Figure 3A,C) displays two xy-slices of the RI contrast corresponding to healthy macrophages belonging to H24 and H72 groups respectively, while Figure 3B,D) show the whole studied 3D RI contrast of these samples. One identifies characteristic cell structures such as a rounded nucleus (M1 region within the dashed line circle), long-thin pseudopods (M2), fine cell membrane (M3), nuclear envelope (M4) and the typical surface roughness of membrane projections (M5), which have also been recognized in 2D stained images shown in Figure 2B.

Note that in our case the samples have been fixed with methanol and the resulting cell shape is about $20 \times 20 \times 12 \mu\text{m}^3$. We observed that this region covers most of the cell's structure and therefore is good enough for the



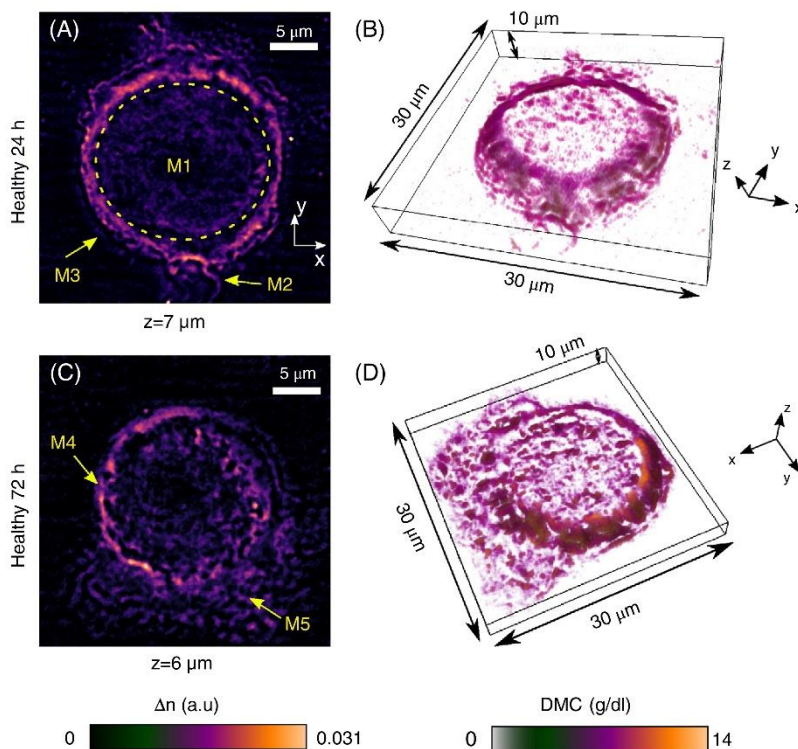


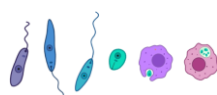
FIGURE 3 Results of healthy DH82 samples. Two-dimensional xy-slices of the refractive index contrast distribution for *H24* and *H72* macrophages are shown in (A) and (C) respectively, while the corresponding three-dimensional dry mass concentration reconstructions are displayed in (B, D). The boxes in (B, D) represent the same volume of $30 \times 30 \times 10 \mu\text{m}^3$

proposed analysis based on the calculation of the average DMC of this region. The live (not fixed) cells could have bigger size and therefore would require an extended axial scanning range, which also can be achieved by using the considered setup. In the reconstructed 3D RI contrast it is observed that part of the cell's boundary at the top and bottom is missing, which makes difficult to estimate the cell's volume. This *vanishing* effect is due to the well-known missing-cone problem which results from the limited NA of the condenser and objective lenses [41, 42]. Note that the missing-cone problem affects to all the ODT modalities and can be avoided by performing multiple object rotations as reported in Ref. [43], which in turns also provides isotropic resolution. Nevertheless, it has been proposed iterative and machine learning methods to mitigate the boundary degradation allowing better estimation of the cell's volume in presence of the missing-cone problem [42]. Here, we have considered the analysis of the average DMC instead of the dry mass because it avoids integrating the DMC over the cell's volume, thus preventing such a side effect of the missing-cone problem in the analysis. The average DMC can provide quantitative data of the cell during the course of infection. According to Equation (5), the RI contrast and DMC are linearly related. Therefore, in order to help the visualization of the average DMC we have applied a similar colorbar as in the case of the RI contrast, see Figure 3B,D.

