

Evaluación del patrón de comportamiento de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*
resistentes a dos fármacos en modelos experimentales de leishmaniasis cutánea

Mary Elizabeth Salazar Villamizar

Trabajo de Grado para Optar el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Patricia Escobar Rivero

Bacterióloga, M. Sc., Ph. D. en nanobiotecnología.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2019

Agradecimientos

A Dios, por concederme vida, salud y sobre todo la alegría necesaria para culminar este proyecto.

A mis papás, que con su inmenso amor me han animado siempre a cumplir mis metas y que me enseñaron que no hay límites para el que hace todo con cariño.

A mi hermanito, por acompañarme en las noches de estudio, ayudarme con las matemáticas, por llenar mi vida de música y por su gran cariño.

A Julian Vega, que llegó a mi vida en medio de esta etapa académica; que me ha escuchado y apoyado en los momentos difíciles y que por supuesto ha compartido mis alegrías, que sean muchos los sueños que se cumplan juntos.

A mi familia, todos los esfuerzos traen recompensa, pero la mía siempre ha sido tenerlos conmigo, gracias por acompañarme y ayudarme no solo durante mi maestría, sino en todo momento.

A mis queridos amigos, aunque cada vez son mas escasas las oportunidades de reunirnos, el saber que cuento con ustedes es siempre fortaleza y felicidad, gracias siempre.

A la doctora Patricia Escobar, gracias por la paciencia, por el apoyo, por los trasnochos y el esfuerzo y por siempre querer sacar lo mejor de mi (y de todos sus estudiantes), he aprendido mucho de usted.

A los compañeritos del CINTROP, porque cada día que hemos compartido ha estado lleno de risas, siempre que los necesité estuvieron ahí, gracias porque esta tesis tiene un pedacito de cada uno de ustedes.

A Laura García, que me presionó psicológicamente para escribir esta sección de agradecimientos.

A Olguita, Angélica, Thomas, JuanSe y Oscar, es imposible imaginar un mejor grupo de compañeros en la maestría, que suerte haber compartido tanto.

A la UIS, que me ha hecho lo que soy y que me ha dado los mejores años de mi vida, que sean muchas mas las personas que tengan la fortuna de pasar por sus aulas.

A la gobernación de Santander, que, cumpliendo su labor, fue el apoyó económico que permitió la realización y culminación de mi maestría.

“Pero ¡hey!, las risas no faltaron”

Michael “Mike” Wazowski

Tabla de Contenido

Introducción.....	14
1. Objetivos	18
1.1 Objetivo General	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2. Cuerpo del Trabajo.....	19
2.1 Marco teórico/Estado del arte	19
2.1.1 Leishmaniasis y tratamiento	19
2.1.2 Resistencia a fármacos: Generalidades.....	23
2.1.3 Resistencia a fármacos: En parásitos.....	24
2.1.4 Resistencia a fármacos: En <i>Leishmania</i>	26
2.1.5 Resistencia a PMD y KTZ: Generalidades	30
2.1.6 Resistencia a PMD y KTZ: En parásitos	32
2.1.7 Resistencia a PMD y KTZ: En <i>Leishmania</i>	33
2.2 Materiales y métodos.....	34
2.2.1 Fármacos	36
2.2.2. Células	36
2.2.3.Parásitos	36
2.2.4. Animales de experimentación	37

2.2.5. Generación de promastigotes de <i>L. (V) braziliensis</i> resistentes (Fase 1)	38
2.2.6. Caracterización <i>in vitro</i> de parásitos resistentes (Fase 2).....	40
2.2.7. Caracterización de los parásitos resistentes <i>in vivo</i> (Fase 3)	46
2.2.8 Análisis estadístico	53
2.3 Resultados.....	54
2.3.1. Generación de promastigotes de <i>L. (V) braziliensis</i> resistentes (Fase 1)	54
2.3.2. Caracterización <i>in vitro</i> de parásitos resistentes (Fase 2).....	56
2.3.3. Caracterización de los parásitos resistentes <i>in vivo</i> (Fase 3)	76
2.4 Discusión	95
3. Conclusiones	113
Referencias Bibliográficas.....	115

