

## **DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, NATASHA ANTONELLA NOLE MONTALVO, con cédula de identidad #1724811854, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado en ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above a solid horizontal line.

Firma

1724811854

## DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *CISTUS LADANIFER*, SOBRE LA  
EXPRESIÓN GENÉTICA DE *LEISHMANIA SPP*.**

Realizado por:

NATASHA ANTONELLA NOLE MONTALVO

Como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA HERRANZ

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lino Arisqueta Herranz', enclosed in a light gray rectangular box.

firma

## LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMIREZ

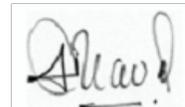
JUAN CARLOS NAVARRO

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



firma



firma

Artículo de tesis

# Evaluación del efecto de *Cistus Ladanifer* sobre la expresión genética de *Leishmania spp.*

Antonella Nole <sup>1</sup>, Lino Arisqueta <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Internacional SEK; nanole.bio@uisek.edu.ec

<sup>2</sup> Universidad Internacional SEK; lino.arisqueta@uisek.edu.ec

\* Autor de Correspondencia: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

**Resumen:** La leishmaniasis es una enfermedad tropical causada por el parásito intracelular del género *Leishmania*. Dentro del Ecuador se ha reportado la presencia de ocho especies de *Leishmania* en veintidós de las veinticuatro provincias del país. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se clasifican en tres categorías: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LM) y leishmaniasis visceral (LV). El sistema de vigilancia sanitaria nacional reporta aproximadamente 1000 casos anuales de leishmaniasis cutánea y mucocutánea entre el periodo de 2015 a 2021. Actualmente, el sistema de salud nacional usa el antimonio de meglumina (antimonio pentavalente) como tratamiento, sin embargo existen problemas de eficiencia y resistencia asociados al mismo. De esta manera, las plantas tienen el potencial de convertirse en una valiosa fuente de nuevos compuestos antiparasitarios. *Cistus ladanifer*; una especie vegetal usada en medicina ancestral; posee una notoria actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Leishmania*, provocando un fuerte descenso de la viabilidad celular de los promastigotes. Los análisis bioinformáticos de predicción de dianas sugieren la interferencia del aceite esencial con vías metabólicas que regulan el ciclo celular y la apoptosis. En vista de esto, hipotetizamos que el efecto leishmanicida del aceite esencial de *C. ladanifer* podría deberse a la activación de la vía apoptótica. Por tanto, nos planteamos el objetivo de analizar la expresión GSK-3 y EndoG, dos genes que participan tanto en la apoptosis independiente de caspasas como de la intrínseca y extrínseca. En este estudio se extrajo ARN total de cultivos celulares de *L. mexicana* y *L. infantum*, y se evaluó su integridad mediante gel de agarosa. Posteriormente se sintetizó ADNc y se realizó una RT-PCR usando el gen 18s ARNr como normalizador. Los resultados indican que el gen 18S ARNr no es un buen normalizador de la expresión de otros genes ya que el tratamiento con el aceite esencial de *C. ladanifer* provocó un descenso considerable de la expresión de este gen. Por otro lado, GSK-3 no se expresa lo suficiente para determinar el efecto de *C. ladanifer* sobre su expresión y la eficiencia de la amplificación de EndoG no fue suficientemente buena para extraer conclusiones.

**Palabras clave:** Leishmania; apoptosis; expresión génica, aceite esencial

**Abstract:** Leishmaniasis is a tropical disease caused by the intracellular parasite of the genus *Leishmania*. Eight species of *Leishmania* have been reported in twenty-two of the twenty-four provinces of Ecuador. The clinical manifestations of this disease are classified into three categories: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and visceral leishmaniasis (VL). The national health surveillance system reports approximately 1000 annual cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis from 2015 to 2021. Currently, the national health system uses meglumine antimoniate (pentavalent antimony) as the main treatment, but there have been efficiency and resistance problems associated with it. In this context, plants have the potential to become a valuable source of new antiparasitic compounds. *Cistus ladanifer*, a plant species used in ancestral medicine, possesses a notorious inhibitory activity on the growth of *Leishmania*, causing a strong decrease in the cell viability of the promastigotes. Bioinformatic target prediction analyses suggest interference of the essential oil with metabolic pathways that regulate cell cycle and apoptosis. Thus, we hypothesized that the leishmanicidal effect of *C. ladanifer* essential oil could be due to the activation of the apoptotic pathway. Therefore, we aimed to analyze GSK-3 and EndoG expression, two genes involved in both caspase-independent apoptosis and intrinsic and extrinsic apoptosis. In this study, total RNA was extracted from cell cultures of *L. mexicana* and *L. infantum*, and its integrity was evaluated by agarose gel. Subsequently, cDNA was synthesized and RT-PCR was performed using the 18S rRNA gene as a normalizer. The results indicate that the 18S rRNA gene is not a good normalizer for this study since treatment with *C. ladanifer* essential oil caused a considerable decrease in the expression of this gene. On the other hand,

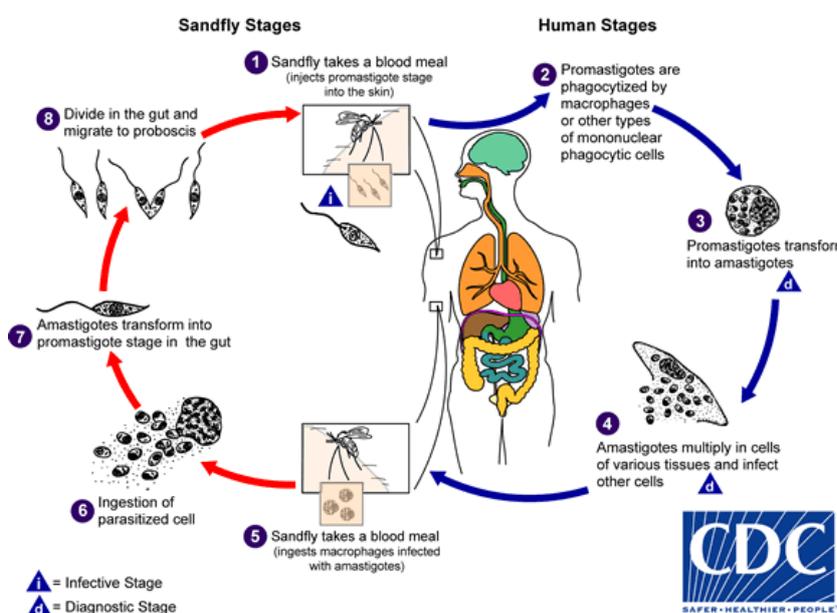
GSK-3 is not sufficiently expressed to determine the effect of *C. ladanifer* on its expression and, the efficiency of EndoG amplification was not good enough to draw conclusive data.