Let us underline that this representation has been created by using a open-source software, Drishti imaging suite [34]. The inspection of the RI contrast in 3D enables the detection of local variations of the cell's DMC. It was found that the DMC values in the nuclear membrane (above 12 g/dL) are significantly larger than in the rest of the structure ($3\text{-}3.5 \text{ g/dL}$) for both healthy groups. From this preliminary analysis we conclude that no relevant differences between healthy cells *H24* and *H72* arise with regard to their RI contrast and average DMC.

In the case of DH82 cells infected by *Leishmania*, the most remarkable difference in their structure lies in cellular fragmentation and presence of apoptotic blebs (as indicated by yellow arrows in Figure 4) that do not appear in healthy samples. These apoptosis evidences can appear as early as 24 hours after the infection (see Figure 4A) and have also been appreciated in the bright-field intensity images of the stained cells displayed in Figure 2(C,D). For instance, from the RI contrast is possible a direct detection of intracellular amastigotes exhibiting high RI contrast values (above 0.03, colored in orange in the first column of Figure 4) and located within the blebs. We recall that such blebs are used for spreading the parasitological infection to neighbor cells.

Nevertheless, the reconstructed RI-contrast maps also enable a quantitative estimation of the modifications induced by the parasite such as DMC changes in certain cell regions



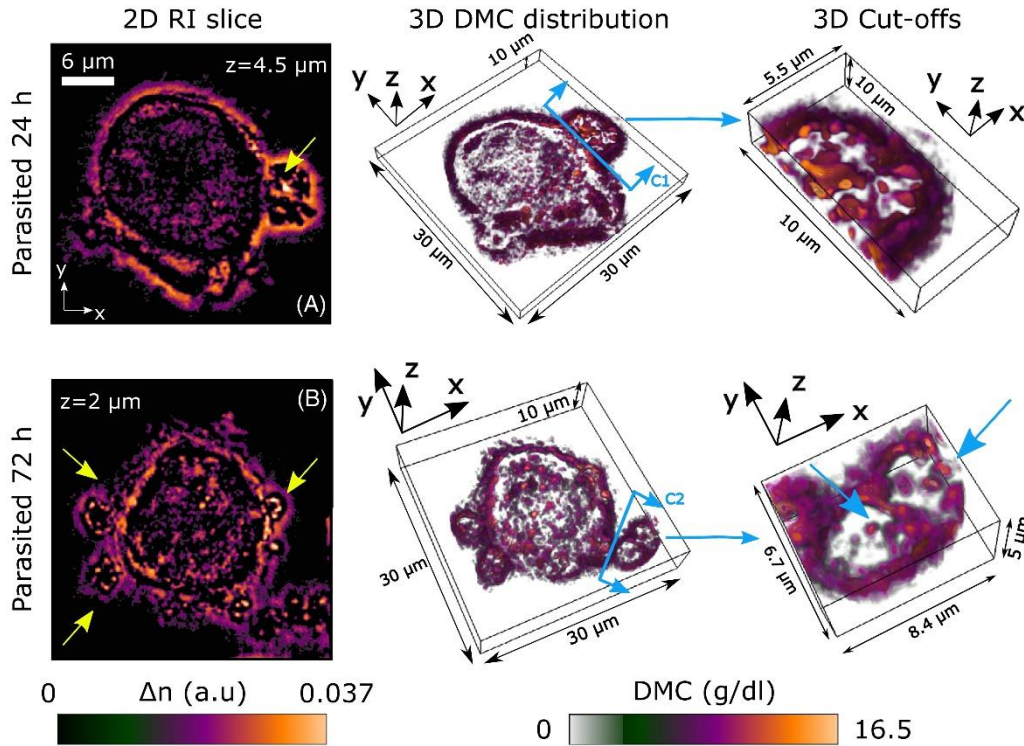


FIGURE 4 Results of parasited DH82 samples, for *P24* (A) and *P72* (B). For each cell three graphs are included: a two-dimensional xy-slice of the refractive index contrast (first column, in which yellow arrows point toward apoptosis blebs), a view of the three-dimensional dry mass concentration reconstruction (second column) and the corresponding magnified regions of the latter (third column) cut by planes C1 and C2 respectively, for highlighting the location of some parasite amastigotes within the membrane blebs

