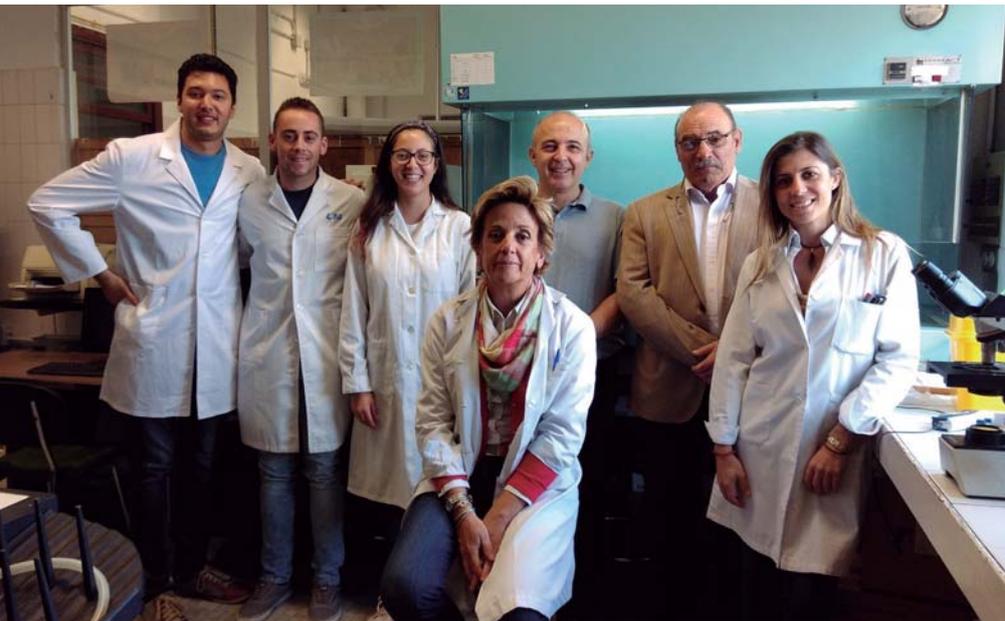


Epidemiología, Diagnóstico y Terapia Antiparasitaria

Universidad Complutense de Madrid, Madrid



El equipo que forma el actual Grupo de Investigación en “Terapia Antiparasitaria” de la UCM (se ha solicitado el cambio de denominación a “Epidemiología, Diagnóstico y Terapia Antiparasitaria”) tiene varias líneas de investigación consolidadas y activas desde hace más de 20 años, centradas en especial en protozoos. Entre ellas, destacan la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas frente a diferentes enfermedades parasitarias; estudios epidemiológicos y de parasitofauna y su posible transmisión entre fauna silvestre y doméstica, y el hombre; y la caracterización morfológica y molecular de aislados de protozoos intestinales y cavitarios, especialmente tricomonádidos, amebas y ciliados.

1. BÚSQUEDA DE NUEVAS ALTERNATIVAS FARMACOLÓGICAS

Los estudios más relevantes llevados a cabo dentro de esta línea en los últimos años han estado dirigidos a la estandarización de

un método secuencial de *screening* pre-clínico para su implantación en el proceso de búsqueda de nuevos fármacos en el laboratorio. En el sistema puesto a punto (Ibáñez-Escribano et al. 2014a), en un primer momento aplicamos modelos *in silico* (modelos LDA-QSAR) compuestos por descriptores moleculares capaces de identificar estructuras moleculares con características físico-químicas favorables para ser un buen candidato antiparasitario. A partir de los datos obtenidos se realiza (en colaboración con investigadores del Instituto de Química Médica del CSIC) la síntesis de series químicas que son evaluadas *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi* y *Trichomonas vaginalis*. Los candidatos más prometedores son seleccionados mediante ensayos de citotoxicidad inespecífica en líneas celulares de mamífero, y finalmente, las moléculas con mayor actividad antiparasitaria y menor citotoxicidad celular pasan a la siguiente fase de cribado. En los últimos 4 años se han evaluado más de 200 compuestos químicos, con resultados prometedores en algunos casos

(Fonseca-Berzal et al., 2014, 2016; Ibáñez-Escribano et al., 2015, 2016).