**Keywords:** Leishmania; apoptosis; gene expression, essential oil

## 1. Introducción

La Leishmaniasis es una enfermedad tropical y subtropical causada por el parásito intracelular perteneciente a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida y género *Leishmania*. La presencia de esta enfermedad ha sido reportada a nivel mundial en 89 países y actualmente es clasificada como endémica en muchos países en África, Asia y América (Arenas et al., 2017), siendo considerada a nivel internacional como una de las diez enfermedades de carácter tropical más desatendidas según la Organización Panamericana de la Salud (2021).

Dentro del continente americano se han identificado 15 especies de *Leishmania* clasificadas como patógenas para el ser humano; y en Ecuador se ha reportado la presencia de *Leishmania* en veintidós de las veinticuatro provincias, registrándose la presencia de las 8 especies siguientes: *L. mexicana*, *L. (L.) major like*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) Naiffi*, *L. (V.) amazonensis* (Toalombo Espin & Coque Procel, 2021).



**Figura 1.** Ciclo de infección de parásitos del género *Leishmania* (Division of Parasitic Diseases and Malaria CDC, 2020)

El ciclo de infección de la *Leishmania*, que se observa en la **figura 1**, empieza con la picadura de una mosca del género *Lutzomyia* a un mamífero hospedador que ingiere macrófagos infectados con amastigotes (forma intracelular del parásito) (Bates, 2007). En el Ecuador se han detectado 10 especies de moscas dentro de este género (Toalombo Espin & Coque Procel, 2021). Posteriormente, los amastigotes se transforman en promastigotes móviles en el intestino de la mosca y se dividen. Cuando la mosca pica a otro mamífero, que puede ser un humano, le inyecta los promastigotes que serán fagocitados por los macrófagos del nuevo hospedador y, dentro de los mismos, se convertirán en amastigotes. Estos amastigotes pueden multiplicarse en células de varios tejidos e infectar otras células. Cuando una mosca pique a este último hospedador, volverá a ingerir nuevamente los parásitos, completando así el ciclo de vida (Sunter & Gull, 2017).

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad pueden ser variadas, pero generalmente se clasifican en tres categorías en función de sus signos. En este sentido, las clasificaciones médicas de esta enfermedad son: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LM) y leishmaniasis visceral (LV) (S. Thakur et al., 2020). Generalmente las lesiones de LC se identifican como una pápula supurativa individual, aunque pueden presentarse múltiples lesiones (Mann et al., 2021). La LM por su parte puede causar lesiones graves en la mucosa de la laringe y naso-orofaringe, reportando síntomas nasales crónicos que incluyen secreciones, epistaxis y dolor (Aronson et al., 2016). Por último, la forma más letal corresponde a la LV, también conocida como kala-azar, y está asociada principalmente a la *L. (L.) infantum*. Este tipo de leishmaniasis comprende un amplio rango de síntomas asociados a la infección, llegando a causar estragos generales en el sistema linfático y hematógeno (Herwaldt, 1999).

La leishmaniasis cutánea, la forma más común en el continente americano, está presente de forma endémica en 18 países, incluido el Ecuador (Organización Panamericana de la Salud, 2021). Los reportes del sistema de vigilancia sanitaria nacional señalan la detección de aproximadamente 1000 casos anuales de leishmaniasis cutánea y mucocutánea entre 2015 y 2021 (Ministerio de Salud Pública, 2022). Frente a esta situación el Ministerio de Salud Pública usa el antimoniato de meglumina (antimonio pentavalente) como primera línea de defensa, el cual funciona a través de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de ATP en el parásito (Vargas et al., 2019). La segunda línea de defensa está comprendida por la anfotericina B, la cual aumenta la permeabilidad de la membrana a través de la formación de radicales libres en la célula (Steinbach et al., 2020), y finalmente la miltefocina, que actúa alterando el metabolismo de fosfolípidos y comprometiendo la integridad de la membrana del protozoario (Pinto-Martinez et al., 2018).

A pesar de que estos medicamentos son utilizado hoy en día contra LC y LM, existen algunos problemas asociados, como la variación del nivel de eficiencia entre poblaciones, la aplicación intravenosa que solo puede ser administrada luego de la hospitalización, la variación de eficacia en función de las especies de *Leishmania*, el costo, la necesidad de aplicación de varias dosis, el desarrollo de resistencia al medicamento, entre otros efectos adversos como cirrosis o toxicidad pancreática (Pradhan et al., 2022; C. P. Thakur et al., 1998). Bajo este contexto, las plantas representan una fuente prometedora de nuevos productos naturales con potencial medicinal para la búsqueda de principios activos que cumplan dicha función antiparasitaria.

Ecuador, al ser considerado un país megadiverso, cuenta con una flora reconocida ampliamente por su uso en la medicina tradicional de las comunidades amazónicas (Armijos et al., 2021). Por ejemplo, *Cistus ladanifer*, también conocida como "jara", es una especie vegetal perteneciente a la familia Cistaceae y género *Cistus*. Esta planta es usada en medicina natural debido a sus propiedades antiinflamatorias, antibióticas, y antiparasitarias (Köse et al., 2017). En ese sentido, el extracto de *Cistus ladanifer* fue evaluado en la Facultad de Salud de la UISEK como agente antiparasitario. Según Delgado & Arisqueta (2022) el aceite esencial de *C. ladanifer* posee una potente actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Leishmania*, provocando un fuerte descenso de la viabilidad celular de los promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum*. Además, los análisis bioinformáticos preliminares realizados por Delgado & Arisqueta (2022) a partir de los compuestos presentes en el aceite esencial y su estructura, indican que éste tiene el potencial de interferir en diversas rutas metabólicas, entre ellas la cascada MAPK, la vía de señalización del calcio, el metabolismo del ácido araquidónico y la vía de señalización de AMPc, así como en procesos celulares como la apoptosis. De hecho, todas las rutas de indicadas, participan también, de alguna manera, en la regulación de la apoptosis.

En vista de estos resultados, hipotetizamos que el efecto leishmanicida del aceite esencial de *C. ladanifer* podría deberse a la activación de la vía apoptótica. Por tanto, nos planteamos el objetivo de analizar la expresión de varios genes relacionados con la proliferación, la apoptosis y control del ciclo celular incluidos algunos de los que participan en las vías metabólicas indicadas previamente. El estudio de la transición entre el ciclo celular de *Leishmania* en mamíferos e insectos es crucial para identificar moléculas y mecanismos esenciales que regulan este proceso. Estos hallazgos pueden ser utilizados para desarrollar tratamientos más efectivos contra la leishmaniasis en el futuro.

Se seleccionaron genes involucrados en las rutas metabólicas reportadas por Delgado & Arisqueta (2022). El gen de glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) codifica una proteína que controla la síntesis de glucógeno y afecta la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c para la activación de la apoptosis intrínseca (Lin et al., 2020) Además, la inhibición de GSK-3 induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 (Efstathiou & Smirlis, 2021) . De esta manera en *Leishmania* spp este gen está involucrado en la respuesta al estrés, la infección a macrófagos y la supervivencia intracelular en el hospedador (Martínez de Iturrate et al., 2020). Por otro lado, endonucleasa G (EndoG) participa en la ruptura de secuencias de ADN cerca de las posiciones de guanina, cooperando en procesos como la apoptosis independiente de caspasas y el desarrollo celular (Azami et al., 2018).

