



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Leishmaniasia: gaixotasun
globala. Tratamendurako hautagai
berriak**

*Itziar De Miguel Romero,
Aroia Burguete Mikeo,
Rima El Dirany, José Peña Guerrero,
Celia Fernández Rubio
eta Paul Nguewa*

137-144 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.17>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Leishmaniasia: gaixotasun globala. Tratamendurako hautagai berriak

Itziar De-Miguel^{1*}, Aroia Burguete-Mikeo^{1*}, Rima El-Dirany^{1,2}, José Peña-Guerrero¹,
Celia Fernández-Rubio¹, Paul Nguewa¹

¹Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN Osasun Tropikaleko Institutua, Mikrobiologia eta parasitologia saila, IdiSNA (Nafarroako Osasun Ikerketa Institutua). Irunlarrea 1, PK 31008

²Biologia Molekularreko eta Minbiziaren Immunologiako Laborategia, Zientzia Fakultatea I, Libanoko Unibertsitatea, Hadath 1003, Libano

*Egile hauek era berean parte hartu dute lan honetan

idemiguel.1@alumni.unav.es

Laburpena

Leishmaniasia hedatzen ari da Europan, eta tratamendu nagusiek hainbat desabantaila dituzte. Lan honek bi alderdi horiek jorratu nahi ditu. *Leishmania infantum* espezieko parasitoak isolatu eta identifikatu dira, leishmaniasiaz jotako Nafarroako txakur baten gongoil linfatikoaren lagin batetik abiatuta. R38 eta R38-P konposatuen jardura leishmanizida aztertu da. R38 konposatua interesgarria suertatu zen, makrofagoen infekzio ehunekoa murrizteko gaitasun handiagatik.

Hitz gakoak: leishmaniasia, tratamenduak, makrofagoak, amastigoteak, promastigoteak, Nafarroa

Abstract

Leishmaniasis is spreading in Europe and the main treatments available exhibit several disadvantages. This paper aims to address these two aspects. Leishmania infantum parasites have been isolated and identified from a lymph node sample obtained from a dog with leishmaniasis in Navarra. The leishmanicidal activity of the compounds R38 and R38-P has been studied. Compound R38 is a promising drug against leishmaniasis due to its ability to reduce the percentage of infected macrophages.

Keywords: leishmaniasis, treatments, macrophages, amastigotes, promastigotes, Navarra

1. Sarrera eta motibazioa

Leishmaniasia flebotomo emeek transmititutako eta *Leishmania* generoko parasito protozarioek eragindako gaixotasun talde bat da. Gaur egun, leishmaniasia osasun-arazo garrantzitsua da herrialde tropikal askotan eta mundu osoan duen hedapena gero eta nabarmenagoa da. Osasunaren Mundu Erakundearen (OME) datuen arabera, infekzio horiek endemikoak dira mundu osoko 98 herrialdetan. Urtero milioi bat leishmaniasi kasu inguru erregistratzen dira eta kalkulaturako hilkortasuna 20.000 heriotza baino gehiagokoa da (Alvar et al., 2012; Ruiz-Postigo et al., 2020; Sundar eta Rai, 2002).

Ornogabeetan, leishmaniek forma flagelatua aurkezten dute (promastigoteak) eta flebotomoen digestio-traktuan garatzen dira. Ostalari ornodunetan, aldiz, forma aflagelatua dute (amastigoteak) (Sesma eta Barricarte, 1997). Transmisio-zikloa flebotomo eme batek kutsatutako ornodun baten (batez ere txakurrak eta gizakiak) odola xurgatzen duenean hasten da (Osasun Publikoko Zuzendaritza Nagusia, 2018). Hogei espezie patogeno baino gehiago daude, eta eragindako gaixotasunak hainbat forma kliniko ditu, esaterako, larruazaleko lesio lokalizatuak eta leishmaniasi biszeralera edo kala-azar. Azkeneko hau gaixotasunaren formarik larriena da, eta ia beti hilgarria, tratatzen ez bada (Alvar et al., 2012; Ruiz-Postigo et al., 2020; Sundar eta Rai, 2002).