and its evolution as the infection progresses. Moreover, the DMC (see Figure 4, second and third columns, and also Video S1) of parasited macrophages nucleus membrane (between 14 and 15 g/dL) is higher than that of the healthy samples (between 12 and 13 g/dL). Again, as in healthy samples, the DMC of nucleus membrane is superior to the one from the rest of infected cell structure. The rise of average DMC in parasited samples in comparison with the healthy ones can be explained because apoptotic bodies (that typically contain nuclear material and actin cytoskeleton fragments) are shed within the cell [44], thus changing its DMC.

Let us now analyzing the temporal evolution of the mean DMC, 24 and 72 hours after infection. It has been considered 40 cells from each group (*H24*, *H72*, *P24* and *P72*) and their average DMC has been calculated for the scanned cell region (see Figure 5). Relevant differences emerge between the infected and control groups. Both uninfected samples show similar ranges of averaged DMC: *H24* presents DMC values of 2.639 to 3.947 g/dL (median of 3.189 g/dL)

whereas *H72* exhibits DMC of 2.793 to 4.717 g/dL (median of 3.172 g/dL). Nevertheless, when the *P24* group is considered, a slight rise in median DMC value (3.383 g/dL) is

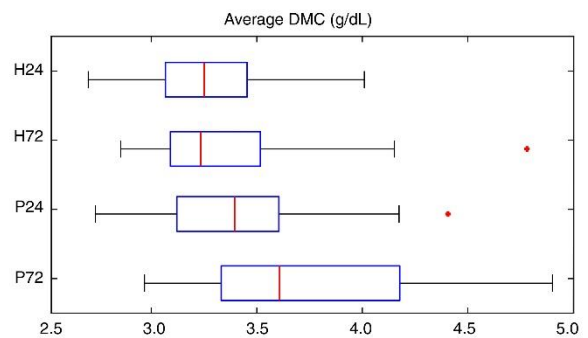


FIGURE 5 Boxplot of the average dry mass concentration (DMC) for the four groups of samples: *H24* (healthy 24 hours), *H72* (healthy 72 hours), *P24* (parasited 24 hours) and *P72* (parasited 72 hours). The red line is the median DMC value and outliers are marked with red points



TABLE 1 Results from statistical *t* tests carried out to verify the relationship between dry mass concentration changes and *Leishmania* presence in DH82 cells

Test	Significant differences?	P-value
H24 vs P24	Yes	.0214
H72 vs P72	Yes	.0026
P24 vs P72	Yes	.0048

observed in comparison with any of healthy cases. This increment is even more noticeable for P72 cells, for which DMC reaches a median value of 3.595 *g/dL* and it spans over the interval 2.956 to 4.889 *g/dL*. This fact suggests that a DMC increase is associated with the presence of *Leishmania* and this change is more remarkable as the time since infection increases.

In order to statistically validate this conclusion, also pointed out by the visual inspection of 3D DMC reconstructions, two hypotheses must be validated. First, we need to test whether the healthy groups DMC (H24 and H72) significantly differs from that of parasited samples (P24 and P72). Second, we check if the course of the infection induces changes in DMC by comparing P24 and P72 groups with each other. Each of these statements have been corroborated by conducting paired sample *t* tests over DMC data, as summarized in Table 1. Taken altogether, the results confirm

that average DMC can be applied as a reliable parameter for analyzing both the health state of the host cell and the development of *Leishmania* infection.

The heterogeneity of the RI contrast values can be another parameter to study as a diagnostic tool apart from the DMC. Indeed, the RI contrast histograms displayed in Figure 6 for healthy and parasited cells evident a significant heterogeneity in the case of parasited cells.