## HIPÓTESIS

El efecto leishmanicida del aceite esencial de *C. ladanifer* se debe a la activación de mecanismos celulares que llevan a la apoptosis.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a los efectos leishmanicidas del aceite esencial de *C. ladanifer* sobre *L. mexicana*

## ESPECÍFICOS

### Operativos

1. Optimizar el protocolo de extracción de ARN de cultivos de promastigotes de *L. mexicana*
2. Evaluar la utilidad del gen 18S como normalizador de la expresión genética tras el tratamiento con el aceite esencial de *C. ladanifer*.

### Científicos

3. Analizar la implicación del proceso apoptótico en los efectos leishmanicidas observados tras el tratamiento con el aceite esencial de *C. ladanifer* mediante el análisis de la expresión de genes implicados en el mismo
4. Analizar los efectos del aceite esencial de *C. ladanifer* sobre la regulación del ciclo celular de *L. mexicana*, mediante el análisis de la expresión de genes implicados en la misma.

## 2. Materiales and Métodos

### 2.1. Reactivos y equipos empleados

Medio de cultivo de insectos Schneider's *Drosophila* (Sigma Aldrich, S9895), hidróxido de sodio 100% (NaOH) y ácido clorhídrico 1% (HCL) (Merck), cloruro de sodio 10% (NaCl) (J. T. Baker), bicarbonato de sodio 99.7% (NaHCO<sub>3</sub>), cloruro de calcio dihidratado 99% (CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O), dimetilsulfóxido (DMSO) 99% ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), suero fetal bovino inactivado (Eurobio Scientific), penicilina/estreptomomicina 1 µg/mL, azul de tripán, PBS 1X, formalina, etanol 70%, extracto de *C. ladanifer* 1 mg/mL.

RNAPro Solution (MP Biomedicals), PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), PureLink™ DNase Set (Thermo Fisher Scientific), iScript ADNc Synthesis Kit (BioRad), iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), bromuro de etidio (Invitrogen), SafeView Classic (Applied Biological Materials), Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen), agarosa (Sigma-Aldrich), UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific), los oligonucleotidos fueron sintetizados por la casa commercial Macrogen.

Cabina de flujo laminar modelo Miniflow 120 (Instrulab Q), incubadora 26 °C (Memmert), agitador magnético, autoclave modelo 25X-1 (All American), balanza analítica modelo BAS31PLUS (Boeco), pHmetro modelo Orion Star A111 (Thermo Scientific), bomba de vacío modelo R-300 (Boeco), microscopio binocular modelo CX-21 (Olympus), centrifuga modelo XC-2450 (Premiere), refrigeradora modelo 2015KLXB (Durex), Qubit 2.0

Fluorometer (Thermo Scientific), CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad), PCR Proflex (Thermo Scientific).

## 2.2. Cultivo de *L. infantum* y *L. mexicana*

El Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador (CIZ) proveyó los promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum*. El cultivo celular se realizó en flasks de 25 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific) con un contenido de 5 mL de medio Schneider's Drosophila (Sigma-Aldrich, S9895), el cual fue suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS) y 1 µg/mL de penicilina-estreptomicina (Andrade et al., 2016; Koutsoni et al., 2019).

Los cultivos fueron incubados a 26° C y se realizaron subcultivos cada 3 o 4 días de crecimiento. Para éstos se emplearon 500 µL de cultivo como inóculo inicial para ambas especies de *Leishmania*.

Los parásitos utilizados para los tratamientos deben estar en fase estacionaria, es decir en el cuarto día de crecimiento. Durante esta fase se prepararon alícuotas de 10 µL de ambas especies de *Leishmania* y se realizaron las siguientes diluciones: *L. mexicana* se diluyó y fijó con PBS 1X suplementado con 1% formalina hasta alcanzar una dilución 1/100. Por otro lado, la alícuota de *L. infantum* se llevó a una dilución 1/80 con PBS 1X. El conteo celular se realizó mediante cámara de Neubauer en microscopio óptico usando la fórmula 1 para la determinación del número de células por mililitro:

$$\# \text{ de parásitos/mL} = \frac{\# \text{ parásitos totales}}{4} * 10\,000 * \text{factor de dilución} \quad (1)$$

Simultáneamente se verificó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul de tripano a través de la fórmula 2; para este proceso se colocaron 75 µL de las diluciones más 25 µL de azul de tripano respectivamente. Una vez cargada la muestra en la cámara de Neubauer se realiza el conteo de células en los cuatro cuadrantes de las esquinas.

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\# \text{ total de células viables}}{\# \text{ total de células}} * 100 \quad (2)$$

## 2.3. Tratamiento

Los tratamientos fueron realizados en las concentraciones de IC<sub>50</sub> del aceite esencial de *C. ladanifer* determinados por Delgado & Arisqueta (2022) para cada especie. El estudio indica que el valor de IC<sub>50</sub> para *C. ladanifer* en *L. mexicana* fue de 13,87 µg/mL, mientras que para *L. infantum* el valor de IC<sub>50</sub> fue de 13,46 µg/mL.

Para los tratamientos, el aceite esencial fue disuelto en DMSO. La solución de control únicamente contenía medio de cultivo Schneider's Drosophila (Sigma-Aldrich, S9895) suplementado con 10% de FBS, 1 µg/mL penicilina – estreptomicina y 2% DMSO. Todos los tratamientos incluyeron el mismo % de DMSO en el mismo medio de cultivo suplementado con FBS.

Se realizó el conteo celular de cada especie de *Leishmania* y se determinó el volumen necesario para obtener 1 x 10<sup>7</sup> de células. Éstas se centrifugaron a baja velocidad y se eliminó el medio de cultivo viejo para resuspenderlas en 1 mL de medio fresco conteniendo DMSO en el porcentaje indicado más arriba o los tratamientos. Finalmente, las células fueron incubadas por 24h a 26 °C en tubos Eppendorf de 1,5 mL.

## 2.4. Extracción de ARN, cuantificación, evaluación de su integridad y obtención de ADNc

El proceso de extracción de ARN total se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Invitrogen PureLink RNA Mini Kit) manteniendo una temperatura de 4 °C durante todo el proceso y usando el método TRIzol para la lisis celular. Asimismo, se eliminó el ADN mediante el uso de un kit de remoción, PureLink Dnase. Una vez obtenido el eluato final, se procedió a cuantificar la concentración de ARN en el equipo Qubit 2.0 Fluorometer de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Invitrogen Qubit RNA Assay Kit). El análisis de la integridad se realizó cargando 1 µg del ARN en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Invitrogen, 15585011) o SafeView Classic y corriéndolo durante 40 min a 100 V.

La síntesis de ADNc se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (BioRad iScript ADNc Synthesis Kit). Se emplearon 0,5 µg de ARN para cada reacción.