Europan, gaixotasuna hipoendemikoa da Mediterraneoko arroko herrialdeetan. Albania, Bosnia, Bulgaria, Zipre, Kroazia, Espainia, Frantzia, Grezia, Italia, Ipar Mazedonia, Malta, Montenegro, Portugal eta Turkian kasuak aurkitu dira (Fernández Martínez et al., 2019).

2015ean leishmaniasia Espainian nahitaez aitortu beharreko gaixotasun gisa sailkatu bazen ere autonomia-erkidego guztientzat, deklarazio falta garrantzitsua susmatzen da, % 25-40koa

leishmaniasi biszeralaren kasuan eta ia % 100ekoa larruazaleko leishmaniasian (Osasun Publikoko Zuzendaritza Nagusia, 2018). Euskal Herriari dagokionez, 1998-2021 denboraldian, giza leishmaniasiaren 65 kasu baina gehiago deskribatu dira, adin guztietako pertsonetan, eta zenbait kasutan GIB/HIESaren (Giza Inmunoeskasiaren Birusa/Hartutako Inmunoeskasiaren Sindromea) koinfekzioarekin lotuta. Kasu horietako hogeita bederatzi Nafarroan jakinarazi ziren eta hogeita hamasei Euskadin. Ipar Euskal Herriari buruzko informaziorik ez da lortu (Nafarroako Osasun Publikoko Buletinak eta Euskal Autonomia Erkidegoko Buletin epidemiologikoak, 1998-2021).

Gizakiez gain, txakurrak dira Europako kontinentean gaixotasuna pairatzen duten izaki nagusiak. Infektatutako txakurren % 60a asintomatikoa dela kalkulatu da (Amela et al., 2012) eta, gaixotasunaren transmisioan duten paper aktiboa dela eta (Molina et al., 1994), funtsezkoa da animalia hauetan egoera epidemiologikoa ezagutzeko.

Orain arte, Euskal Herrian txakurren leishmaniasiari buruz egindako ikerketak urriak dira. Euskadin, txakurren % 5 kutsatuta dago (Gálvez et al., 2020), eta Nafarroan, aldiz, prebalentzia % 6-18koa da (Díaz-Regañón et al., 2020; Gálvez et al., 2020; Sesma eta Barricarte, 1997). Proiektu honetan, diziplina anitzeko talde batek (farmazialariak, albaitariak, biologoak, kimikariak...) gaitzaren alderdi hau jorratzen du.

Leishmaniasiaren aurkako tratamenduak egon arren, (van Griensven eta Diro, 2019; Mcgwire eta Satoskar, 2014) hala nola, antimonial pentabalenteak, B anfoterizina, paromomizina eta miltefosina, (Leishmaniasiaren kontrola: OMEko Adituen Batzordeak Leishmaniasiaren Kontrolari buruz egindako bilera baten txostena, 2010) guztiek desabantaila ugari dituzte, horien artean, kostu ekonomiko handia, toxikotasuna, administratzeko zailtasuna, erresistentzien agerpena eta teratogenizitatea (Oliveira et al., 2011; Wortmann et al., 2010).

Horregatik, egungo erronketako bat da tratamendu aktibo, seguru eta eskuragarri berriak aurkitzea da (Fernández-Rubio et al., 2019; Vacas et al., 2020). Ikerketa-bide desberdinen artean, nabarmentzekoak dira peptido antimikrobianoak (El-Dirany et al., 2021, 2022; Mwangi et al., 2019), pisu molekular txikiko oinarri peptidikoa duten molekulak eta organismo guztiek sortuak (ugaztunak, ornodunak, ornogabeak, landareak, onddoak eta bakterioak) (Pasupuleti et al., 2012). Sortzetiko immunitate-sistema modulatzeko gaitasuna dutela frogatu da, baita patogenoen aurkako aktibitatea, toxikotasun baxua eta erresistentzien sorrera urria ere (Robles-Loaiza et al., 2021).