Lista de Tablas

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los fármacos utilizados en el proyecto	377
Tabla 2. Concentraciones y tiempos empleados en la generación de resistencia a fármacos en promastigotes de <i>Leishmania</i>	¡Error! Marcador no definido.39
Tabla 3. Distribución de ratones BALB/c de acuerdo con la línea de promastigotes con que se realizó su infección.	47
Tabla 4. Distribución por cepas, de ratones tratados con ME de KTZ y PMD	52
Tabla 5. Obtención de líneas resistentes a KTZ y PMD, solos y en combinación	55
Tabla 6. Tiempos de duplicación de promastigotes y amastigotes axénicos	58
Tabla 7. Porcentaje de transformación diario de promastigotes a amastigotes axénicos.....	61
Tabla 8. Perfiles de susceptibilidad a KTZ, PMD, MTF y PM de promastigotes WT y resistentes	66
Tabla 9. Susceptibilidad a KTZ y PMD de amastigotes axénicos e intracelulares	67
Tabla 10. Isobologramas y concentraciones inhibitorias fraccionadas de la interacción KTZ:PMD (Experimento 1)	70
Tabla 11. Isobologramas y concentraciones inhibitorias fraccionadas de la interacción KTZ:PMD (Experimento 2)	71
Tabla 12. Isobologramas y concentraciones inhibitorias fraccionadas de la interacción KTZ:PMD (Experimento 3)	72
Tabla 13. Perfiles de susceptibilidad a KTZ y PMD de promastigotes WT y resistentes mantenidos con y sin presión de medicamento por 1, 2, 3 y 5 meses.	75
Tabla 14. Porcentaje de infección de ratones BALB/c con parásitos WT, R-K, R-P y R-K/P.	78

Tabla 15. Susceptibilidad a KTZ y PMD de promastigotes aislados de ratones infectados pos-infección y pos-tratamiento	88
---	----

Lista de Figuras

Figura 1. Estadios morfológicos principales del ciclo de vida de <i>Leishmania</i> :	19
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	21
Figura 3. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.	25
Figura 4. Mecanismos moleculares de resistencia de <i>Leishmania</i> sp a los antimoniales pentavalentes.....	28
Figura 5. Modelo de transporte de Melarsoprol y PMD en <i>T. brucei</i>	33
Figura 6. Diseño metodológico del estudio.	35
Figura 7. Curvas de crecimiento de promastigotes resistentes.....	57
Figura 8. Porcentaje de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos	62
Figura 9. Parásitos WT, R-K , R-P y R-K/P en tres tiempos diferentes del proceso de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos	60
Figura 10. Amastigotes intracelulares WT, R-K, R-P y R-K/P en tres momentos diferentes del proceso de infección de células THP	64
Figura 11. Rangos y porcentajes de infección de células THP-1	65
Figura 12. Concentración inhibitoria 50 de KTZ y PMD en promastigotes mantenidos con y sin presión de medicamento por 1, 2, 3 y 5 meses.	74
Figura 13. Evolución de la infección con parásitos de las líneas WT, R-K, R-P y R-K/P en ratones BALB/c.	77
Figura 14. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos WT de <i>L. (V) braziliensis</i>	79

Figura 15. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos resistentes a KTZ de <i>L. (V) braziliensis</i>	80
Figura 16. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos resistentes a 20 μ M de PMD de <i>L. (V) braziliensis</i>	81
Figura 17. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos de <i>L. (V) braziliensis</i> resistentes a 10/1 μ M de KTZ/PMD.....	82
Figura 18. Evolución (promedio) de la infección con parásitos de las líneas WT, R-K, R-P y R-K/P en ratones BALB/c.....	83
Figura 19. Características histopatológicas de piel con LC en ratones BALB/c infectados con parásitos de las líneas WT, R-K, R-P y R-K/P en biopsias.....	84
Figura 20. Características histopatológicas de órganos de ratones BALB/c infectados con parásitos de las líneas WT y resistentes en biopsias.....	86
Figura 21. Efectividad del tratamiento con una microemulsión (ME) de KTZ y PMD en lesiones de LC de ratones BALB/C infectados con parásitos WT y resistentes de <i>L. (V) braziliensis</i>	89
Figura 22. Efectividad del tratamiento con una microemulsión (ME) de KTZ y PMD en lesiones de LC de ratones BALB/C infectados con parásitos WT y resistentes de <i>L. (V) braziliensis</i> . (Fotografías)	91
Figura 23. Características histopatológicas de lesiones de LC en ratones BALB/c tratados con una microemulsión (ME) de KTZ y PMD en biopsias teñidas.	93