### 2.5. RT-PCR

El equipo utilizado fue CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad. El procedimiento empleado para el termociclado es el siguiente: mantenimiento de las muestras a 50 °C durante 2 min, seguido de 95 °C durante 10 min; a continuación, se realizaron a 40 ciclos de RT-PCR. Durante cada ciclo las muestras se conservaron a 95 °C durante 15 s para separar las hebras de DNA, e inmediatamente a 60 °C por 1 min. Adicionalmente se realizó una prueba de disociación para evaluar la especificidad de los productos. La reacción de RT-PCR se preparó de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Bio rad- iTaq Universal SYBR Green Supermix) en una placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción contenía 2 µL de cada primer (forward y reverse), 10 µL de master mix y 6 µL del ADNc en la dilución apropiada.

El diseño de los *primers* se realizó usando parámetros estándar del programa bioinformático (Primer3Plus - Bioinformatics) y mediante la búsqueda bibliográfica de sets previamente diseñados. Los oligonucleótidos descritos en la **tabla 1** fueron sintetizados por Macrogen.

**Tabla 1: Primers diseñados para RT-PCR**

Set de primers	Anotación	Primers (5' - 3')
HKG1*	18S ARNr <sup>1</sup>	FW GGGAAACCCCGGAATCACAT RV GGTGAACCTTCGGGCGGATA
ENDOG	Endonucleasa G	FW GCAACCGCAGCAACTTCTAC RV TCACCTCCTTGCTCAGCTTG
GSK-3s	Glucógeno Sintasa Kinasa <sup>2</sup>	FW ACCGCCATGACATGTCGCTCAACGCTGC RV CCCCTCGAGCTGCTTGCGAACTAGCTT

\*Gen de referencia. FW forward. RV reverse. Primers obtenidos de fuentes bibliográficas; <sup>1</sup>PMID: 28708893. <sup>2</sup>PMID: 19445946

En la RT-PCR se estableció el número de ciclos de amplificación requeridos para llegar a un valor umbral de fluorescencia. Este número de ciclos se interpoló en una curva patrón elaborada empleando diluciones seriadas (1/5, 1/10 1/100 y 1/1000) de una mezcla de ADNc que sirvió como patrón de referencia. En el caso de la curva patrón para el gen de normalización, mucho más expresado, se emplearon diluciones mayores, correspondientes a 1/500, 1/5000, 1/50 000, 1/500 000.

### 2.6 Calculos estadísticos

Todas las comparaciones de datos fueron evaluadas para determinar su significancia mediante la prueba t de student de dos colas, utilizando el software GraphPad Prism 9.5.1. Los valores de P < 0.05 indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

## 3. Resultados

**Extracción de ARN y análisis de la integridad: el TRIzol ofrece mejores resultados que el buffer de lisis comercial, aunque se debe hacer un paso adicional de purificación de ARN para eliminar el ADN genómico.**

A la hora de analizar la expresión de los genes relacionados con la apoptosis, proliferación y control del ciclo celular, el primer problema que hubo que afrontar fue la obtención de suficiente ARN de la calidad adecuada a partir de los cultivos de promastigotes tratados y sus controles. Se emplearon dos métodos de extracción: uno de ellos empleaba el buffer de lisis aportado por el kit de Invitrogen (Purelink RNA Mini Kit), mientras que el otro empleaba TRIzol para romper las células antes de pasar a emplear la columna proporcionada por el mencionado kit. Este último método proporcionó mayor rendimiento de ARN con concentraciones en el rango entre 0,14  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  tal y como se muestra en la **tabla 2**. Así, se decidió emplear este método en las sucesivas extracciones.

**Tabla 2: Concentraciones de ARN en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  obtenidas usando TRIzol y Buffer de lisis con 1% DTT 2M**

Muestra	TRIzol	Buffer de Lisis
Control <i>L. mexicana</i>	0,176	0,121*
Tratadas <i>L. mexicana</i>	0,187	0,118*
Control <i>L. infantum</i>	0,152	0,135
Tratadas <i>L. infantum</i>	0,167	0,119*

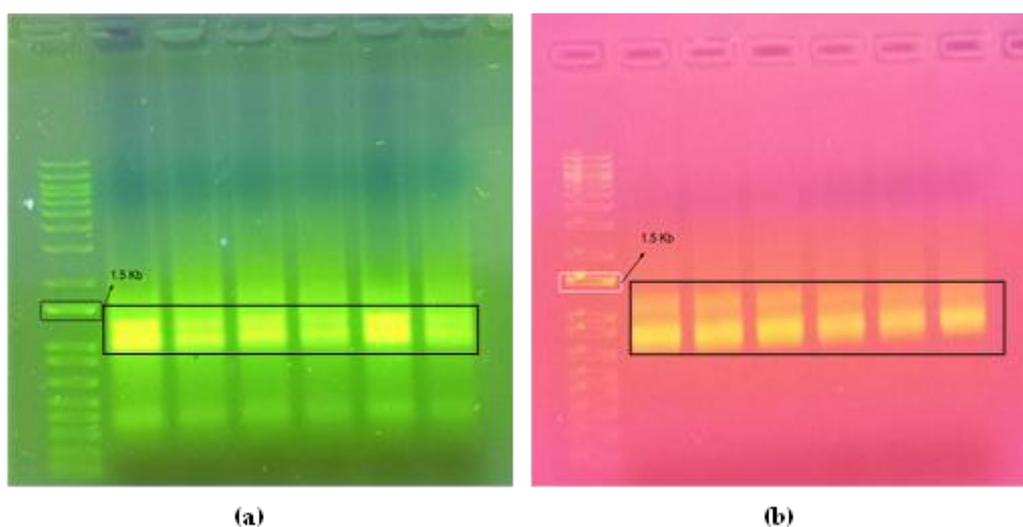
\*La diferencia entre la concentración de ARN obtenido por el método TRIzol y Buffer de Lisis es estadísticamente significativa según la prueba t de student ( $p < 0.05$ )

Tras la extracción, y antes de proceder a la obtención del ADNc, es imprescindible comprobar la integridad del ARN, así como la presencia de contaminantes de ADN genómico. En la **figura 2**, se muestra un gel donde se hace evidente la presencia de abundante contaminación de ADN genómico (recuadro verde). Esto nos obligó a emplear un kit adicional de purificación del ARN (DNase Set PureLink) antes de proceder a la retrotranscripción.