Lan hau R38 peptido antimikrobiarraren eta R38-P konposatuaren aktibitate leishmanizidaren azterketan oinarritu da. R38-P konposatua, R38 pisu molekular handiko proteina bakteriano batekin elkartzearen emaitza da. Azken hori ibilgailu gisa erabiltzen da, R38ren ekintza-lekurako garraioa errazteko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Leishmaniasi kasuen kopuruak gora egin du azkeneko hamarkadan Europan, batez ere, Italia eta Espainia bezalako herrialde endemikoetan. Zenbait adituk, leishmaniasia gaixotasun emergentea kontsideratzen dute (Herrador et al., 2015; Ready, 2010). Hori dela eta, ezinbestekoa da haren bilakaera modu globalean aztertzea, eskuhartzen duten alderdi guztiak kontuan hartuz: agente patogenoak, bektorea, ingurumena eta erreserborioak.

Era berean, OMEk egungo erronketako bat bezala ezarri du tratamendu berriak bilatzea eta garatzea (Control de las leishmaniasis, 2010).

Lan honek behar horiei erantzun nahi die, honako helburu hauek planteatuz:

- Albaitariekin lankidetzan, Nafarroako txakurretan leishmaniasia ikertu.
- Foru erkidegoko txakurretatik *Leishmania* parasitoak isolatu eta identifikatu.
- Konposatu berrien jarduera leishmanizida aztertzea, R38 eta R38-P barne.

3. Ikerketaren muina

3.1 Nafarroan diziiplina anitzeko lantalde bat eratu.

Lehenik eta behin, Nafarroako Albaitarien Elkargo Ofizialarekin (COVETNA) batera gaixotasunaren egoera Foru Erkidegoan aztertu zen, baita profesionalen beharrak eta hainbat albaitaritza klinikarekin lantalde bat osatzeko aukera ere.

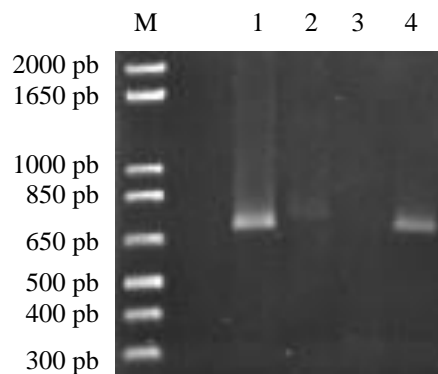
Gaixotasunarekin esperientzia duten kliniken lankidetzaz eskatu ondoren eta Nafarroako zonalde guztiak biltzen saiatuz, bost kliniken kolaborazioa lortu zen.

3.2 Parasitoen isolatzea eta identifikazioa

Klinika batetik leishmaniasia zuen txakur baten gongoil linfatikoaren lagin bat jaso zen, eta Schneider's Drosophila ingurunean eredu zen, % 20ko HIFBSz (behi-serum fetal inaktibatua) eta % 0,5eko penizilina-estreptomizina 10.000 U/ml (Gibco, AEB) osatua parasitoen isolamendua eta hazkundera errazteko. Ondoren, DNA eskuratu zen Medina-Acostak (Medina-Acosta eta Cross, 1993) deskribatutako metodoa jarraituz, ondoren, espeziea identifikatzeko.

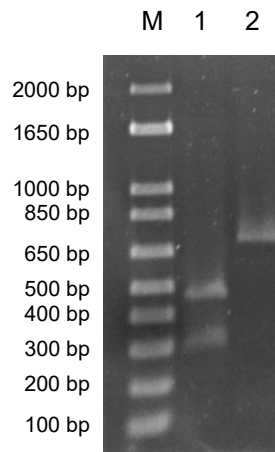
Identifikazioa PCR (polimerasaren kate-erreakzioa) bidez egin zen. *L. donovani* konplexuko *CPB* genea amplifikatzeko oligonukleotido espezifikoak hautatu ziren. Konplexu hau *Leishmania donovani* (*L. donovani*) eta *Leishmania infantum* (*L. infantum*) espeziek osatzen dute (azken hau gaixotasunaren erantzulea Espainian). PCR produktuak agarosa-geleko elektroforesi bidez ikusi ziren. 1. irudian lortutako emaitzak erakusten dira.

1. Irudia: PCR bidezko *CPB* genearen amplifikazioa. M: 1kb plus Ladder markadorea. 1: *L. infantum* kontrol positiboa. 2: *L. donovani* kontrol positiboa. 3: *Leishmania guyanensis* kontrol negatiboa. 4: Lagina.