4 | CONCLUSIONS

The cell RI is a biophysical parameter that represents the intracellular mass and its concentration providing important insight for the study, diagnosis and assessment of cell health state. In this work we have performed a quantitative analysis of both healthy and *Leishmania* infected macrophages, based on a novel RI tomography PC-ODT technique. We have demonstrated that the cell 3D RI distribution is useful to detect relevant morphological changes in the infected cells such as apoptosis blebs. Our main finding is that the cell dry mass concentration (directly obtained from the cell RI) reveals key quantitative information required to gain knowledge about the *Leishmania* spreading. It allows reliable detection and temporal monitorization of the parasite proliferation into the cell volume. According to the experimental results, non-infected cells do not significantly change their DMC between 24 and 72 hours from the preparation.

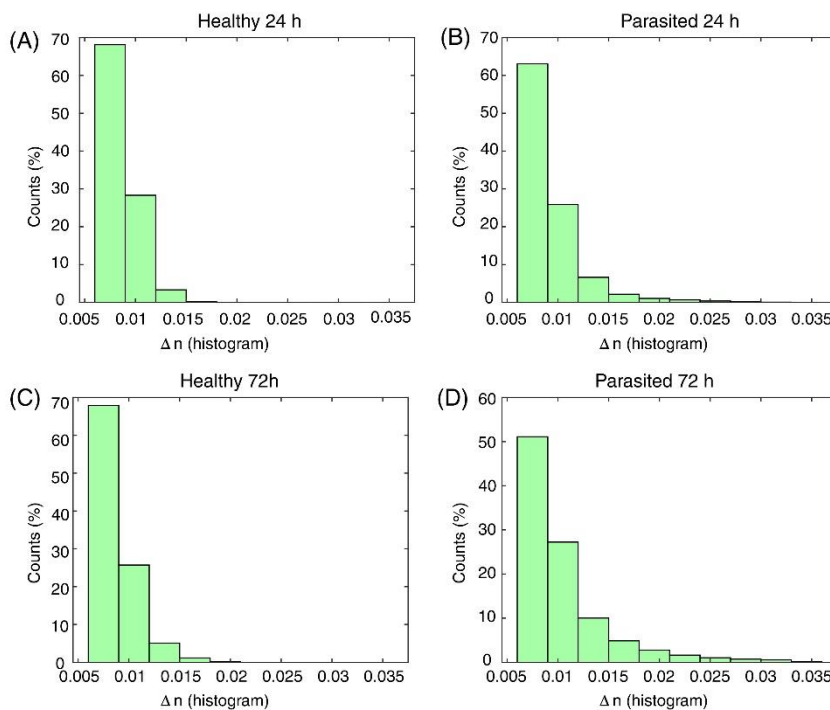
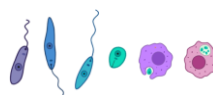


FIGURE 6 Histograms of refractive index contrast values (Δn) within the cytoplasm of healthy (A and B) and parasited (C-D) macrophages. Note that high $\Delta n(r)$ values (above 0.015) are more frequent in parasited samples, and this is specially more noticeable as *Leishmania* proliferates 72 hours after infection



Conversely, the infected cells exhibit higher mean DMC than the healthy cultures and this fact becomes even more evident as infection progresses. These experimental results are in good agreement with the known life cycle of the *Leishmania infantum* and its proliferation into the host macrophages. Thus, in comparison with a merely qualitative study over a stained sample, the proposed label-free technique based on RI tomography provides a valuable quantitative measurement to characterize the infection and its temporal evolution.

Note that throughout this work the sample is fixed but it is also possible to apply PC-ODT technique over live cells as reported in [24]. In this way, PC-ODT is appropriate for better taking advantage of temporal changes induced by the parasite in the cell RI. We envision that the increase in DMC could be further exploited to anticipate the development of *Leishmania* infection. For instance, it could be applied in the assessment of antileishmanial drug efficacy or even integrated in a medical diagnosis protocol. The considered PC-ODT technique is inherently compatible with a conventional wide-field microscope and allows for straightforward and fast RI tomography (typically at a video rate of 10 fps), which are crucial advantages demanded in the clinical diagnosis protocols.