**Figura 2.** Análisis de la integridad y pureza del ARN extraído de promastigotes de *Leishmania*. El recuadro verde indica la presencia de contaminantes de ADN genómico

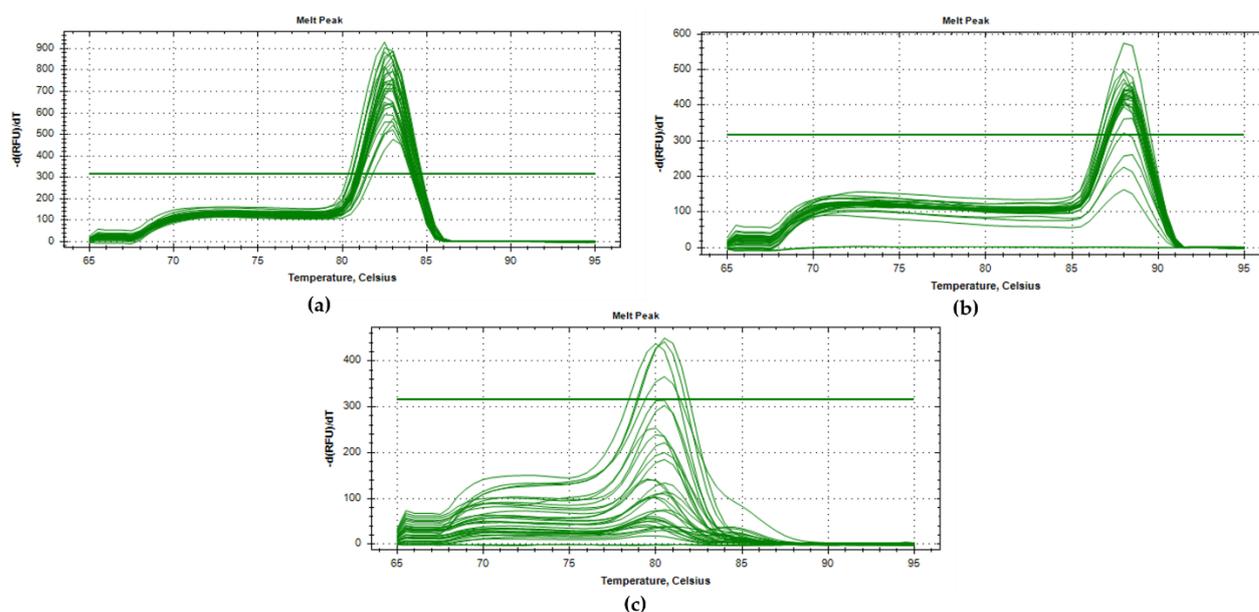
Como puede observarse en la **figura 3** el empleo del kit de purificación logró eliminar la contaminación de ADN, manteniendo una buena integridad. El ARN de *L. mexicana* y *L. infantum* no presenta signos evidentes de degradación y pueden identificarse las bandas de ARNr asociadas a las subunidades ribosomales.



**Figura 3.** Se uso Invitrogen TrackIt 1Kb plus DNA Ladder. (a) Gel de integridad SafeView de muestras de ARN de *L. mexicana*.; (b) Gel de integridad con EtBr de muestras de ARN de *L. infantum*

**Análisis de la expresión genética por RT-PCR. 18S ARNr no es un buen gen normalizador ya que su expresión varía mucho con el tratamiento con el aceite de *C. ladanifer*. GSK-3 no se expresa lo suficiente para determinar el efecto de *C. ladanifer* sobre su expresión. La eficiencia de la amplificación de EndoG no fue suficientemente buena para extraer conclusiones.**

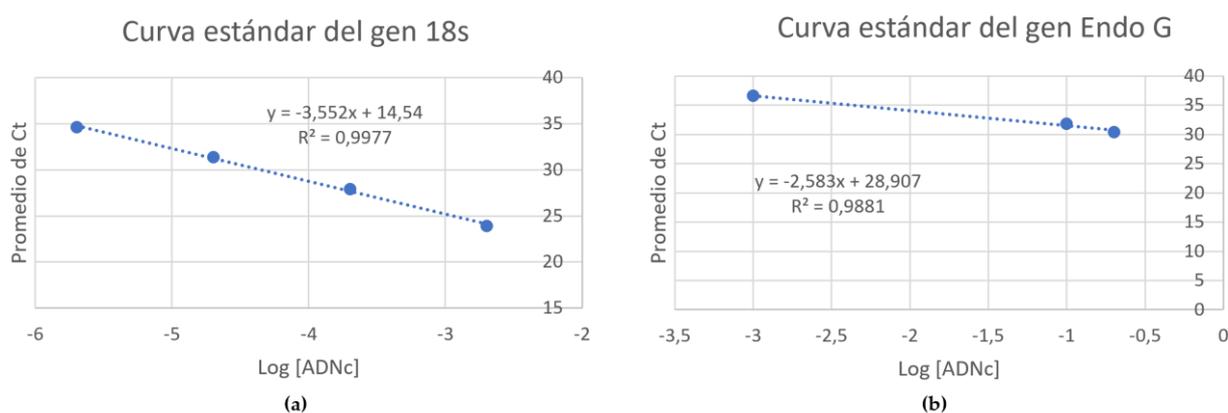
Una vez obtenido el ADNc se procedió con las RT-PCR de los genes indicados en el apartado de Materiales y Métodos. En primer lugar, se verificó que los *primers* empleados en este trabajo no amplificaran fragmentos de manera inespecífica. Para ello, analizamos las curvas de disociación de los productos de PCR proporcionados por el software Bio-Rad CFX Manager 2.2. Tal y como puede observarse en la **figura 4**, solo se identifica un único pico para los tres genes analizados (**Fig. 4. a, b y c**), indicando que los *primers* solo amplifican nuestro gen de interés. En el caso de GSK-3, el pico está menos definido ya que los niveles de expresión de este gen son muy bajos, como se explicará más adelante.



292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305

**Figura 4:** (a) Curva de melting para el gen 18S ARNr; (b) Curva de melting para el gen EndoG ; (c) Curva de melting para el gen GSK-3

Además de la especificidad de los *primers*, se analizó de igual manera la eficiencia con la que amplificaron nuestros genes de interés. Para ello, se emplearon las rectas patrón (**Fig. 5**) construidas tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Debido a la baja expresión de GSK-3, no se pudo construir una recta para este gen ya que en muchos pocillos de la placa de 96 no hubo ninguna amplificación. La eficiencia de los *primers* para 18S ARNr fue buena, con una pendiente (-3,5) muy cercana a la ideal de -3,3. Para EndoG, en cambio, la pendiente, de -2,5, está bastante lejos del óptimo. El valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) es un poco peor que para 18S.



