

Leishmania y leishmaniasis. Veinte años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí": aportes y perspectivas

Leishmania and leishmaniasis. Twenty years of research at Pedro Kouri Tropical Medicine Institute: contributions and perspectives

Ana M. Montalvo Álvarez, Lianet Monzote Fidalgo

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por varias especies del género *Leishmania*, protozoo parásito que no circula en Cuba de forma autóctona. Sin embargo, se presentan casos importados. Existen tres formas clínicas principales y diversos métodos para realizar el diagnóstico, que incluyen los parasitológicos, serológicos y más recientemente, los moleculares. El tratamiento de elección son los antimoniales pentavalentes, los cuales presentan inconvenientes que han estimulado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Objetivos: resumir los resultados de trabajo obtenidos en el estudio de *Leishmania* durante 20 años y explicar las razones que motivaron la capacitación, entrenamiento e investigación de esta entidad en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Métodos: se realizó un estudio bibliométrico y se analizaron todos los resultados de trabajo del grupo de Leishmania del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" durante 20 años. Se consultaron todas las publicaciones realizadas en el grupo y se determinaron los resultados fundamentales en las principales líneas de investigación.

Resultados: se describen los aportes más importantes en áreas de investigación como la inmunización con ADN, el diagnóstico molecular y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, y se remite al lector a consultar las publicaciones que contienen los detalles de cada estudio. Se mencionan las colaboraciones principales con centros nacionales y extranjeros. Se comentan las perspectivas futuras del trabajo del grupo de investigación.

Conclusiones: el grupo ha acometido líneas de investigación de interés y es responsable del mayor aporte del país en el campo de investigación de este parásito, en correspondencia con su misión. La continuidad de la investigación, contribuir a la solución de algunos de los problemas aún no resueltos de esta parasitosis y la aplicación de los resultados obtenidos, será un reto para los próximos años.

Palabras clave: Leishmania; leishmaniasis; diagnóstico; alternativas terapéuticas; IPK; Cuba.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a parasitic disease caused by several species of the genus *Leishmania*. These protozoan parasites do not circulate autochthonously in Cuba, but imported cases may be found. There are three main clinical forms, and various methods are used to make the diagnosis. Among these are parasitological, serological and more recently molecular methods. The treatment of choice is pentavalent antimonials, though they have drawbacks which have led to the search for new therapeutic alternatives.

Objectives: summarize the work results obtained from the study of *Leishmania* for twenty years and explain the reasons fostering training, professional development and research about this condition at Pedro Kouri Tropical Medicine Institute.

Methods: a bibliometric study was conducted and an analysis was performed of all the results obtained by the *Leishmania* group at Pedro Kouri Tropical Medicine Institute in twenty years. All the materials published by the group were consulted, and determination was made of the fundamental results obtained in the main research lines.

Results: a description is provided of the most important contributions in research areas such as DNA immunization, molecular diagnosis and the search for new therapeutic alternatives, and readers are directed to the publications containing the details of each study. Mention is made of the main forms of cooperation with national and foreign institutions. Comments are provided on the future perspectives of the work of the research group.

Conclusions: the group has engaged in research lines of interest, and is responsible for the greatest contribution to the country in the field of research about the study parasite, in keeping with its mission. A challenge for the years to come is to maintain the continuity of the research, contribute to the solution of some problems still to be solved concerning this parasitic disease, and the application of the results obtained.

Keywords: *Leishmania*; leishmaniasis; diagnosis; therapeutic alternatives; IPK; Cuba.

INTRODUCCIÓN

Leishmania es un protozoo parásito que pertenece a la familia Trypanosomatidae, responsable de la enfermedad conocida como leishmaniasis. Según los últimos

estudios globales, esta parasitosis se distribuye en 98 países de todos los continentes, excepto Australia, y se reportan anualmente 2 millones de casos nuevos de las diferentes presentaciones clínicas: leishmaniasis cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV).¹ La caracterización clínica de cada una de estas formas se ha revisado ampliamente,² a lo que se debe añadir el reporte frecuente de presentaciones atípicas.^{3,4} A esta variedad clínica contribuyen factores genéticos e inmunológicos del hospedero y también la especie de *Leishmania* que parasita.⁵⁻⁷ Existen alrededor de 20 especies que pueden infectar al hombre, las cuales son transmitidas por cerca de 30 especies de pequeños insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, que circulan en áreas del Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente.

Como toda enfermedad parasitaria, la detección del agente causal en las muestras adecuadas constituye el diagnóstico por excelencia, pero factores relacionados con la variada sensibilidad del método y la necesidad de gran experiencia para su identificación, han impulsado el desarrollo de otras aproximaciones parasitológicas, serológicas y moleculares, encaminadas a incrementar la sensibilidad y especificidad y junto a ello, la seguridad diagnóstica para las diferentes variantes clínicas.^{8,9} En ese sentido, se ha documentado ampliamente que el diagnóstico molecular permite una máxima sensibilidad y especificidad diagnóstica. Por otro lado, el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) es el centro de referencia para las enfermedades infecciosas en Cuba, y debe disponer de las herramientas necesarias para enfrentar el diagnóstico de las parasitosis exóticas, entre ellas las leishmaniasis, considerando el flujo de personas provenientes de áreas endémicas, y el arribo de viajeros o cooperantes civiles que prestan servicio en otros países. Al desarrollo e implementación de estos métodos, en nuestro contexto, se hará referencia más adelante.

El tratamiento de elección de las diferentes formas de leishmaniasis lo constituyen los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) hace más de 60 años. Sin embargo, presentan limitaciones como la existencia de resistencia en muchas cepas, la necesaria administración parenteral y la elevada toxicidad. Otros fármacos pueden ser utilizados como alternativas de segunda línea, como son la anfotericina B y sus formulaciones lipídicas, la pentamidina y la miltefosina.¹⁰ No obstante, aún se considera que los fármacos disponibles no satisfacen a la población que sufre de esta parasitosis. Es por esto que se ha motivado el estudio de nuevas alternativas terapéuticas.