Resumen

Título: Evaluación del patrón de comportamiento de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistentes a dos fármacos en modelos experimentales de leishmaniasis cutánea*

Autor: Mary Elizabeth Salazar Villamizar **

Palabras clave: *Leishmania (V) braziliensis*, Farmacorresistencia, Pentamidina, Ketoconazol, Tratamientos combinados

Descripción:

Introducción: Los tratamientos combinados constituyen una alternativa en el tratamiento de la leishmaniasis, debido a que la monoterapia puede llegar a inducir la generación de resistencia farmacológica. En un trabajo previo encontramos sinergismo entre KTZ/PMD por lo que se propuso usar esta combinación como tratamiento anti-*Leishmania*. La farmacorresistencia es un problema potencial en *Leishmania*, que impacta negativamente en la eficacia del tratamiento. El objetivo de este estudio fue generar líneas de *L. (V.) braziliensis* resistentes a ketoconazol (KTZ) e isetionato de pentamidina (PMD) solos y combinados y caracterizar sus patrones de comportamiento. Metodología: Las cepas resistentes (R-K, R-P, R-K/P) fueron generadas por presión selectiva. Se determinó la cinética de crecimiento, la capacidad de transformación de promastigotes a amastigotes, infectividad en células y animales, susceptibilidad a los fármacos en promastigotes y amastigotes, interacción farmacológica KTZ/PMD y estabilidad de la resistencia. Los resultados fueron comparados con los de una cepa silvestre (WT). Resultados: Todas las líneas mostraron un crecimiento similar, fueron capaces de transformarse en amastigotes y mostraron infectividad de más del 55% y 70% en células y ratones. La actividad de PMD y KTZ en los parásitos resistentes fue hasta quince veces menor que en la WT. La estabilidad de la resistencia se comprometió al retirar la presión del medicamento de los cultivos y al infectar ratones BALB/c. Los promedios de los FIC fueron mayores que 0,5, sin embargo, las CIF de la cepa WT siempre fueron sinérgicos en un radio 1:4 KTZ: PMD. Es posible concluir que la combinación KTZ/PMD podría retrasar la aparición de resistencia, que la generación de resistencia no altera las características biológicas y que la resistencia farmacológica fue transitoria. Se recomienda tener en cuenta estos resultados en la administración de terapias combinadas en leishmaniasis.

*Tesis de grado

**Facultad de salud. Escuela de Medicina. Directora: Patricia Escobar Rivero, Bacterióloga, M. Sc., Ph. D.

Abstract

Title: Evaluation of the behavior pattern of two drug resistant *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains in experimental models of cutaneous leishmaniasis *

Author: Mary Elízabeth Salazar Villamizar **

Keywords: *Leishmania (V) braziliensis*, Drug resistance, Pentamidine, Ketoconazole, Combined treatments

Description:

Introduction: Combined treatments are an alternative for leishmaniasis, because monotherapy can induce the generation of drug resistance. In a previous work we found synergism between KTZ / PMD so it was proposed to use this combination as an anti-*Leishmania* treatment. Drug resistance is a potential problem in *Leishmania*, which negatively impacts the effectiveness of the treatment. The aim of this study was to generate lines of *L. (V.) braziliensis* resistant to ketoconazole (KTZ) and pentamidine isethionate (PMD) alone and in combination and to characterize their behavior patterns. Methodology: Resistant strains (R-K, R-P, R-K / P) were generated by selective pressure. Growth kinetics, the ability of transformation from promastigotes to amastigotes, infectivity in cells and animals, susceptibility to drugs in promastigotes and amastigotes, pharmacological interaction between KTZ/PMD and resistance stability were determined. The results were compared with those of a wild strain (WT). Results: All lines showed similar growth, were able to transform into amastigotes and showed infectivity of more than 55% and 70% in cells and mice. The activity of PMD and KTZ in resistant parasites was up to fifteen times less than in WT. Stability of the resistance was compromised by removing the drug pressure from the cultures and infecting BALB / c mice. FIC averages were greater than 0.5, however, the FICs of the WT strain were always synergistic within a 1: 4 KTZ: PMD radius. It is possible to conclude that the KTZ / PMD combination could delay the onset of resistance, that the generation of resistance does not alter the biological characteristics and that the pharmacological resistance was transient. It is recommended to take these results into account in the administration of combined therapies in leishmaniasis