ACKNOWLEDGMENTS

The *Ministerio de Economía y Competitividad* is acknowledged for funding the project TEC2014-57394-P. This research was partially supported through a Santander-UCM 2018 project (PR75/18-21567) and by a grant from Comunidad de Madrid (Spain) PLATESA (S2013/ABI-2906). A.M. was supported by a fellowship from Complutense University of Madrid-Santander.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

AUTHOR BIOGRAPHIES

Please see Supporting Information online.

ORCID

Juan M. Soto  <https://orcid.org/0000-0002-7407-2723>
 José A. Rodrigo  <https://orcid.org/0000-0001-7313-7313>
 Tatiana Alieva  <https://orcid.org/0000-0002-7638-9150>
 Gustavo Domínguez-Bernal  <https://orcid.org/0000-0002-7693-653X>

REFERENCES

- [1] World Health Organization, *Leishmaniasis. Key facts*. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Accessed October 2018.
- [2] R. Kumar, C. Engwerda, *Clin. Transl. Immunol.* **2014**, 3(3), e13.
- [3] J. F. Barbosa, S. M. de Figueiredo, F. M. Monteiro, F. Rocha-Silva, C. Gaciele-Melo, S. S. C. Coelho, S. Lyon, R. B. Caligiorno, *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune. Drug Discov.* **2015**, 9(2), 90.
- [4] J. Dujardin, L. Campino, C. Cañavate, J. Dedet, L. Gradoni, K. Soteriadou, A. Mazeris, Y. Ozbek, M. Boelaert, *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, 14(7), 1013.
- [5] M. Podinovskaia, A. Descoteaux, *Future Microbiol.* **2015**, 10(1), 111.
- [6] K. G. Phillips, S. L. Jacques, O. J. T. McCarty, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, 109(11), 118105.
- [7] A. E. Ekpenyong, S. M. Man, S. Achouri, C. E. Byant, J. Guck, K. J. Chalut, *J. Biophotonics* **2013**, 6(5), 393.
- [8] T. Kim, R. Zhou, M. Mir, S. D. Babacan, P. S. Carney, L. L. Goddard, G. Popescu, *Nat. Photonics* **2014**, 8(3), 256.
- [9] T. A. Zangle, M. A. Teitell, *Nat. Methods* **2014**, 11(12), 1221.
- [10] J. Yoon, K. Kim, H. Park, C. Choi, S. Jang, Y. Park, *Biomed. Opt. Express* **2015**, 6(10), 3865.
- [11] H. Park, S. Hong, K. Kim, S. Cho, W. Lee, Y. Kim, S. Lee, Y. Park, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 10827.
- [12] S. Lee, H. Park, K. Kim, Y. Sohn, S. Jang, Y. Park, *Sci. Rep.* **2017**, 7(1), 1039.
- [13] W. Hsu, J. Su, C. Chang, K. Sung, Photonics Asia, *Optics in Health Care and Biomedical Optics V*, Beijing, China, December **2012**, p. 85531O.
- [14] B. Simon, M. Debailleul, A. Beghin, Y. Tourneur, O. Haeberlé, *J. Biophotonics* **2010**, 3(7), 462.
- [15] R. Chandramohanadas, Y. Park, L. Lui, A. Li, D. Quinn, K. Liew, M. Diez-Silva, Y. Sung, M. Dao, C. T. Lim, P. Rainer Preiser, S. Suresh, *PLoS One* **2011**, 6(6), e20869.
- [16] Y. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. Choi, M. S. Feld, S. Suresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105(37), 13730.
- [17] K. Kim, H. Yoon, M. Diez-Silva, M. Dao, R. R. Dasari, Y. Park, *J. Biomed. Opt.* **2013**, 19, 011005.
- [18] Y. Park, C. Depeursinge, G. Popescu, *Nat. Photonics* **2018**, 12(10), 578.
- [19] Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, C. Depeursinge, *Nat. Photonics* **2013**, 7(2), 113.
- [20] A. V. Belashov, A. A. Zhikhoreva, V. G. Bespalov, O. S. Vasyutinskii, N. T. Zhilinskaya, V. I. Novik, I. V. Semenova, *Tech. Phys. Lett.* **2017**, 43(10), 932.
- [21] Y. Sung, W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Opt. Express* **2009**, 17(1), 266.
- [22] M. Chen, L. Tian, L. Waller, *Biomed. Opt. Express* **2016**, 7(10), 3940.
- [23] J. M. Soto, J. A. Rodrigo, T. Alieva, *Opt. Express* **2017**, 25(14), 15699.
- [24] J. A. Rodrigo, J. M. Soto, T. Alieva, *Biomed. Opt. Express* **2017**, 8(12), 5507.
- [25] K. Lee, S. Shin, Z. Yaqoob, P. T. C. So, Y. Park, *J. Biophotonics* **2019**, 12, e201800289.