En lo que respecta a *T. vaginalis*, este método secuencial en el que se ha “dirigido” la síntesis de los productos a evaluar, se ha completado con ensayos de actividad tricomonocida utilizando fármacos comercializados para otras patologías (*drug-repositioning*) (Meneses-Marcel et al., enviado), así como extractos naturales (Martínez-Díaz et al., 2015a).

En el caso de *T. cruzi*, la búsqueda de nuevos compuestos antichagásicos se completa con estudios encaminados a mejorar las propiedades farmacocinéticas de las sustancias seleccionadas como potencialmente activas, así como de los fármacos de referencia, cuya eficacia es bastante limitada. Estos análisis se realizan en colaboración con el Departamento de Farmacia Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM. Hasta el momento, la preparación de dispersiones

sólidas de benzimidazol y de nuevas nitroimidazolinonas ha dado resultados relevantes (Fonseca-Berzal et al., 2015) ya que, al incrementar su solubilidad acuosa, se mejoran sus perfiles de actividad.

2. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y DE PARASITOFUNA EN FAUNA DOMÉSTICA Y SILVESTRE

Esta línea se inició a finales de los años '90, coincidiendo con el auge en aquel momento de la cría de avestruces. El hallazgo de varias especies de protozoos parásitos (pertenecientes a los géneros *Entamoeba* y *Balantidium*) que podían transmitirse entre estas aves, otros animales (mamíferos) y el hombre sirvió de punto de inicio de la línea de investigación que comentamos más adelante.

Los estudios iniciales sobre parásitos de avestruces (Ponce-Gordo et al. 2002) permitieron identificar una gran diversidad parasitaria, sobre todo de protozoos, permitiendo la descripción por primera vez de varios grupos de protozoos en estas aves (p.e., *Giardia*, *Retortamonas*, *Entamoeba*, eugléridos). Estos análisis se completaron con los llevados a cabo en ñandúes (Martínez-Díaz et al. 2013). En fauna española, este mismo tipo de estudio se está llevando a cabo actualmente con aves esteparias (avutardas, gangas y sisonas), habiéndose obtenido hasta el momento datos novedosos sobre la presencia de protozoos en las mismas (en especial, tricomonádidos y amebas).

En los últimos años, la búsqueda e identificación de parásitos se ha ampliado a los animales de núcleos zoológicos de distinto tamaño (zoológicos, granjas-escuela, centros de recuperación), incluyendo no sólo mamíferos (que son, en principio, los principales "candidatos" a tener parásitos compartidos con el ser humano), sino también a reptiles, cuya cría como mascotas está en auge.

3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE PROTOZOOS INTESTINALES Y CAVITARIOS

La parte más importante de esta línea está orientada a la caracterización biológica

de aislados clínicos de flagelados tricomonádidos, tanto en humanos (*T. vaginalis*) como en aves, y a la caracterización de amebas y ciliados intestinales.

En el último informe de la OMS la prevalencia estimada en humanos causada por *T. vaginalis* superaba a los casos de gonorrea, clamidiasis y sífilis juntas. Sin embargo, pocos son los estudios epidemiológicos relacionados con la patogenia de este protozoo. Es por ello por lo que nos dedicamos a estudiar distintas propiedades fenotípicas, inmunológicas (Ibáñez-Escribano et al., 2015) y moleculares (Ibáñez-Escribano et al., 2014b) con el fin de arrojar algo de luz a las innumerables cuestiones que se plantean para explicar el comportamiento tan versátil de este parásito. Además de la caracterización, actualmente también estamos realizando la axenización de los aislados obtenidos y su congelación en N2 líquido para estudios farmacológicos posteriores.

La caracterización de aislados de tricomonádidos en muestras animales se ha centrado fundamentalmente en la identificación de estos flagelados en animales sintomáticos. Mediante la combinación de análisis morfológicos por microscopía óptica y electrónica, y análisis genéticos multi-locus, hemos identificado por primera vez la presencia de flagelados compatibles con *Tetratrichomonas brumpti* en oso hormiguero (Ibáñez et al. 2013); hemos descrito una nueva especie, *Trichomonas gypaetini* n.sp., de la cavidad orofaríngea de aves carroñeras (Martínez-Díaz et al. 2015b), describiendo también su potencial papel patógeno (Martínez-Herrero et al., sometido); y hemos descrito dos nuevos tricomonádidos de columbiformes, aunque todavía sin proponerlos formalmente como especies nuevas (Martínez-Herrero et al. 2017).