Agarosa gela ikusi eta gero, laginak *L. donovani* konplexuko parasitoak zituela konfirmatu zen. Isolatutako parasitoen espeziea *L. infantum* zela baieztatzeko, PCR produktuak digeritu ziren DRAIII errestrizio entzimarekin. Entzima honen diana *L. donovani*-ren *CPB* genean soilik aurkitzen da, ondorioz, bi banda sortuz (2. Irudia).

2. Irudia. PCR produktuen digestioa DRAIII errestrizio entzimarekin. M: 1kb plus Ladder markadorea. 1: *L. donovani* kontrol positiboa. 2: Lagina.



Kontrol positibo gisa erabilitako *L. donovani*-ren digestioan 2 banda ikus daitezke, laginean aldiz, soilik bat. Honela, laginaren PCR produktua digeritu ez zenez, laginean *L. infantum* parasitoak zeudela egiaztatzen zen.

3.3 Konposatu berrien jarduera leishmanizida *L. major* promastigoteen aurrean

R38 eta R38-P konposatuen ekintza leishmanizida aztertu zen. Horretarako, *Leishmania major* (*L. major*) espezieko parasito promastigoteak erabili ziren (laborategietan asko erabiltzen den espeziea). M199 (1x) ingurunean hazi ziren, HEPES (azido 2-[4-(2-hidroxi)etil]piperazin-1-il]etanosulfonikoa) 25 mM, sodio bikarbonatoa 20,8 mM (pH 6,80), % 10 HIFBS, % 4 HEPES 1 M (pH 7,40), adenina (% 1 adenina 10 mM, HEPES 50 mM), % 0,5 penizilina-estreptomizina 10.000 U/ml (Gibco, AEB), % 0,25 hemina % 50 trietanolaminarekin (% 0,20), % 0,4 biopterina 0,25 mg/ml eta % 0,10 biotinaz (% 0,1 biotina eta % 95 etanola) osatua. Parasitoak 96 platertxoko plaketan erein ziren, gero eta konposatu-kontzentrazio handiagoarekin batera, 26°C-tan, 48 orduz. R38 konposatuarekin bost kontzentrazio desberdin probatu ziren, 10, 15, 20, 30 eta 40 μ M. R38-Parekin berriz, sei kontzentrazio erabili ziren, 2, 4, 8, 32, 64 eta 128 μ M. Ondoren, MTT metodoarekin (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), konposatuen EC_{50} balioak zehaztu ziren (hazkundearen % 50 inhibitzen duen kontzentrazioa).

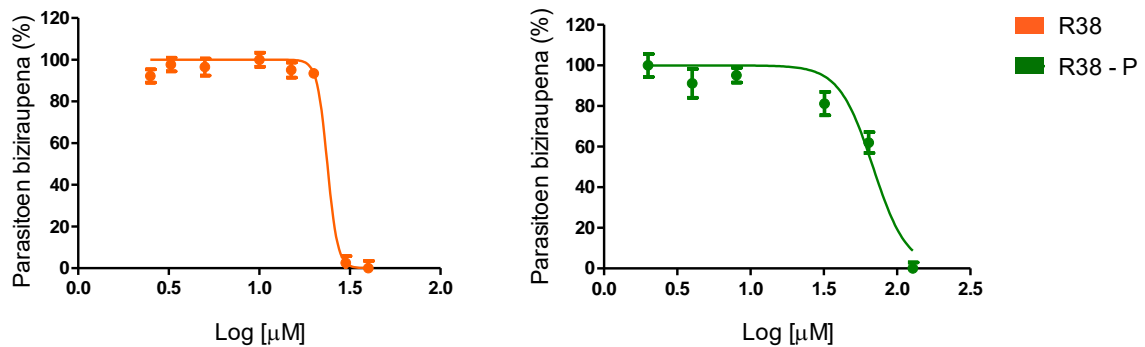
1. taulak R38 eta R38-P konposatuen MTT bidez lortutako EC_{50} balioak jasotzen ditu, *L. major* promastigoteen aurrean.

1. Taula. R38 eta R38-P konposatuen EC_{50} , *L. major* promastigoteen aurrean

Konposatua	$EC_{50} \pm SD$ (μ M)
R38	$22,6 \pm 1,6$
R38-P	> 65

Emaitza horiek grafikoki irudikatu ziren dosi-erantzun kurba bat jarraituz (3. irudia).