- [26] M. L. Wellman, S. Krakowka, R. M. Jacobs, G. J. Kociba, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* **1988**, 24(3), 223.
- [27] J. Fernández-Cotrina, V. Iniesta, S. Belinchón-Lorenzo, R. Muñoz-Madrid, F. Serrano, J. C. Parejo, L. Gomez-Gordo, M. Soto, C. Alonso, L. C. Gómez-Nieto, *Vet. Parasitol.* **2013**, 192(1–3), 118.
- [28] G. Domínguez-Bernal, M. Jiménez, R. Molina, L. Ordóñez-Gutiérrez, A. Martínez-Rodrigo, A. Mas, M. T. Cutuli, J. Carrión, *Parasit. Vectors* **2014**, 7(1), 499.
- [29] J. M. Soto, J. A. Rodrigo, T. Alieva, *Opt. Lett.* **2018**, 43(19), 4699.
- [30] V. Lauer, *J. Microsc.* **2002**, 205(2), 165.
- [31] J. Jung, K. Kim, J. Yoon, Y. Park, *Opt. Express* **2016**, 24(3), 2006.
- [32] G. Li, T. Liu, A. Tarokh, J. Nie, L. Guo, A. Mara, S. Holley, S. T. C. Wong, *BMC Cell Biol.* **2007**, 8(1), 40.
- [33] A. Yakimovich, R. Witte, V. Andriasyan, F. Georgi, U. F. Greber, *mSphere* **2018**, 3(6), e00599.
- [34] A. Limaye, SPIE Optical Engineering + Applications, Developments in X-Ray Tomography VIII, San Diego, California, October **2012**, p. 85060X.
- [35] D. M. Mahlmann, J. Jahnke, P. Loosen, *Eur. J. Phycol.* **2008**, 43(4), 355.
- [36] R. Barer, *Nature* **1953**, 172(4389), 1097.
- [37] J. M. Silverman, J. Clos, C. C. de Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, N. E. Reiner, *J. Cell Sci.* **2010**, 123, 842.
- [38] S. Gannavaram, A. Debrabant, *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2012**, 2, 95.
- [39] K. Moutzouris, M. Papamichael, S. C. Betsis, I. Stavrakas, G. Hloupis, D. Triantis, *Appl. Phys. B* **2014**, 116(3), 617.
- [40] I. Z. Kozma, P. Krok, E. Riedle, *J. Opt. Soc. Am. B* **2005**, 22(7), 1479.
- [41] J. Lim, K. Lee, K. H. Jin, S. Shin, S. Lee, Y. Park, J. C. Ye, *Opt. Express* **2015**, 23(13), 16933.
- [42] J. Yoon, Y. Jo, M. Kim, K. Kim, S. Lee, S. Kang, Y. Park, *Sci. Rep.* **2017**, 7(1), 6654.
- [43] B. Simon, M. Debailleul, M. Houkal, C. Ecoffet, J. Bailleur, J. Lambert, A. Spangenberg, H. Liu, O. Soppera, O. Haeberlé, *Optica* **2017**, 4(4), 460.
- [44] F. Real, P. T. V. Florentino, L. C. Reis, E. M. Ramos-Sanchez, P. S. T. Veras, H. Goto, R. A. Mortara, *Cell Microbiol.* **2014**, 16(10), 1549.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Soto JM, Mas A, Rodrigo JA, Alieva T, Domínguez-Bernal G. Label-free bioanalysis of *Leishmania infantum* using refractive index tomography with partially coherent illumination. *J. Biophotonics*. 2019;e201900030. <https://doi.org/10.1002/jbio.201900030>