La caracterización de los protozoos intestinales se inició a comienzos de los años 2000, poniendo el énfasis en su taxonomía y filogenia, y desde un punto de vista más aplicado, en su epidemiología y en la posible transmisión a otros animales y al hombre. El objetivo principal es la caracterización de aislados de amebas (*Entamoeba*) y ciliados (principalmente, *Balantidium* y *Nyctotheroides*), para a continuación profundizar en la taxonomía y filogenia de las especies de estos

géneros y en su epidemiología. En todos estos casos, los análisis se basan en la morfología del organismo y en el análisis de la secuencia-estructura de la subunidad pequeña del ARNr (SSU-rRNA, por sus siglas en inglés) y de la región ITS1-ARNr 5.8S-ITS2.

El análisis de la secuencia-estructura se utiliza desde hace tiempo para mejorar la calidad de los alineamientos y por tanto mejorar la fiabilidad de los análisis filogenéticos. Además, puede permitir eliminar la subjetividad a la hora de determinar si un número mayor o menor de diferencias en las secuencias justifica que se consideren como variantes de la misma especie o como especies distintas. Dado que la estructura secundaria del SSU-rRNA está muy conservada, es posible transferir por modelado homólogo las estructuras secundarias conocidas a otras secuencias. Aplicando esta metodología al análisis de las secuencias disponibles de especies de *Entamoeba*, hemos propuesto el análisis de una región concreta del SSU-rRNA como herramienta de uso taxonómico en este género (Alfonso et al. 2012). Una forma de validar estos resultados es con el análisis de la región ITS2, que todavía no está todavía secuenciada en *Entamoeba*, por lo que constituye uno de nuestros objetivos.

La caracterización de los ciliados se ha llevado a cabo, inicialmente, con aislados de *Balantidium* de aves y mamíferos, primero mediante análisis de secuencias y después de secuencia-estructura (Ponce-Gordo et al. 2008, 2011). Los resultados obtenidos han mostrado que la especie presente en animales homeotermos es la misma (*B. coli*), y que hay al menos dos genes ribosomales con evolución independiente dentro de cada célula. También hemos encontrado dos copias distintas en otro ciliado de mamíferos, *Buxtonella sulcata*, aunque en este caso el grado de diferenciación es menor (Grim et al., 2015). Sin embargo, en ciliados de anfibios (*Balantidium* y *Nyctotheroides*), hasta el momento sólo hemos identificado una única copia (Li et al. 2014, 2016, 2017).

En estos estudios con ciliados de anfibios hemos podido comprobar que el género *Balantidium* es polifilético, y que posiblemente deba ser dividido en dos o tres géneros diferentes. Igualmente, es posible que la taxonomía de los géneros *Nyctotherus* y

Nyctotheroides deba ser también revisada. Actualmente estamos llevando a cabo análisis de nuevos aislados de mamíferos, reptiles y anfibios, para poder obtener conclusiones fiables.