Hasta la actualidad, en Cuba no se reportan casos autóctonos de leishmaniasis, aunque se han presentado casos importados provenientes de diferentes áreas endémicas. La transmisión natural ocurre a través de la picadura de insectos de los géneros *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo). Entre las especies de *Lutzomyia* presentes en el país, cuya ecología, biología y distribución se estudió con sistematicidad en la década de los años 80, cuando un grupo de científicos liderados por el doctor *Israel García Ávila* realizó importantes aportes al conocimiento de estos insectos, se demostró que solo *Lutzomyia orestes* tiene comportamiento antropofílico y hematofágico, características que en teoría, pudieran incrementar su potencialidad vectorial.¹² Sin embargo, para que esta especie pueda involucrarse como vector de *Leishmania*, deben estudiarse en condiciones epidemiológicas una serie de características asumidas por la comunidad internacional en los años 90 que han sido enriquecidas con posterioridad, en la que el insecto vector, el individuo portador del parásito y el individuo susceptible, se relacionen en un entorno natural y no solo en condiciones artificiales de laboratorio.^{13,14}

Este artículo pretende resumir los resultados de trabajo obtenidos en el estudio de *Leishmania* durante 20 años y explicar las razones que motivaron la capacitación, entrenamiento y estudio de esta entidad en esas dos décadas. Para dar respuesta a este objetivo se tratará de identificar las principales áreas de investigación que se han abordado; caracterizar la evolución de los temas prioritarios y los aportes principales que se han podido realizar; así como los beneficios de la población cubana y la comunidad internacional a partir del trabajo del grupo de *Leishmania* del IPK.

MÉTODOS

Se realizó un estudio bibliométrico que consistió en una búsqueda electrónica en las principales bases de datos disponibles, incluyendo PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), SciELO (<http://www.sciELO.com>) y Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>). La consulta se realizó el 30 de junio de 2017, utilizando los términos "*Leishmania* AND Cuba" o "*Leishmaniasis* AND Cuba" y se utilizaron todos los artículos publicados hasta la fecha sin restricción de lenguaje o tipo de documento. De cada uno se analizó: año y tipo de publicación, idioma utilizado, título de la revista y tópico abordado. Finalmente, se analizaron los autores e instituciones de mayor contribución, considerando solo el primer autor.

Por otra parte, se analizó el contenido de artículos, informes técnicos, reportes de trabajo y tesis desarrolladas en el grupo de *Leishmania* del IPK, con la finalidad de conocer la cuantía y calidad del aporte de las investigaciones en el contexto particular de la institución. Se analizaron todos los resultados y se agruparon por temáticas los más importantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO

La búsqueda inicial en Pubmed mostró 96 y 85 artículos con los términos "*Leishmania*" o "*leishmaniasis*", respectivamente. Las publicaciones identificadas en Science Direct y SciELO no resultaron diferentes a las listadas en Pubmed. Todos los estudios obtenidos se analizaron individualmente, a excepción de los que aparecían repetidos. Tampoco se tomaron en cuenta los trabajos que se correspondían con autores de apellido "Cuba". Un total de 72 reportes se referían a trabajos realizados en nuestro país, contaban con la participación de autores cubanos o hacían mención de forma particular a Cuba.

De los artículos seleccionados, 65 (90,3 %) correspondían a estudios originales y 7 (9,7 %) a artículos de revisión, publicados a partir del año 1981, aunque los mayores aportes aparecen en la última década. Esto pudiera ser una consecuencia del creciente interés de investigadores y médicos en este tópico, así como de la incorporación de nuevas revistas a Pubmed, cuya visibilidad pudiera aumentar el interés profesional por difundir el conocimiento. La revista más utilizada fue la Revista Cubana de Medicina Tropical con 10 artículos (13,9 %), seguida de otras revistas internacionales como se presenta en la [tabla](#). En correspondencia con las revistas utilizadas, predominó el idioma inglés para las publicaciones, con 52 (72,2 %); mientras que en español solo aparecieron 13 (18,1 %). Las temáticas

más abordadas incluyen Farmacología 41 (56,9 %), Diagnóstico 17 (23,6 %), Vacunas 4 (5,6 %), Estudios Básicos 2 (3,0 %) y Vectores 2 (3 %). Las principales investigaciones han estado dirigidas a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y el desarrollo de métodos moleculares para la detección e identificación del parásito. En particular, se obtuvieron 41 (56,9 %) estudios *in vitro* y 14 (19,4 %) en modelos animales, algunos asociados en un mismo reporte, dirigidos fundamentalmente a la evaluación de nuevos productos terapéuticos o vacunas. Los artículos relacionados con Biología Molecular fueron 14 (19,4 %), vinculados en algunos casos a muestras de pacientes o vectores; se encontraron 8 (11 %) estudios en humanos y 2 (2,8 %) en vectores.

Tabla. Revistas con artículos publicados sobre *Leishmania* o leishmaniasis y Cuba durante el periodo 1981-junio de 2017

Revistas	No. de artículos	%
Revista Cubana de Medicina Tropical	10	13,9
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	6	8,3
Phytotherapy Research	4	5,6
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	3	4,2
Natural Product Communications		
Pharmaceutical Biology		
Revista de Medicina Tropical de Sao Paulo	2	2,8
Biomédica		
Biomedical Research International		
Chemotherapy		
Infection, Genetic and Evolution		
Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery		
Parasitology	1	1,4
Research in Complementary		
Acta Tropica		
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene		
Biochemical Pharmacology		
Biomedicine and Pharmacology		
Chemical Research in Toxicology		
Chemotherapy and Biodiversity		
Current Topics in Medicinal Chemistry		
Drug Research		
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases		
Experimental Parasitology		
Fitoterapia		
Immunology Cellular Biology		
International Journal of Dermatology		
ISRN Pharmacology		
Journal of Biomedicine and Biotechnology		
Molecules		
Parasitology Research		
Phytomedicine		
Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública		
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene		

Todo lo anterior concuerda con un estudio bibliométrico realizado a nivel global sobre *Leishmania*, en el que Cuba resultó entre los 30 países principales, de acuerdo con el número de artículos publicados en relación con la población existente.¹⁵

Tomando en cuenta la institución de procedencia o filiación del primer autor, el papel fundamental de este cúmulo de publicaciones le correspondió al IPK, con 53 artículos (73,6 %). Otras instituciones cubanas identificadas fueron la Facultad de Química de la Universidad de La Habana con 3 reportes (4,2 %), el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas con 2 cada una (2,8 %) y con 1 (1,4 %) aparecen el Centro de Bioactivos Marinos (CEBIMAR), el Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana y el Instituto Finlay. Entre las instituciones extranjeras se destaca la Universidad Técnica de Machala, Ecuador, con 2 (2,8 %) reportes y con 1 (1,4 %) el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid en España, la Universidad de Al Baha de Arabia Saudita, la Universidad de Chile, la Universidad de Ciencias Médicas de Kerman en Irán, la Universidad Nacional de Costa Rica, la Universidad de Texas en Estados Unidos de América (EUA) y la Universidad de Veterinaria de Viena en Austria.