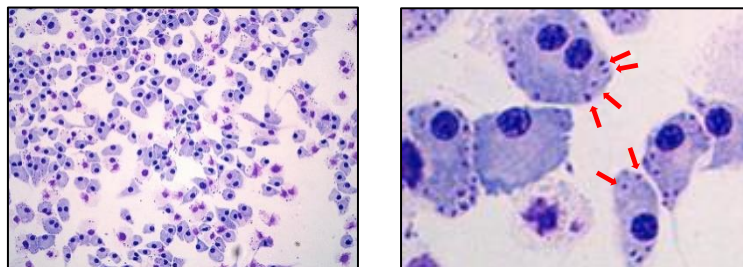
3. Irudia. *Leishmania major* espeziearen aurrean R38 eta R38-P konposatuen jardueraren dosi-erantzun kurbak



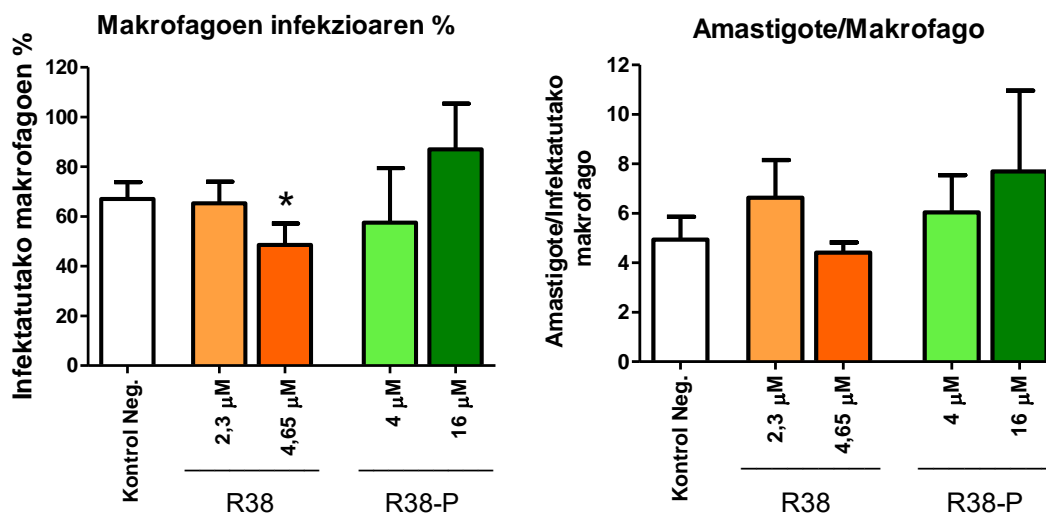
3.4 Konposatuen jarduera *Leishmania major* amastigoteen aurrean

Konposatuek amastigoteetan, hau da, parasitoen zelula barneko formetan, duten eragina ere aztertu zen. Horretarako, makrofago peritonealak erabili ziren. Makrofagoak DMEM (Gibco, AEB) ingurune osatuan erein ziren, parasitoekin batera, 1:20eko proportzioan (20 parasito makrofago bakoitzeko), eta 24 orduz inkubatu ziren 37°C-tan. Makrofagoak infektatu ondoren, hautatutako konposatuekin tratatu ziren (R38 eta R38-P) eta 37°C-tan eta % 5eko CO₂-an inkubatu ziren. R38 konposatuarekin bi kontzentrazio desberdin probatu ziren, 12,3 eta 4,65 μ M. R38-Parekin berriz, 4 eta 16 μ M. 24 orduko tratamenduaren ondoren, mikroskopia optiko bidezko kontaktaren bidez (4.irudia), makrofagoen infekzioaren ehunekoa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen ratioa zehaztu ziren. 5. irudian, lortutako emaitzak agertzen dira.

4. Irudia. Mikroskopia optikoz hartutako irudia. *Leishmania major* amastigoteekin infektatutako makrofagoak.



5. Irudia. R38 eta R38-P konposatuen jardura *Leishmania major* amastigoteetan. Infektatutako makrofagoen ehunekoa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua



R38 konposatuak nabarmen murriztu zuen infektatutako makrofagoen ehunekoa % 67tik (kontrol negatiboa) % 48ra, 4,65 µMeko kontzentrazioan. 20 µM baino kontzentrazio txikiagoetan, R38-Pk ez zuen jarduerarik izan amastigoteen aurrean.