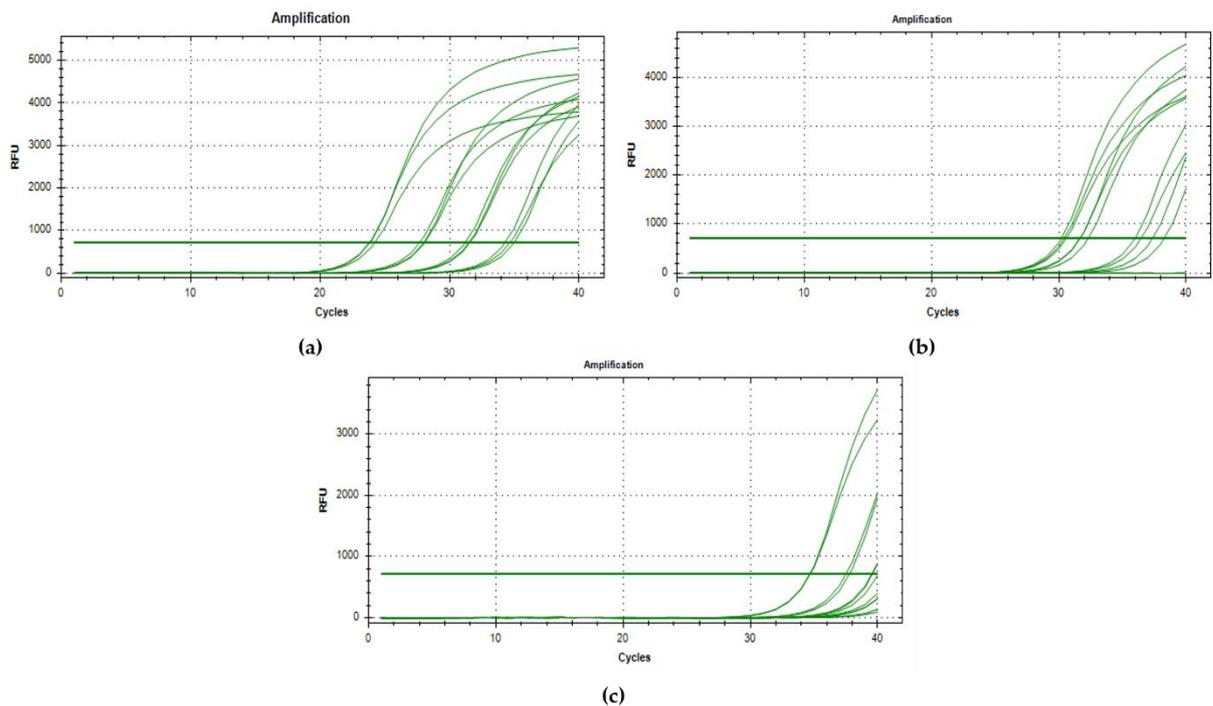
**Figura 5:** (a) Curva estándar del gen 18S ARNr representada mediante una regresión lineal; (b) Curva estándar del gen EndoG representada mediante una regresión lineal

A partir de la **figura 5** se obtiene la ecuación de la recta. A través de la cual se determinó el valor de la pendiente ( $m$ ) y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), los cuales permiten el cálculo de la eficiencia de amplificación para el gen 18s ARNr y EndoG como se representa en la **tabla 2**.

**Tabla 3:** Datos del valor de la pendiente, coeficiente de correlación y porcentaje de eficiencia.

Gen	Pendiente	$R^2$	% Eficiencia
18S ARNr	-3,552	0,9977	91,22%
EndoG	-2,583	0,9881	143,8%

Por último, en la **figura 6** se muestran las curvas de amplificación que nos permiten observar el rango de ciclos de amplificación necesario para alcanzar el umbral establecido por el equipo de RT-PCR. Como puede observarse, 18s ARNr se encuentra en un rango apropiado de ciclos, entre 25 y 35. Por otro lado EndoG, y sobre todo GSK-3, requirieron de más ciclos de amplificación. En el caso de GSK-3, ocurrió que en varios pocillos de la placa de 96 no hubo amplificación.



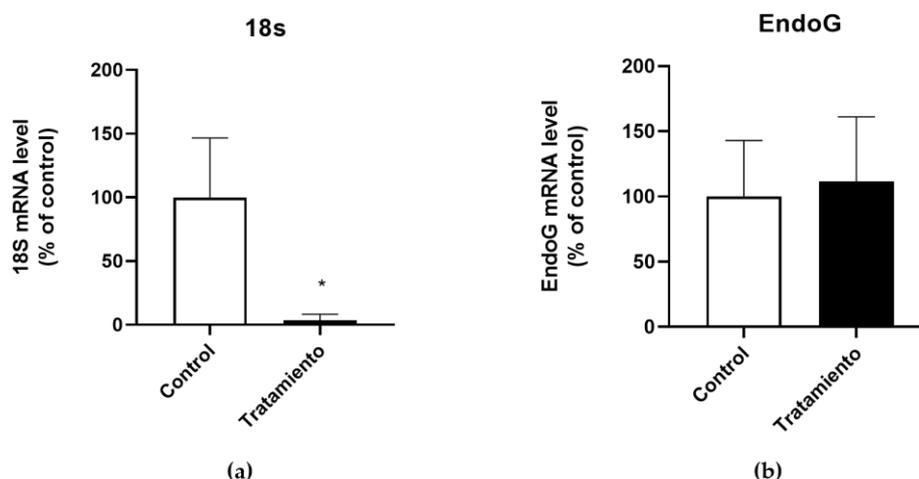
**Figura 6:** (a) Curva de amplificación para el gen 18S ARNr; (b) Curva de amplificación para el gen EndoG ; (c) Curva de amplificación para el gen GSK-3

Efecto del tratamiento con aceite de *C. ladanifer* sobre la expresión de 18s ARNr y EndoG. El gen 18S ARNr no es un buen normalizador de la expresión de otros genes ya que el tratamiento con el aceite esencial de *C. ladanifer* provocó un descenso de la expresión de este gen de hasta el 90%, que resultó estadísticamente significativa.

Finalmente, la **figura 7** nos indica el efecto que tuvo el tratamiento con aceite de *C. ladanifer* sobre la expresión de 18S ARNr y EndoG (para GSK-3 no se pudo determinar). Como puede observarse (**Fig. 7a**), la expresión de 18S ARNr disminuye enormemente, más del 90%, y lo hace de manera estadísticamente significativa. De este resultado se deduce, aunque haya que hacer comprobaciones adicionales, que este no es un buen gen *housekeeping* útil para la normalización de la expresión del resto de genes.

En cuanto al expresión de EndoG, los resultados son preliminares y tienen ciertas limitaciones. Como ya se comentó, la eficiencia de la amplificación para este gen estuvo lejos del óptimo, con un coeficiente de correlación  $R^2$  inferior a 0,99. Además, y debido a los resultados obtenidos para 18S ARNr, su expresión no está normalizada. Por otro lado, ciertas limitaciones relacionadas con la disponibilidad de reactivos obligaron a reducir la  $n$  ( $n = 3$ ), para este experimento de análisis del efecto del aceite esencial de *C. ladanifer* sobre la expresión genética de promastigotes de *L. mexicana*. A pesar de eso, la **figura 7b** nos indica que no hubo cambios en la expresión de este gen.

327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351



**Figura 7:** Gráfico de barras ilustrando las variaciones en la expresión genética entre los grupos de control y tratados de los genes (a) 18s ARNr y (b) EndoG. \* $p < 0.05$

#### 4. Discusión

La extracción de ARN es un proceso crítico en la realización de la técnica de RT-PCR, ya que la calidad del material extraído puede tener un impacto significativo en los resultados obtenidos. Las impurezas que se encuentran durante la extracción pueden afectar la cantidad y calidad del ARN recuperado, lo que a su vez puede alterar los resultados de la RT-PCR (Fleige & Pfaffl, 2006). Por lo tanto, para llevar a cabo un análisis de expresión génica, es esencial evaluar inicialmente la calidad e integridad del material genético (Padhi et al., 2018).