Los resultados de este estudio bibliométrico sobre las investigaciones relacionadas con *Leishmania* en Cuba, muestran claramente el interés creciente en las investigaciones en este campo, así como el papel del IPK y sus especialistas en esta temática. Sería interesante profundizar en los reportes de otras enfermedades exóticas para Cuba, así como incrementar la colaboración con países endémicos.

EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

A finales de los años 90 comenzaron a darse los primeros pasos para asumir investigaciones relativas a *Leishmania* en el IPK (Fig.). Muchas áreas del conocimiento de esta parasitosis permanecían sin ser abordadas y numerosos temas de orden práctico estaban por resolver. Uno de los principales problemas eran las dificultades asociadas con el tratamiento, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas constituía un tema atractivo y necesario. Fue la temática inicial de estudio, aun cuando el grupo no había sido creado, y se mantiene hasta hoy, aportando el mayor número de datos e información relativa al efecto de productos sintéticos y naturales en diferentes modelos experimentales, lo cual abundaremos con posterioridad.

Los inicios del mantenimiento *in vitro* de las cepas, los primeros protocolos de experimentación en promastigotes y los intentos iniciales para determinar el efecto de algunos compuestos habían comenzado antes,¹⁶ sentando las bases de lo que más tarde se nucleó como el grupo de "*Leishmania*". Fue también el inicio de la colaboración con otras instituciones, como la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas y el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), de la Universidad de Antioquia, en Colombia, para elucidar el efecto de productos naturales obtenidos en Cuba.^{17,18} En paralelo, algunos investigadores se enfocaron en estudios relativos al control de la enfermedad desde una perspectiva profiláctica, creándose definitivamente, en 1997, el grupo de trabajo que para entonces inició las primeras investigaciones sobre inmunización con ADN en nuestro ámbito, un tema que resultaba novedoso y atrayente, tanto para *Leishmania* como para *Trypanosoma*.

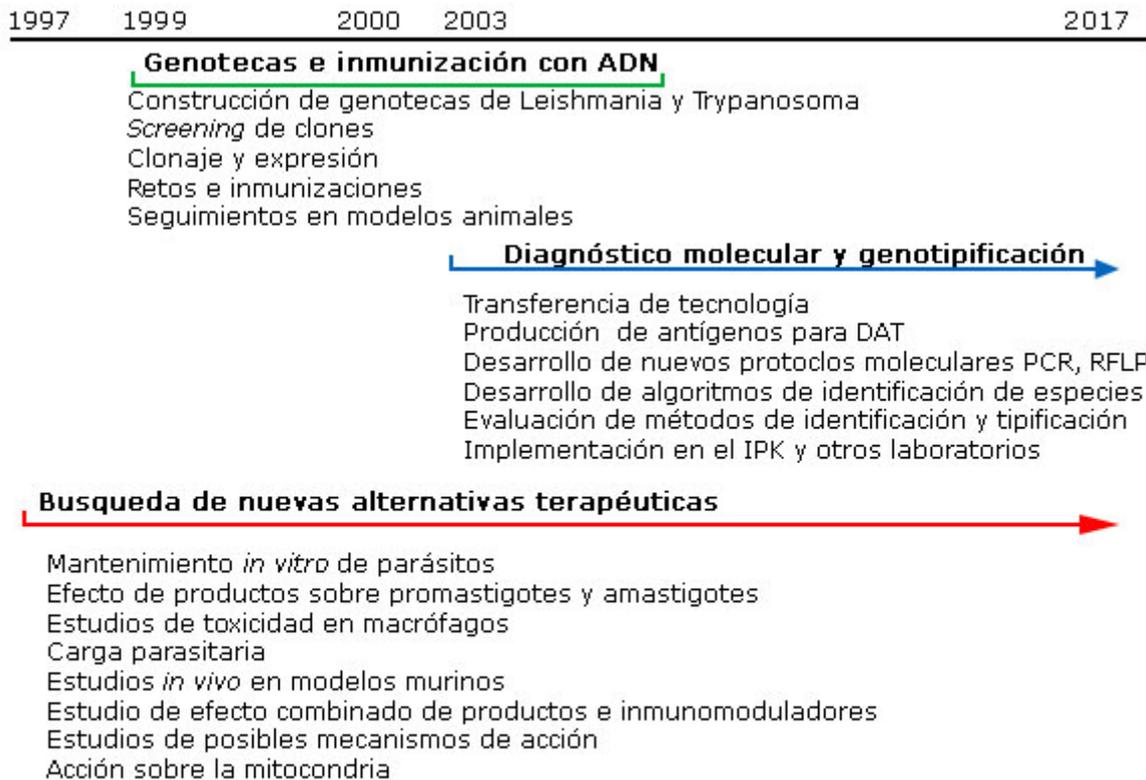


Fig. Resultados más importantes obtenidos por el grupo de *Leishmania* del IPK, en relación con las principales temáticas de investigación, durante 20 años.

INMUNIZACIÓN CON ADN

Esta línea inicial se mantuvo, aun con altibajos, hasta el año 2006 (Fig.). Con la colaboración del Instituto Finlay de Sueros y Vacunas (La Habana, Cuba), se construyeron y evaluaron las primeras genotecas de expresión de *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*^{19,20} con las cuales se realizaron otros estudios: se determinó la respuesta inmune humoral y celular específicas, así como la autoinmunidad en ratones inmunizados con la genoteca de *T. cruzi*.^{21,22} Estudios posteriores de inmunización con el ADN obtenido de estas genotecas y reto, demostraron el control del crecimiento de las lesiones o el curso de la enfermedad, respectivamente.²³⁻²⁶ Más adelante, el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid, España, acompañó varias tareas, como la obtención de una nueva genoteca, el tamizaje de clones, la inmunización y reto en modelo murino,²⁷ y el clonaje de una nueva proteína en *Leishmania* (HSP20).²⁸ Esta proteína se ensayó como vacuna de ADN en modelo experimental y no se demostró capacidad protectora contra el reto. Sin embargo, su forma recombinante se utilizó en un formato serológico ELISA para diagnóstico de la LV, lo que demostró su utilidad en la detección de anticuerpos en sueros de perros con LV canina, con mayor eficacia que en el suero de personas con la misma condición.²⁹

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO, MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN

Con el fin de disponer de métodos para el diagnóstico certero de las distintas formas de presentación de leishmaniasis, y de adoptar la tecnología molecular en las condiciones de nuestro laboratorio, se inició en 2003 un acercamiento científico

que derivó en larga y fructífera colaboración con el Instituto de Medicina Tropical de Amberes (IMT-A), Bélgica. La obtención del antígeno necesario para la realización del ensayo de aglutinación directa (DAT, siglas en inglés) y la puesta a punto del procedimiento mismo, útil para el diagnóstico serológico de la LV, constituyeron las primeras tareas, junto a la formación de capacidades para el diagnóstico molecular. En paralelo, comenzó la transferencia de la tecnología de PCR convencional y RAPD para la detección y genotipificación de *Leishmania*, la optimización y uso de diversos protocolos ya descritos en la literatura, aun básicamente aplicadas a estudios en cepas de referencia, para lo cual se utilizaron varios marcadores genéticos, y comenzaron los principales reportes que mostraban las capacidades adquiridas.³⁰⁻³² Más adelante, se profundizó en el estudio del gen *hsp70*, que codifica una proteína de choque térmico del parásito, tomando como base un reporte crucial de la literatura sobre su aplicabilidad en el diagnóstico.³³

Se obtuvieron y describieron por nuestro grupo 36 nuevas secuencias nucleotídicas en *Leishmania*, que se correspondieron con las principales especies, lo que paralelamente permitió realizar inferencias filogenéticas importantes,³⁴ que han constituido un referente en todos los estudios posteriores de este tipo para este parásito. El polimorfismo genético que se identificó en estas secuencias y un cuidadoso análisis de las mismas, sirvió de base además para proponer un nuevo algoritmo de PCR seguido del análisis de la talla de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), que permitió identificar las 16 especies de *Leishmania* de mayor importancia médica del Nuevo y el Viejo Mundo, tanto en cepas de referencia, como en muestras clínicas, a partir de un solo producto de PCR; aporte que marcaba el inicio de la atención sobre este gen y sus potencialidades en el diagnóstico, en otros escenarios.³⁵⁻³⁷ Estas aproximaciones, además, aportaron información novedosa y trascendente para la identificación de estos parásitos en contextos muy diversos, ofrecieron elementos que permitieron especular sobre una revisión de la taxonomía de *Leishmania* y sus implicaciones prácticas, en las condiciones clínicas y también para la investigación.³⁸ Sin embargo, evaluaciones preliminares del nuevo algoritmo de PCR-RFLP/*hsp70*, realizadas en nuestros laboratorios, al tiempo que reafirmaban la posible aplicabilidad de la propuesta, alertaron sobre la necesidad de procurar una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica, puesto que la reacción de amplificación de ese fragmento del gen *hsp70*, originalmente reportado por García y colaboradores (2004)³³ posee una talla considerable (1422pb), también amplifica para *Trypanosoma cruzi*, lo que conspiraba con la necesidad de disponer de una herramienta sensible, específica y de utilidad práctica.

En la etapa siguiente, el grupo se enfocó en la utilización de toda la información precedente como base de nuevos diseños, que cumplieran las expectativas necesarias para nuestro trabajo, y que pudieran ser igualmente útiles para otros laboratorios de países donde la leishmaniasis está presente. Se diseñaron a ese fin tres nuevas variantes de PCR, que amplifican tres fragmentos de menor talla del mismo gen *hsp70*, contenidos dentro del segmento anteriormente amplificado y secuenciado. Este acercamiento permitió utilizar algunos de los sitios polimórficos previamente identificados, que se correspondían con sitios de corte de enzimas de restricción, así como otros nuevos, de forma que se establecieron tres nuevos algoritmos de restricción enzimática, correspondientes a cada fragmento (PCR-F, PCR-N, PCR-C) los cuales brindan distintas alternativas para la identificación, tanto de especies del Nuevo, como del Viejo Mundo,^{39,40} y demostraron ser más sensibles y específicos que el protocolo precedente.

La evaluación de las "nuevas variantes", dirigida a comprobar su aplicabilidad para la detección y la identificación (tipificación) de las especies, en relación con la zona geográfica, constituyó un paso vital con miras a la futura implementación de los procedimientos que se proponían (Fig.). A este fin, se involucraron en nuestras investigaciones colaboradores de áreas endémicas, ya fuera facilitando muestras

clínicas diversas, protocolos establecidos en sus laboratorios como métodos de referencia, ayuda técnica cuando fue necesario, y algunos compartieron con nuestro colectivo la interpretación y análisis de los resultados obtenidos en relación con sus casos. En este propósito, resultó vital la participación directa del Instituto de Medicina Tropical Alejandro Von Humboldt, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú; la Universidad de San Simón, Cochabamba, Bolivia; nuevamente el PECET, Universidad de Antioquia; así como otros centros de Sudán, Israel, Italia y Túnez, que junto al IMT-A facilitaron las evaluaciones correspondientes a los protocolos aplicables a países del Viejo Mundo. Fue así que se determinaron las variantes más sensibles para la detección, las más eficientes para la tipificación, se realizaron comparaciones en relación con el tipo de muestra evaluada, entre protocolos aplicables a un mismo fin y otros aspectos útiles para el diagnóstico y la investigación, en correspondencia con el país o el área geográfica estudiada; lo que permitió proponer a la comunidad internacional el uso de estas herramientas moleculares (PCR-RFLP), que pueden aplicarse y adaptarse a contextos diferentes donde circulan diversas especies de *Leishmania*.⁴¹⁻⁴³

De otra parte, también se profundizó en el estudio de una pequeña proteína de choque térmico de 20kDa, previamente descrita y clonada por el grupo de investigación, cuya utilidad para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis, utilizándola de manera recombinante, había sido demostrada, como se mencionó con anterioridad.²⁹ Estos antecedentes permitieron retomar el análisis evolutivo de las especies a partir de la obtención y análisis de 39 secuencias nucleotídicas de 16 especies diferentes del parásito, y se demostró que este es un marcador molecular adecuado en estudios de tipificación, cuyas características podrían hacerlo un gen atractivo para el diagnóstico.⁴⁴ Fue entonces que se diseñó y desarrolló un nuevo protocolo de PCR-*hsp20* convencional, para el diagnóstico de género en *Leishmania*.

Esta nueva propuesta posee una sensibilidad que, si bien no alcanza las cifras reportadas para los blancos genéticos multicopias^{45,46} tampoco es despreciable (86%) y tiene la ventaja de permitir la discriminación de especies mediante la secuenciación, tomando en cuenta el carácter polimórfico del fragmento que se amplifica, en caso deseado o posible si las condiciones técnicas estuvieran disponibles.⁴⁷ El conjunto de estos nuevos resultados estimularon la preparación de un trabajo que compiló la información disponible sobre estas chaperonas moleculares presentes en *Leishmania* y su papel en los procesos fisiológicos celulares, ligados o no, al estrés celular,⁴⁸ lo que pudiera ser de utilidad en un futuro, en otros estudios con relación a este parásito o la enfermedad que causa.