4. Ondorioak

Lehenik eta behin, diziplina anitzeko lantalde bat eratu da diagnostikatutako leishmaniasiak aztertzeko eta gaixotasunaren erantzule diren parasitoak isolatzen saiatzeko. Ondoren, espeziea identifikatu eta ezaugarriak zehazteko.

Lankidetzaren esker, Nafarroan *Leishmania* parasito autoktonoak isolatu dira lehen aldiz, eta espeziea *Leishmania infantum* zela baieztatu zen.

Bestalde, R38 eta R38-P konposatu berrien jardueraren aurretiazko azterketak ondorioztatu zuen R38 konposatuak jardura leishmanizida duela, makrofagoen infekzioaren ehunekoa nabarmen murriztuz. R38-P konposatuak, dirudenez, ez du emaitza sendorik 20 µM baino kontzentrazio baxuagoetan. Aurretiazko azterketa izanik, honako hau konfirmatzeko, kontzentrazio gehiago frogatzea beharrezkoa da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

- Albaitariekin lankidetzaren mantendu.
- Nafarroatik datozen laginak isolatzen eta ezaugarritzen jarraitu, proiektua Euskal Herriko zonalde gehiagotara zabaltzeko aukerarekin.
- Konposatuen jardura terapeutikoaren azterketekin jarraitu.
- R38 eta R38-P konposatuen jardura zehaztu lortutako laginaren (*L. infantum*) eta beste *Leishmania* espezie batzuen aurrean.
- Konposatuen *in vivo* jardura aztertu.

6. Erreferentziak

- Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & den Boer, M. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Amela, C., Suarez, B., Isidoro, B., Sierra, M. J., Santos, S., & Simón F. (2012). Evaluación Del Riesgo de Transmisión de Leishmania Infantum En España. *Centro Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*. <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>
- Díaz-Regañón, D., Roura, X., Suárez, M. L., León, M., & Sainz, A. (2020). Serological Evaluation of Selected Vector-Borne Pathogens in Owned Dogs from Northern Spain Based on a Multicenter Study Using a Commercial Test. *Parasites and Vectors*, 13(1), 301. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04172-5>
- Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. (2018). Red de Vigilancia Epidemiológica de La Comunidad de Madrid. Enfermedades de Declaración Obligatoria Protocolo de Vigilancia de La Leishmaniasis. *Comunidad de Madrid*.
- El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-Sater, F., Gonzalez-Gaitano, G., Brandenburg, K., Martínez-de-Tejada, G., & Nguewa, P. (2021). Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against Leishmania and Other Parasites: An Overview. *Biomolecules*, 11(7), 984. <https://doi.org/10.3390/biom11070984>
- El-Dirany, R., Fernández-Rubio, C., Peña-Guerrero, J., Moreno, E., Larrea, E., Espuelas, S., Abdel-Sater, F., Brandenburg, K., Martínez-de-Tejada, G., & Nguewa, P. (2022). Repurposing the Antibacterial Agents Peptide 19-4LF and Peptide 19-2.5 for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Pharmaceutics*, 14(11), 2528. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112528>
- Fernández-Rubio, C., Larrea, E., Peña-Guerrero, J., Sesma-Herrero, E., Gamboa, I., Berrio, C., Plano, D., Amin, S., Sharma, A. K., & Nguewa P. (2019). Leishmanicidal Activity of Isoselenocyanate Derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(2), e00904-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00904-18>
- Fernández Martínez, B., Gómez Barroso, D., & Cano Portero, R. (2019). La Leishmaniasis En España: Evolución de Los Casos Notificados a La Red Nacional De Vigilancia Epidemiológica Desde 2005 a 2017 y Resultados de La Vigilancia de 2014 a 2017. *Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica*, 27(2), 15–27. <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/1086/1351>
- Gálvez, R., Montoya, A., Cruz, I., Fernández, C., Martín, O., Checa, R., Chicharro, C., Migueláñez, S., Marino, V., & Miró, G. (2020). Latest Trends in Leishmania Infantum Infection in Dogs in Spain, Part I: Mapped Seroprevalence and Sand Fly Distributions. *Parasites and Vectors*, 13(1), 204. <http://doi.org/10.1186/s13071-020-04081-7>
- van Griensven, J., & Diro E. (2019). Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B. C., Granados, M., San Martín, J. V., & Aparicio P. (2015). Epidemiological Changes in Leishmaniasis in Spain According to Hospitalization-Based Records, 1997–2011: Raising Awareness towards Leishmaniasis in Non-HIV Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003594. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003594>
- Nafarroako Osasun Publikoko Buletinak (1998-2021). http://www.navarra.es/home_es/Gobierno+de+Navarra/Organigrama/Los+departamentos/Salud/Organigrama/Estructura+Organica/Instituto+Navarro+de+Salud+Publica/Publicaciones/Publicaciones+profesionales/Epidemiologia/Boletin+ISP.htm
- EAEko Osasun Publikoari Buruzko Txostenak eta Aldizkari Epidemiologikoak (1998-2021). <https://www.euskadi.eus/informacion/informe-de-salud-publica/web01-a3vipub/es/>
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical Syndromes and Treatment. *QJM: An International Journal of Medicine* 107(1), 7-14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Medina-Acosta, E., & Cross, G. A. M. (1993). Rapid Isolation of DNA from Trypanosomatid Protozoa Using a Simple ‘mini-Prep’ Procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59(2), 327–29. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90231-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90231-1)
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., & Alvar, J. (1994). Infectivity of Dogs Naturally Infected with Leishmania Infantum to Colonized Phlebotomus Perniciosus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 491–93. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90446-4)

- Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z. (2019). Antimicrobial Peptides: New Hope in the War against Multidrug Resistance. *Zoological Research*, 40(6), 488-505. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062>
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martin, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., & Marzochi, M. C. (2011). Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118(2), 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>
- OMS (2010). Control de Las Leishmaniasis: Informe de Una Reunión Del Comité de Expertos de La OMS Sobre El Control de Las Leishmaniasis. *OMS, Serie de Informes Técnicos 949*.
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial Peptides: Key Components of the Innate Immune System. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 143-71. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis Emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15(10), 29-39. <https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en>
- Robles-Loaiza, A., Pinos-Tamayo, E. A., Mendes, B., Teixeira, C., Alves, C., Gomes, P., & Almeida, J. R. (2021). Peptides to Tackle Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4400 . <https://doi.org/10.3390/ijms22094400>
- Ruiz-Postigo, J. A. (2020). Global Leishmaniasis Surveillance, 2017-2018, and First Report on 5 Additional Indicators. *Weekly epidemiological record*, 95, 281-300. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/two-out-of-three-wild->
- Sesma, B. & Barricarte, A. (1997). Leishmaniasis in Navarra: Review of Activities. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 20(2), 209-216. <https://doi.org/10.23938/assn.0613>
- Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 951-58. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002>
- Vacas, A., Fernández-Rubio, C., Larrea, E., Peña-Guerrero, J., & Nguewa P.(2020). LmjF.22.0810 from Leishmania Major Modulates the Th2-Type Immune Response and Is Involved in Leishmaniasis Outcome. *Biomedicines*, 8(11), 452. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110452>
- Wortmann, G., Zapor, M., Ressler, R., Fraser, S., Hartzell, J., Pierson, J., Weintrob, A., & Magill, A. (2010). Liposomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 83(5), 1028-1033. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0171>

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiegu La Caixa fundazioari (LCF/PR/PR13/11080005) eta Nafarroako Kutxaren Fundazioari, Nafarroako Osasun Gobernuari (12/2017), Roviralta Fundazioari, Ubesol fundazioari, Laser Ebrori eta Inversores Garcilaso de la Vega SLri. Mila esker, berriro ere, Maite Loperena Barber laguntzagatik. Eskerrik asko ere, Guillermo Martínez De Tejada, Klaus Brandenburg, Juan Pablo Fuenzalida eta Stephanie Grümbeleri. Azkenik, COVETNA, Gous Gorraiz, Clínica Veterinaria Víctor Andueza, Dejando Huella, Centro Veterinario Sangüesa eta Belén Carasa Clínica Veterinariaren partehartzea eskertu nahi dugu.