En este ensayo se extrajo de manera satisfactoria ARN total de los cultivos de ambas especies de *Leishmania* usando el método de TRIzol en conjunto con el kit de extracción de ARN de Purelink. El proceso realizado con TRIzol requiere una mayor cantidad de tiempo, comparado al tiempo empleado al utilizar el buffer de lisis provisto en el kit de extracción. Sin embargo, este método resultó en concentraciones mayores de ARN total (Tabla 2).

En la misma línea, la presencia de bandas de ARNr bien definidas es un indicador de la integridad y calidad del ARN extraído de una muestra biológica. La presencia de las bandas de ARNr en el gel de agarosa (Fig. 2a y b) indica que el ARN extraído estaba intacto y era de buena calidad para ensayos posteriores. Adicionalmente se infiere que la mancha heterogénea a lo largo de los diferentes carriles representa la migración de ARNm en función de resultados similares descritos por Hammoudeh et al. (2014) y Kelly (1993) para muestras de *Leishmania* spp.

Una vez que se obtiene material genético de buena calidad se evalúa la especificidad de los primers. Las curvas de *melting* son útiles para identificar si una muestra de RT-PCR contiene productos únicos o si hay contaminación dentro del ensayo, como la presencia de productos no específicos o dímeros de primers (Downey, 2014). Al analizar las curvas de *melting* obtenidas para el gen 18s ARNr, Endo G y GSK-3, se observó un pico único en todas las curvas, lo que sugiere la presencia de un producto específico y homogéneo para cada gen. Este resultado indica que no hay contaminación y, sobre todo, que los primers seleccionados solo amplifican nuestro gen de interés.

A partir de los resultados obtenidos en el RT-PCR se realizan las rectas patrón (Fig. 5). Estas permiten determinar la eficiencia de amplificación en un gen específico, además de obtener la ecuación de la recta

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

con la pendiente y el coeficiente de correlación. Esto se utiliza para construir una curva de calibración que permita cuantificar el mRNA del gen representado en la recta de una muestra problema (Svec et al., 2015). Normalmente una eficiencia de reacción adecuada se encuentra en el rango entre 90% - 110%, lo cual corresponde a valores de pendientes entre -3,58 y -3,10 respectivamente. Asimismo, se considera adecuado un valor de  $R^2 > 0,98$ , lo cual indica una fuerte correlación lineal (Bivins et al., 2021; Life Technologies, 2012).

De esta forma, aunque la eficiencia para 18S estuvo dentro de los márgenes aceptados, con un buen  $R^2$ , no sucedió lo mismo para EndoG. Este resultado puede implicar la existencia de contaminantes o saturación de la polimerasa, lo que puede aumentar significativamente ese último valor, de la misma manera se propone revisar y optimizar las condiciones de reacción de RT-PCR (Ruijter et al., 2009). A pesar de esto, cabe recalcar que Bonifaz et al. (2023), empleando el mismo Master Mix, los mismos *primers* y la misma *Leishmania*, obtuvo valores de eficiencia muy similares a los de 18S. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en los niveles de expresión, ya que a mayor expresión más fiabilidad de la RT-PCR.

Finalmente, los datos del gen GSK-3 fueron inconclusos debido a la amplificación tardía en el RT-PCR ( $\geq 39$  ciclos) (Fig. 6c), esta información podría sugerir una baja concentración de ADNc inicial, posible presencia de inhibidores de PCR o degradación del material genómico (Schradler et al., 2012). Para futuros ensayos se propone aumentar la concentración del material genómico inicial y aumentar también la n experimental.

El método más popular para normalizar los datos obtenidos mediante RT-PCR es mediante el uso de un gen de referencia, en este caso 18s ARNr. La correcta normalización basada en un gen de referencia requiere que dichos genes estén expresados de manera estable en todas las muestras que se están comparando, por ello es necesario un análisis estadístico que permita determinar la estabilidad entre muestras control y tratadas (Xue et al., 2022). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales esto no se cumplía. El tratamiento tuvo el efecto de reducir la expresión del gen 18S en más de un 90% respecto de los controles, y esta disminución fue estadísticamente significativa. Este resultado sugiere que la expresión de este gen varía bajo nuestras condiciones experimentales, lo que limita su utilidad como una referencia confiable para la normalización de la expresión génica en este estudio (Schmittgen & Livak, 2008).

La bibliografía indica que la estabilidad del gen 18s ARNr puede verse afectada en pocas ocasiones imprevistas. Kozera & Rapacz (2013) reportan variaciones en la estabilidad del gen 18s ARNr en dos de ocho cepas vegetales, asociando este cambio a las condiciones experimentales del estudio. Por otro lado, un estudio desarrollado por Qi et al. (2022) en parásitos, describe cambios considerables en los niveles de expresión del 18s en función de la temperatura a la cual se realizan los tratamientos.

Finalmente, la elección de genes normalizadores adecuados es crucial para la medición precisa de la expresión génica y se requieren genes que se expresen de manera estable en diferentes etapas de desarrollo y en diferentes condiciones de cultivo (Hernandez-Santana et al., 2016). Algunos de los genes candidatos comúnmente utilizados como normalizadores para la expresión génica en *Leishmania* spp incluyen: GAPDH, B-actina y rRNA45 (Hernandez-Santana et al., 2016; Ouakad et al., 2007; Singh et al., 2012).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la expresión de estos genes también puede verse afectada por ciertas condiciones experimentales, por lo que se plantea validar la estabilidad de la expresión de los genes candidatos antes de su uso como normalizadores en análisis de expresión génica.

## 5. Conclusiones y perspectivas futuras

En conclusión, se logró extraer ARN total de los cultivos de ambas especies de *Leishmania* de manera satisfactoria mediante el uso combinado del método de TRIzol y el kit de extracción de ARN de Purelink, con un paso adicional de purificación con DNase Set. Aunque el proceso con TRIzol tomó más tiempo que el método del buffer de lisis suministrado en el kit, el primero arrojó concentraciones más altas de ARN total. Estos resultados sugieren que el método de TRIzol podría ser la opción más adecuada para la extracción de ARN total en estudios futuros de estas especies de parásitos.

El gen 18s ARNr no se puede considerar un buen gen de referencia para este ensayo ya que en nuestras condiciones experimentales con el aceite esencial de *C. Ladanifer*, el tratamiento redujo la expresión del gen 18s ARNr de manera considerable, lo que limita su utilidad como referencia confiable para la normalización de la expresión génica en este estudio. Por otro lado, los resultados respecto a los genes de EndoG y GSK-3 representan datos preliminares en el ensayo ya que no permiten la obtención de datos concluyentes.

Para futuras investigaciones se recomienda evaluar la estabilidad de diferentes genes de referencia como GAPDH, B-actina o ARNr 45 bajo las condiciones específicas del ensayo y determinar el mejor gen normalizador. Adicionalmente se sugiere aumentar la n experimental y obtener mayor volumen de ARN de las muestras para realizar los ensayos de RT-PCR sin diluir el material genómico.