De considerable importancia, y fin lógico de algunas investigaciones es la implementación, o sea, la posibilidad de disponer en los laboratorios de las herramientas desarrolladas, con la certeza científica de su utilidad y aplicabilidad. En tal sentido, se fueron creando de manera paulatina las condiciones para poner a la disposición de los médicos de asistencia estas herramientas en la medida que se fueron evaluando. En 2012, se propuso un algoritmo para el proceso diagnóstico de todo caso con sospecha de leishmaniasis, y que contiene los métodos parasitológicos y moleculares previamente desarrollados en el laboratorio de *Leishmania*, así como procedimientos que realizan otros grupos del IPK.⁴⁹ Esto permitió enfrentar de manera más amplia el diagnóstico de posibles casos sospechosos, combinando todas las herramientas disponibles.^{50,51} De forma paralela, nuevas evaluaciones han continuado,⁵² lo cual ha ofrecido información para su aplicación en distintos laboratorios, entre ellos el del IPK, donde un análisis retrospectivo de todos los casos de interés diagnóstico recibidos durante 10 años en nuestro laboratorio, mostró la positividad en cinco de ellos, todos provenientes de países del Nuevo Mundo.⁵³ De igual forma, en laboratorios de Perú, Bolivia y Colombia también se implementaron algunos de estos algoritmos, con fines diagnósticos e investigativos.

ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis ha sido una línea de investigación que empezó a desarrollarse desde la fundación del grupo en 1997. En un principio se estandarizaron algunos métodos *in vitro* frente a protozoos de *Leishmania* spp. cuantificándolos por conteo en cámara de Neubauer o mediante la actividad de la fosfatasa alcalina.¹⁸ En este período, se realizaron ensayos preliminares con la evaluación de algunos productos obtenidos por síntesis química como la clofazimina¹⁶ y los derivados del nitrovinilfurano.⁵⁴ La línea inicial de trabajo se reforzó considerablemente a partir del año 2000, con la incorporación de una investigadora Licenciada en Ciencias Farmacéuticas que se encargó de impulsarla. A partir de este momento, se han evidenciado tres etapas en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra *Leishmania*: estandarización, evaluación y desarrollo.

En la primera, se trabajó en la estandarización de diferentes métodos *in vitro* e *in vivo* que permitieran una mejor evaluación de las potencialidades de nuevos productos de manera integral, abarcando diferentes estudios relacionados con la efectividad, pero que también incluyeran los criterios de selección acorde con la toxicidad de los productos de manera preliminar. Entre las metodologías *in vitro* se incluye la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) frente a promastigotes y amastigotes intracelulares en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c; así como la concentración citotóxica media (CC₅₀) frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c sin infectar. A partir de estos datos se puede entonces calcular el índice de selectividad (IS), que no es más que la división de la citotoxicidad por la actividad ya sea en promastigotes o amastigotes (CC₅₀ / CI₅₀). Estos métodos fueron aplicados a varias especies de *Leishmania*, aunque la más trabajada por sus características de crecimiento *in vitro*, capacidad de infección y virulencia fue *L. amazonensis*, la cual fue utilizada también para realizar la reproducción de la LC experimental en ratones BALB/c.

Una segunda etapa fue dirigida a la evaluación de una amplia gama de productos, incluyendo compuestos obtenidos por vía sintética, extractos y principios activos de diferentes fuentes naturales e incluso formulaciones destinadas a otras terapias. Hasta la actualidad, se han evaluado más de 1 000 productos, de ellos 186 compuestos orgánicos, 1 080 productos naturales y 16 formulaciones. Entre los productos sintéticos se destacó la colaboración con el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas con los derivados del nitroviunilfurano,^{54,55} primeros productos que se evaluaron tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo*. Posteriormente, se evaluaron derivados de la tiadiazina,⁵⁶⁻⁵⁸ del ácido cinámico⁵⁹ y del cromanol⁶⁰ en colaboración con la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, el Centro de Química Farmacéutica (CQF), de La Habana, y la Universidad de Veterinaria de Viena en Austria, respectivamente. Esta última constituyó la primera colaboración internacional de mayor importancia a partir del año 2007. No obstante, los mejores resultados se han obtenido con compuestos puros aislados de fuentes naturales como dos benzofenonas: la nemorosona y la gutiferona A,⁶¹ compuestos fenólicos comunes de plantas⁶² y compuestos puros presentes en las plantas *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don (Montrieux et al. 2014), *Chenopodium ambrosioides* L.^{63,64} y en el hongo *Trametes versicolor* Bres. Rivarden.⁶⁵ Estos trabajos han sido realizados en colaboración con la Universidad Técnica de Machala de Ecuador, la Universidad Federal de Rio de Janeiro de Brasil, la Universidad de Amberes de Bélgica y la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, respectivamente.

Los productos de diversas fuentes naturales han sido los más explorados. Las primeras muestras evaluadas fueron aceites esenciales, en colaboración con el Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana desde el año 2000 y posteriormente con la Universidad de Hunstville de Estados Unidos de América desde el 2007. En particular, consideramos que en esta línea hemos obtenido los resultados más alentadores, incluyendo el aceite esencial de *Artemisia absinthium* L.,⁶⁶ *Bixa orellana* L.,⁶⁷ *Bursera graveolens* Triana & Planch,⁶⁸ *C. ambrosioides*,⁶⁸⁻⁷⁰ *Piper auritum* Kunt,⁷¹ *P. carolinensis*,⁷² entre otros estudios publicados.⁷³ En segundo lugar, se ha realizado un amplio trabajo de evaluación de diferentes plantas cubanas, en colaboración principalmente con el IFAL y otras instituciones como el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (ESPOL-CIBE), el Instituto de Ecología y Sistemática de Cuba, el Laboratorio de Biodiversidad de la Universidad Estatal Paulista Julio de Mesquita Filho de São Paulo en Brasil, la Universidad de Al Baha de Arabia Saudita y la Universidad de Querétaro, México. En paralelo, hemos contado con el apoyo de la Estación Experimental "Juan Tomás Roig", el Jardín Botánico Nacional de La Habana y las Fincas "La Quiruvina" y "Finca Muñoz" en la identificación y colecta de las plantas, respectivamente. Con este trabajo hemos podido demostrar las potencialidades de diferentes plantas cubanas como son: *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex J. C. Wendl,⁷⁴ *Bidens pilosa* L.,⁷⁵ *B. orellana*,⁷⁶ *Calophyllum antillanum* Bisse,⁷⁷ *Hura crepitans* L.,⁷⁴ *P. carolinensis*,⁷⁶ *Punica granatum* L.,⁷⁵ *Simarouba glauca* DC.,⁷⁴ así como de otras latitudes entre las que podemos mencionar: *Achillea biebersteinii* Afan. de Arabia Saudita,⁷⁸ *Ruyschia phylladenia* Sandwith de Costa Rica,⁷⁹ *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees de EUA,⁸⁰ *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob.'s de Ecuador⁸¹ entre otras colectadas en diferentes bosques tropicales.⁸² Adicionalmente, un amplio trabajo se desarrolló con extractos de plantas de la familia Solanaceae, en el que se evaluaron 46 especies y 226 extractos, siendo las especies del género *Solanum* las más activas y selectivas.⁸³