REFERENCIAS

- Alfonso, S., Martínez-Díaz, R.A. & Ponce-Gordo, F.** (2012) Estructura secundaria y mapa de variabilidad de la subunidad pequeña del ARNr de *Entamoeba*. Posibles implicaciones para la taxonomía del género. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 71, 125-137.
- Fonseca-Berzal, C., Escario, J. A., Arán, V. J., & Gómez-Barrio, A.** (2014). Further insights into biological evaluation of new anti-Trypanosoma cruzi 5-nitroindazoles. *Parasitology Research*, 113, 1049-1056.
- Fonseca-Berzal, C., Palmeiro-Roldán, R., Escario, J. A., Torrado, S., Arán, V. J., Torrado-Santiago, S., & Gómez-Barrio, A.** (2015). Novel solid dispersions of benznidazole: preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system. *Experimental Parasitology*, 149, 84-91.
- Fonseca-Berzal, C., Ibáñez-Escribano, A., Reviriego, F., et al.** (2016a). Antichagasic and trichomonocidal activity of 1-substituted 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-ones and 3-alkoxy-2-benzyl-5-nitro-2H-indazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 115, 295-310.
- Grim, J.N., Jirků-Pomajbíková, K. & Ponce-Gordo, F.** (2015) Light microscopy morphometrics, ultrastructure, and molecular phylogeny of the putative pycnotrichid ciliate, *Buxtonella sulcata*. *European Journal of Protistology*, 51, 425-436.
- Ibáñez-Escribano, A., Meneses-Marcel, A., Marrero-Ponce, Y., Nogal-Ruiz, J. J., Arán, V. J., Gómez-Barrio, A., & Escario, J. A.** (2014a). A sequential procedure for rapid and accurate identification of putative trichomonocidal agents. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 162-167.
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J. J., Arán, V. J., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A., & Alderete, J. F.** (2014b). Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in *Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among *Trichomonas* species. *Parasitology International*, 63, 427-431.
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J. J., Pérez-Serrano, J., Gómez-Barrio, A., Escario, J. A., & Alderete, J. F.** (2015). Sequestration of host-CD59 as potential immune evasion strategy of *Trichomonas vaginalis*. *Acta Tropica*, 149, 1-7.
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J. J., Gomez-Barrio, A., Aran, V. J., & Escario, J. A.** (2016). In vitro trichomonocidal activity and preliminary in silico chemometric studies of 5-nitroindazolin-3-one and 3-alkoxy-5-nitroindazole derivatives. *Parasitology*, 143, 34-40.
- Li, M., Ponce-Gordo, F., Grim, J.N., Wang, C. & Nilsen, F.** (2014) New insights into the molecular phylogeny of *Balantidium* (Ciliophora, Vestibuliferida) based on the analysis of new sequences of species from fish hosts. *Parasitology Research*, 113, 4327-4333.
- Li, M., Sun, Z.-Y., Grim, J.N., Ponce-Gordo, F., Wang, G.-t., Zou, H., Li, W.-x. & Wu, S.-g.** (2016) Morphology of *Nyctotheroides hubeiensis* Li et al. 1998 from frog hosts with molecular phylogenetic study of clevelandellid ciliates (Armophorea, Clevelandellida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63, 751-659.
- Li, M., Li, C., Grim, J.N., Ponce-Gordo, F., Wang, G., Zou, H., Li, W. & Wu, S.** (2017) Supplemental description of *Nyctotheroides pyriformis* n. comb. (= *Macrocryptopharynx pyriformis* (Nie, 1932) Li et al. 2002) from frog hosts with consideration of the validity of the genus *Macrocryptopharynx* (Armophorea, Clevelandellida). *European Journal of Protistology*, 58, 152-163.
- Martínez-Díaz, R.A., Martella, M.B., Navarro, J.L. & Ponce-Gordo, F.** (2013) Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) from Argentina. *Veterinary Parasitology*, 194, 75-78.
- Martínez-Díaz, R. A., Ibáñez-Escribano, A., Burillo, J., et al.** (2015a). Trypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 693-699.
- Martínez-Díaz, R.A., Ponce-Gordo, F., Rodríguez-Arce, I., Martínez-Herrero, M.C., González-González, F., Molina-López, R.A. & Gómez-Muñoz, M.T.** (2015b) *Trichomonas gypaetini* n.sp., a new trichomonad from the upper gastrointestinal tract of scavenging birds of prey. *Parasitology Research*, 114, 101-112.
- Martínez-Herrero, M.C., Garíjo-Toledo, M.M., Liebhart, D., Ganas, P., Martínez-Díaz, R.A., Ponce-Gordo, F., Carrero-Ruiz, Hess, M. & Gómez-Muñoz, M.T.** (2017) Novel avian oropharyngeal trichomonads isolated from European turtle doves (*Streptopelia turtur*) and Racing pigeons (*Columba livia*): genetic and morphometric characterisation of clonal cultures. *Infection, Genetics and Evolution*, 55, 93-103.
- Ponce-Gordo, F., Herrera, S., Castro, A.T., García Durán, B. & Martínez-Díaz, R.A.** (2002) Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Veterinary Parasitology*, 107, 137-160.
- Ponce-Gordo, F., Jiménez-Ruiz, E. & Martínez-Díaz, R.A.** (2008) Tentative identification of the species of *Balantidium* from ostriches (*Struthio camelus*) as *Balantidium coli*-like by analysis of polymorphic DNA. *Veterinary Parasitology*, 157, 41-49.
- Ponce-Gordo, F. Fonseca-Salamanca, F. & Martínez-Díaz, R.A.** (2011) Genetic heterogeneity in internal transcribed spacer genes of *Balantidium* (Litostomatea, Ciliophora). *Protist*, 162, 774-794.