**Agradecimientos:** A mi madre, por apoyarme en todo momento. A mis amigos y a mis profesores por ayudarme a culminar este proyecto.

## Referencias citadas

- Andrade, M. A., Azevedo, C. dos S., Motta, F. N., Santos, M. L. dos, Silva, C. L., Santana, J. M. de, & Bastos, I. M. D. (2016). Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 444. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>
- Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Armijos, C., Ramírez, J., Salinas, M., Vidari, G., & Suárez, A. I. (2021). Pharmacology and phytochemistry of ecuadorian medicinal plants: An update and perspectives. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph14111145>
- Azami, M., Ranjresh Adermanabadi, V., Khanahmad, H., Mohaghegh, M. A., Zaherinejad, E., Aghaei, M., Jalali, A., & Hejazi, S. H. (2018). Immunology and genetic of leishmania infantum: The role of endonuclease G in the apoptosis. In *Journal of Research in Medical Sciences* (Vol. 23, Issue 4). Isfahan University of Medical Sciences(IUMS). [https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS\\_705\\_17](https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_705_17)
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bivins, A., Kaya, D., Bibby, K., Simpson, S. L., Bustin, S. A., Shanks, O. C., & Ahmed, W. (2021). Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance. *Water Research*, 203, 117516. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117516>
- Delgado, D., & Arisqueta, L. (2022). Evaluación del efecto leishmanicida de aceites esenciales de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia naequalifolia* y *Tagetes minuta* en *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana* por medio de análisis in vitro e in silico. Universidad Internacional SEK.
- Division of Parasitic Diseases and Malaria. (2020, February 18). *Leishmaniasis*. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

- Downey, N. (2014, January 20). *Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis*. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>
- Efstathiou, A., & Smirlis, D. (2021). Leishmania protein kinases: Important regulators of the parasite life cycle and molecular targets for treating leishmaniasis. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040691>
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2), 126–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Hammoudeh, N., Kweider, M., Abbady, A.-Q., & Chadisoukkarieh, \*. (2014). Sequencing and Gene Expression Analysis of *Leishmania tropica* LACK Gene. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(4), 574–583. <http://ijpa.tums.ac.ir>
- Hernandez-Santana, Y. E., Ontoria, E., Gonzalez-García, A. C., Quispe-Ricalde, M. A., Larraga, V., Valladares, B., & Carmelo, E. (2016). The challenge of stability in high-throughput gene expression analysis: Comprehensive selection and evaluation of reference genes for BALB/c mice spleen samples in the *Leishmania infantum* infection model. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163219>
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, 354(9185), 1191–1199. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)
- Kelly, J. M. (1993). Isolation of DNA and RNA from *Leishmania*. In J. E. Hyde (Ed.), *Protocols in Molecular Parasitology* (pp. 123–131). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-239-6:123>
- Köse, M. D., Tekin, B. N., Bayraktar, O., Duman, E. T., & Başpınar, Y. (2017). Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Cistus Ladanifer*. *International Journal of Secondary Metabolite*, 434–444. <https://doi.org/10.21448/ijsm.376834>
- Koutsoni, O., Karampetsou, K., & Dotsika, E. (2019). In vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC50, CC50 and SI Values. *BIO-PROTOCOL*, 9(21). <https://doi.org/10.21769/BioProtocol.3410>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. In *Journal of Applied Genetics* (Vol. 54, Issue 4, pp. 391–406). <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Life Technologies. (2012). *Real-time PCR handbook*.
- Lin, J., Song, T., Li, C., & Mao, W. (2020). GSK-3 $\beta$  in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(5), 118659. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118659>
- Martínez de Iturrate, P., Sebastián-Pérez, V., Nácher-Vázquez, M., Tremper, C. S., Smirlis, D., Martín, J., Martínez, A., Campillo, N. E., Rivas, L., & Gil, C. (2020). Towards discovery of new leishmanicidal scaffolds able to inhibit *Leishmania* GSK-3. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 199–210. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1693704>
- Ministerio de Salud Pública. (2022). *SUBSISTEMA DE VIGILANCIA SIVE-ALERTA ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES ECUADOR, SE 1-32 / 2019*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Organización Panamericana de la Salud. (2021). *Situación epidemiológica Leishmaniasis cutánea y mucosa*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55344>
- Ouakad, M., Bahi-Jaber, N., Chenik, M., Dellagi, K., & Louzir, H. (2007). Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania* major developmental stages. *Parasitology Research*, 101(2), 473–477. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0491-1>
- Padhi, B. K., Singh, M., Rosales, M., Pelletier, G., & Cakmak, S. (2018). A PCR-based quantitative assay for the evaluation of mRNA integrity in rat samples. *Biomolecular Detection and Quantification*, 15, 18–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bdq.2018.02.001>

- Pinto-Martinez, A. K., Rodriguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernandez-Rodriguez, V., & Benaim, G. (2018). Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-17>
- Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Treatment options for leishmaniasis. In *Clinical and Experimental Dermatology* (Vol. 47, Issue 3, pp. 516–521). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>
- Qi, Y., Zhang, Y., Mu, Q., Zheng, G., Zhang, M., Chen, B., Huang, J., Ma, C., & Wang, X. (2022). RNA Secondary Structure Revealed Distinct Thermoregulation in *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.766532>
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2008.73>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, C., Biswas, S., Singh, V. K., & Mukhopadhyay, C. K. (2012). Intracellular pathogen *Leishmania donovani* activates hypoxia inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038489>
- Steinbach, W., Cohen-Wolkowicz, M., & Benjamin, D. (2020). Principles of Antifungal Therapy - ClinicalKey. In *Nelson Textbook of Pediatrics* (Vol. 21, pp. 1635–1640). <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323529501002601>
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. In *Open Biology* (Vol. 7, Issue 9). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Thakur, C. P., Sinha, G. P., Pandey, A. K., Kumar, N., Kumar, P., Hassan, S. M., Narain, S., & Roy, R. K. (1998). Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 92(5), 561–569. <https://doi.org/10.1080/00034983.1998.11813313>
- Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. In *Journal of Parasitic Diseases* (Vol. 44, Issue 2, pp. 253–272). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
- Toalombo Espin, C. J., & Coque Procel, M. (2021). Leishmaniasis en el Ecuador: revisión bibliográfica. *Mediciencias UTA*, 5(3), 12. <https://doi.org/10.31243/mdc.uta.v5i3.1190.2021>
- Vargas, D. A., Prieto, M. D., Martínez-Valencia, A. J., Cossio, A., Burgess, K. E. V., Burchmore, R. J. S., & Adelaida Gómez, M. (2019). Pharmacometabolomics of meglumine antimoniate in patients with cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Pharmacology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00657>

---

Xue, W., Wang, L., Li, X., Tang, M., Li, J., Ding, B., Kawabata, S., Li, Y., & Zhang, Y. (2022). Evaluation of Reference Genes for Quantitative PCR in *Eustoma grandiflorum* under Different Experimental Conditions. *Horticulturae*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020164>

564

565

566

567