También se han evaluado extractos de otras fuentes naturales como son bacterias, hongos⁸⁴ algas e invertebrados marinos⁸⁵ y propóleos,⁸⁶ en colaboración con el Acuario Nacional de Cuba, el Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), la Facultad de Biología y el IFAL de la Universidad de La Habana y la Universidad de Oriente de Santiago de Cuba.

La evaluación de formulaciones se inició como servicio al Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) de Cuba, en aras de comprobar las propiedades farmacológicas de productos a importar a nuestro país. En otros casos, se ha trabajado en demostrar una nueva propiedad farmacológica a formulaciones ya existentes, como es el caso del Surfacen^{®87} y la solución CM-95 tratada magnéticamente, en colaboración con el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) de Mayabeque y el Centro de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) de Santiago de Cuba, respectivamente. No obstante, nuestro mayor interés ha estado encaminado al desarrollo de formulaciones diseñadas con los productos evaluados que han mostrado resultados promisorios, lo cual constituye uno de los avances de la tercera etapa de la línea de investigación. En este sentido se han diseñado fitoformulaciones con extractos de plantas del género *Solanum*⁸⁸ y nanopartículas basadas en cocleatos de los aceites esenciales,⁸⁹ ambos en colaboración con el IFAL.

En esta tercera etapa, los estudios también se han extendido a obtener más datos desde el punto de vista farmacológico, fundamentalmente sobre el mecanismo de acción. Entre los ensayos podemos destacar: la reversibilidad del efecto de un producto sobre el crecimiento de promastigotes tratados, la capacidad infectiva de promastigotes tratados y la inhibición de la función mitocondrial. Esta última ha sido blanco de diferentes estudios en los que se ha demostrado la acción de productos, como derivados del cromanol,⁶⁰ la nemorosona,⁹⁰ el xantohumol⁹¹ y el

aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes puros,⁶³ sobre el potencial de membrana mitocondrial o actividad entre los complejos I-III y II-III, lo cual se realizó en colaboración con la Universidad de Veterinaria de Viena. Recientemente, también se han realizado estudios sobre los mecanismos inmunológicos que pudieran contribuir al control de la infección, al estudiar el porcentaje de fagocitosis de macrófagos tratados, así como la producción de óxido nítrico y citoquinas *in vitro* e *in vivo*. Estos estudios se han llevado a cabo fundamentalmente con los laboratorios del Grupo Empresarial LABIOFAM, de Cuba. El conjunto de resultados más importantes en relación a cada línea de investigación, obtenidos por el grupo de trabajo durante los 20 años, se resume en la [figura](#).

CONSIDERACIONES FINALES

De forma general, se evidencian los aportes científicos de investigadores cubanos, en lo particular del grupo de trabajo creado en el IPK hace 20 años, como producto de la dedicación y constancia de sus investigadores, técnicos y colaboradores nacionales y extranjeros. Los temas abordados se corresponden a problemas no resueltos de *Leishmania* y la enfermedad que causa. La continuidad de este quehacer investigativo y la aplicabilidad de los resultados, deberá constituir una prioridad hacia el futuro, en tanto es recomendable mantener la actualización científica, la colaboración multidisciplinaria con áreas endémicas de esta parasitosis, así como la capacitación y cooperación con los profesionales cubanos.

Agradecimientos

Toda obra colectiva contiene el aporte de muchas personas. Sin embargo, no podríamos comenzar la lista de imprescindibles sin antes expresar nuestro más profundo recuerdo de gratitud a la memoria del profesor Gustavo Kourí Flores, cuya indiscutible visión científica y compromiso humano alentó e impulsó desde los primeros momentos la creación de este grupo de trabajo, al que acompañó y apoyó siempre. Los autores agradecen el apoyo de todos los investigadores, técnicos y estudiantes, que en alguna etapa tomaron parte de las investigaciones, aportando su inteligencia y entusiasmo al desarrollo de las líneas de trabajo. En especial, reconocemos el papel de: Esteban Alberti, Lisset Fonseca, Luis Fonte, Jorge Fraga, Marley García, Ivón Montano, Abel Piñón, Sergio Sifontes, Cecilia Torres. A todos nuestros colaboradores internacionales, ofrecemos nuestro más sincero reconocimiento.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012; 7: e35671.

2. Goto H, Lauletta-Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26:293-307.
3. Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1451-61.
4. Meireles CB, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha MDSV, da Silva CGL, et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Acta Trop.* 2017;172:240-54.
5. Handman E, Elso C, Foote S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2005;59:1-75.
6. Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;2:483-8.
7. Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *Trends Parasitol.* 2004;20:297-301.
8. De Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16:99-109.
9. Paiva-Cavalcanti M, Carla Silva de Morais RC, Pessoa-e-Silva R, Mendonça Trajano-Silva LA, da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque S, de Hollanda Cavalcanti-Tavares D, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci.* 2015;5:31.
10. Lauletta-Lindoso JA, Lopes Costa JM, Queiroz IT, Goto H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res Rep in Trop Med.* 2012;3:69-77.
11. González R, García I. Estudio y distribución de la familia Phlebotominae. Dos especies y una nueva subespecie para Cuba. La Habana: Ed. Científico Técnica; 1981.
12. Lugo J, Fuentes O, Castex M, Navarro A. Estudio de la actividad hematofágica y el tiempo de ingesta de *Lutzomyia (C) orestes* (Diptera, Psychodidae). Informe preliminar. *Rev Cubana Med Trop.* 1983;35:257-62.
13. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med Vet Entomol.* 1990;4:1-24.
14. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:227-50.
15. Ramos JM, González-Alcaide G, Bolaños-Pizarro M. Bibliometric analysis of leishmaniasis research in Medline (1945-2010). *Parasites & Vectors.* 2013;6:55.
16. Torres D, Montalvo AM, Finlay CM. Acción de la clofazimina sobre promastigotes de *Leishmania*. *Rev Cubana Med Trop.* 1986;39:33-8.
17. Sifontes S, Montalvo AM, Castañeda N. Acción *in vitro* de la serie G frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Informe Técnico. Unidad de Bioactivos Químicos, UCLV. Julio, 1998.

18. Montalvo AM, Sifontes S, Montano I, Espino AM. Necesidad del uso de cromógenos para cuantificar promastigotes de *Leishmania* sp. Rev Cubana Med Trop. 2000;52:2.
19. Montalvo AM, Alberti E, Fonte L, Díaz A, Acosta A. Amplification, sequencing and precloning of a molecule from *Leishmania braziliensis* that stimulates Th1 responses. Avances en Biotecnología Moderna. 1999;8.
20. Montalvo AM, Alberti E, González MM, García R, Acosta A, Fonte L. Construcción y expresión de una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis*. Rev Cubana Med Trop. 2001;53:154-60.
21. Alberti E, Fonte L. Specific cellular and humoral immune response in Balb/C mice immunized with an expression genomic library of *Trypanosoma cruzi*. Vaccine. 1998;16:608-12.
22. Alberti E, Montalvo AM, Ruiz A, García R, Martínez M, Sarmiento ME, et al. Evaluación de la respuesta inmune humoral por western blot en ratones inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. Rev Cubana Med Trop. 2001;53:170-9.
23. Montalvo AM, Monzote L, Fonte L, Díaz A, Fonseca L, Montano I. Inmunización con subgenoteca de *L. amazonensis* resulta protectora contra el reto en ratones BALB/c. Rev Latin Microb. 2002;44:313.
24. Montalvo AM, Fonte L. Significant and transitory control of lesion development in mice immunized with a genomic library of *Leishmania amazonensis*. Rev Patología Tropical. 2002;31:244-7.
25. Ruiz A, Alberti E, Montalvo AM, Acosta A, Sarmiento ME, García R, et al. Estudio de la inmunogenicidad y capacidad protectora de una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi* en ratones BALB/c. Rev Panam Infectol. 2004;6:19-25.
26. Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Munster A, Peña M, Ruiz A, et al. Evaluación de la autoinmunidad en ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. Rev Panam Infectol. 2005;7:6-13.
27. Montalvo AM, Monzote L, Fonseca L, Montano I, Fonte L, Soto M, et al. Inmunización con subgenoteca de *Leishmania amazonensis* protege contra el reto a ratones Balb/c. Rev Cubana Med Trop. 2004;56:103-10.
28. Montalvo AM, Folgueira C, Requena JM. Clonaje de la proteína de choque térmico de 20 kDa de *Leishmania amazonensis*. Rev Cubana Med Trop. 2009;61:2.
29. Montalvo AM, Folgueira C, Carrión J, Monzote L, Cañavate C, Requena J. The *Leishmania* HSP20 is antigenic during natural infections but as DDNa vaccine does not protect BALB/c mice against experimental *L. amazonensis* infection. J Biomed Biotech. 2008;2008: ID 695432.
30. Montalvo AM, Fraga J, Romero A, Monzote L, Montano I, Dujardin JC. PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. Rev Cubana Med Trop. 2006;58.

31. Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M. PCR-RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania* neotropical. Biomédica. 2008;28:597-606.
32. Monzote L, Ordeñana R, Fraga J, Montalvo AM, Montano I. Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico. Rev Cubana Med Trop. 2009;61:2.
33. García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arévalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004;42:2294-7.
34. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Inf Gen Evol. 2010;10:238-45.
35. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology. 2010;137:1159-68.
36. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Marín M, Van der Auwera G, et al. Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using *Bcl*I for hsp70 PCR-RFLP. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:364-7.
37. da Silva LA, de Sousa CdS, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. Infect Genet Evol. 2010;10:77-83.
38. Van der Auwera G, Fraga J, Montalvo AM, Dujardin JC. *Leishmania* taxonomy up for promotion? Trends Parasitol. 2010;27:49-50.
39. Montalvo AM, Fraga J, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:1453-61.
40. Fraga J, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. *Hind*III and *Sma*I digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. Diagn Microbiol Inf Dis. 2013;77:245-7.
41. Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild A, Valencia B, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. Diagn Microbiol Inf Dis. 2012;74:142-50.
42. Montalvo AM, Fraga J, El Safi A, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, et al. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80:35-9.
43. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Van der Auwera G, Marín M, et al. Identificación molecular con base en el gen hsp70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. Biomédica. 2016;36:37-44.

44. Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Inf Gen Evol.* 2013;18:229-37.
45. Van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon NCM, Ebeling SSM. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;51:133-42.
46. Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, Herdewijn P, et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop Med Int Health.* 2008;13:1378-83.
47. Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos-Cuentas A, García AL, et al. Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014;31:635-43.
48. Requena JM, Montalvo AM, Fraga J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. *Bio Med Res Int.* 2015;2015:ID 301326.
49. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Rev Cubana Med Trop.* 2012;64:108-31.
50. Montalvo AM, Blanco O, Capó V, Fraga J, Monzote L. ¿Leishmaniasis o psoriasis? Diagnóstico diferencial. *Rev Cubana Med Trop.* 2014;66:305-11.
51. Montalvo AM, De Armas Y, Fraga J, Blanco O, Menendez R, Montoto V, et al. Molecular and histological tools to diagnose an imported case of American cutaneous leishmaniasis in Cuba. *Int J Dermatol.* 2015;54:1175-9.
52. Montalvo AM, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, et al. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitol Res.* 2017;116:1843-8.
53. Montalvo AM. Leishmaniasis importada en Cuba 2006-2016. *BOLIPK.* 2017;27(15):115.
54. Sifontes S, Monzote L, Castañedo N, Montalvo AM, López Y, Mollineda N, et al. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* *in vitro* and *in vivo*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:166-73.
55. Monzote L. Evaluación de la actividad de dos nuevos compuestos frente a la leishmaniosis cutánea experimental. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Ciudad de La Habana, Universidad de La Habana, 1999.
56. Monzote L, Montalvo AM, Fonseca L, Perez R, Suarez M, Rodríguez H. Effect of derivatives of thiadiazine on amastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:329-30.

57. Monzote L, Montalvo AM, Fonseca L, Perez R, Suarez M, Rodríguez H. *In vitro* Activities of Thiadiazine Derivatives against *Leishmania amazonensis*. Drug Research. 2005;55:232-8.
58. Monzote L, Montalvo AM, Fonseca L, Perez R, Suarez M, Rodríguez H. Efecto de derivados de la Tiadiazina sobre la capacidad infectiva de promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Rev Cubana Med Trop. 2006;58:25-9.
59. Monzote L, Montalvo AM. Efecto *in vitro* de derivados del ácido cinámico frente a promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*. Informe Técnico. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba. Marzo, 2003.
60. Monzote L, Stamberg W, Rosenau T, Maes L, Cos P, Gille L. Synthetic Chromanol derivatives and their interaction with complex III in mitochondria from bovine, yeast and *Leishmania*. Chem Res Toxicol. 2011;24:1678-85.
61. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Matheeußen A, Van Assche T, Maes L, Cos P. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A. Phytother Res. 2011;25:458-62.
62. Monzote L, Perera WH, García M, Piñón A, Setzer WN. *In-vitro* and *In-vivo* Activities of Phenolic Compounds against Cutaneous Leishmaniasis. Rec Nat Prod. 2016;10:269-76.
63. Monzote L, García M, Pastor J, Gil L, Scull R, Maes L, et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. Exp Parasitol. 2013;136C:20-26.
64. Monzote L, Pastor J, Scull R, Gille L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. Phytomed. 2014;1:1048-52.
65. Leliebre V, Monzote L, Pferschy-Wenzig EM, Kunert O, Nogueiras C, Bauer R. *In vitro* antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). Molecules. 2016;21:1045.
66. Monzote L, Piñón A, Scull R, Setzer WN. Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from *Artemisia absinthium* from Cuba. Nat Prod Commun. 2014;9:1799-804.
67. Monzote L, García M, Scull R, Cuellar A, Setzer WN. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. Phytother Res. 2014;28:753-8.
68. Monzote L, Almannoni S, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. Chemotherapy. 2006;52:130-6.
69. Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. *In vitro* activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. Phytother Res. 2007;21:1055-8.
70. Monzote L, García M, Montalvo AM, Linares R, Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. Res Complementary. 2009;16:334-8.

71. Monzote L, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:168-73.
72. García M, Scull R, Satyal P, Setzer WN, Monzote L. Chemical characterization, antileishmanial activity and cytotoxicity effects of the essential oil from leaves of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don. (Asteraceae). Phytother Res. 2017; 31(9):1419-26. doi: 10.1002/ptr.5869.
73. Monzote L, Sariego I, Montalvo AM, Garrido N, Scull R, Abreu J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. Rev Cubana Med Trop 2004;56:230-3.
74. García M, Monzote L, Scull R, Herrera P. Activity of Cuban plants extracts against *Leishmania amazonensis*. ISRN Pharmacology. 2012;2012:1-7.
75. García M, Monzote L, Montalvo AM, Scull R. Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. Pharm Biol. 2010;48:1053-8.
76. García M, Monzote L, Montalvo AM, Scull R. *Bixa orellana* against *Leishmania amazonensis*. Res Complementary. 2011;18:351-3.
77. Cuesta-Rubio O, Oubada A, Bello A, Maes L, Cos P, Monzote L. Antimicrobial assessment of resins from *Calophyllum antillanum* and *Calophyllum inophyllum*. Phytother Res. 2015;29:1991-4.
78. Al-Sokari SS, Ali NA, Monzote L, Al-Fatimi MA. Evaluation of antileishmanial activity of Albaha medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. Biomed Res Int. 2015;2015:938747.
79. Steinberg KM, Shrestha S, Dosoky NS, Monzote L, Piñón A, Haber WA, et al. Cytotoxic and Antileishmanial Components from the Bark Extract of *Ruyschia phylladenia* from Monteverde, Costa Rica. Nat Product Commun. 2017;12:1-2.
80. Pulivarthi D, Steinberg KM, Monzote L, Piñón A, Setzer WN. Antileishmanial Activity of Compounds Isolated from *Sassafras albidum*. Nat Prod Commun. 2015;10:1229-30.
81. Manzano P, García M, Mendiola J, Fernández-Caliendes A, Orellana T, Miranda M, et al. *In vitro* anti-protozoal assessment of *Vernonanthura* extracts. Pharmacol Online. 2014;1:1-6.
82. Monzote L, Piñón A, Setzer WN. Antileishmanial Potential of Tropical Rainforest Plant Extracts. Medicines. 2014;1:32-55.
83. Monzote L, Jiménez J, Cuesta-Rubio O, Márquez I, Gutiérrez Y, da Rocha CQ, et al. *In vitro* assessment of plants growing in Cuba belonging to Solanaceae family against *Leishmania amazonensis*. Phytother Res. 2016;30:1785-93.
84. Leliebre-Lara V, García M, Nogueiras C, Monzote L. Qualitative analysis of an ethanolic extract from *Trametes versicolor* and biological screening against *Leishmania amazonensis*. Emirates J Food Agricult. 2015;27:1-4.
85. García M, Monzote L, Castañeda O, García N, Pérez A. Actividad antileishmanial de seis extractos de organismos marinos. Rev Cubana Med Trop. 2012;64:61-4.

86. Monzote L, Sariego I, García M, Cuesta-Rubio O, Campo M, Márquez I. Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. Nat Prod Commun. 2011;6:973-6.

87. Blanco O, Lugones Y, Díaz E, Monzote L. *In vitro* activity of the clinical pulmonary surfactant Surfacen® against *Leishmania amazonensis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2011;53:235-8.

88. Janssens J. Evaluation of *Solanum* spp. as antileishmanial lead products. Tesis presentada para optar por el grado de Máster en Farmacia. Amberes, Universidad de Amberes, Bélgica, 2017.

89. Tamargo B, Monzote L, Piñón A, Machín L, García M, Scull R, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of essential oil from *Artemisia absinthium* L. formulated in nanocochleates against cutaneous leishmaniasis. Medicines. 2017;4(2):38. doi: 10.3390/medicines4020038

90. Monzote L, Lackova A, Staniek K, Cuesta-Rubio O, Gille L. Role of mitochondria in the leishmanicidal effects and toxicity of acyl Phloroglucinol derivatives: nemorosone and guttiferone A. Parasitology. 2015;1:1-10.

91. Monzote L, Lackova A, Staniek K, Steinbauer S, Pichler G, Jäger W, et al. The antileishmanial activity of xanthohumol is mediated by mitochondrial inhibition. Parasitol. 2017;144:747-59.

Recibido: 6 de octubre de 2017.

Aceptado: 13 de octubre de 2017.

Ana M. Montalvo Álvarez. Departamento de Parasitología, CIDR, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía km 6½, La Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: amontalvo@ipk.sld.cu