*Tesis de grado

**Facultad de salud. Escuela de Medicina. Directora: Patricia Escobar Rivero, Bacterióloga, M. Sc., Ph. D.

Introducción

La resistencia farmacológica constituye un problema de salud pública global que viene afectando la práctica médica desde hace más de dos décadas y que consiste en la reducción en la eficacia de uno o varios compuestos para eliminar un microorganismo o una célula maligna (Hefnawy, Berg, Dujardin, y De Muylder, 2017; Rivera-Tapia, 2003). La resistencia a fármacos en la leishmaniasis es preocupante dado que esta es una enfermedad desatendida debido a que afecta poblaciones en situación de pobreza, carece de un tratamiento ideal debido a la toxicidad y efectividad variable de los fármacos típicos con que se trata, es difícil de prevenir en zonas endémicas ya que se transmite a través de un vector difícil de controlar y no cuenta, a la fecha, con una vacuna que sea efectiva y segura (Organización Mundial de la Salud, 2017). Las opciones terapéuticas para el tratamiento de pacientes con leishmaniasis son pocas y se basan en el uso de antimoniales pentavalentes [Sb^V] y algunos otros fármacos llamados de segunda línea (anfotericina B [AmB], anfotericina B liposomal [L-AmB], sulfato de paromomicina [PM], isetionato de pentamidina [PMD], miltefosina [MTF] y algunos azoles). Los tratamientos mencionados tienden a ser costosos y con graves efectos adversos tales como mialgias, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad y alteración de la glicemia sanguínea que dificultan la adherencia de los pacientes a los esquemas de tratamiento. Adicionalmente, la eficacia es variable, lo que podría deberse a factores tales como la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos, el estado inmune del paciente y las diferencias en la respuesta de las especies de *Leishmania* a los fármacos (Arevalo et al., 2007; Ponte-Sucre et al., 2017).

Las estrategias y marcadores para la detección de la resistencia farmacológica son escasas y aunque si bien el desarrollo de nuevos compuestos anti-*Leishmania* ha avanzado en los últimos 5

años, aun no se cuenta con nuevos fármacos disponibles y asequibles para los pacientes que padecen la enfermedad. Los tratamientos combinados y la reformulación de los fármacos actuales surgen como una estrategia para ser usada a corto tiempo. El conocimiento y la comprensión de los mecanismos de acción de los fármacos y las características (en especial la virulencia) de los parásitos resistentes deben verse como una herramienta para prevenir su aparición (Mohapatra, 2014).

Los estudios de resistencia en *Leishmania* se han realizado generalmente en condiciones de laboratorio en donde los parásitos son sometidos a presiones crecientes y continuas del fármaco de estudio. Se han obtenido cepas de *Leishmania* resistentes a la mayoría de los fármacos existentes contra el parásito y aunque se ha demostrado que es más difícil para *Leishmania* adquirir resistencia a la terapia combinada que a la monoterapia, recientemente se han generado algunas cepas de *Leishmania* resistentes a combinaciones como por ejemplo a MTF-PM, AmB-MTF, PM-Sb^V y PM-Sb^V) en promastigotes de *L. donovani* (García-Hernández, Manzano, Castanys, y Gamarro, 2012).

Para el PMD y el KTZ, dos compuestos usados como segunda elección en el tratamiento de la leishmaniasis y que se han propuesto como posible tratamiento combinado (Carreño y Escobar, 2019), ya se han generado cepas resistentes individualmente (Andrade-Neto et al., 2012; Basselin, Denise, Coombs, y Barrett, 2002), pero hacen falta estudios con parásitos resistentes a su combinación, que determinen su susceptibilidad a otros fármacos anti-*Leishmania*, su virulencia *in vitro* e *in vivo* y permitan conocer otras características biológicas que pudieran estar relacionadas con el desenlace de los tratamientos.

Dado que los estudios realizados en esta misma línea son pocos, teniendo en cuenta la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (2010) sobre la utilización de tratamientos combinados en leishmaniasis cutánea (LC) y considerando que entender la fármaco-resistencia es esencial para el control de las enfermedades causadas por parásitos y es la base para el ajuste y creación de los esquemas de tratamiento y la consolidación de estrategias y políticas de vigilancia epidemiológicas frente a su propagación (Hefnawy et al., 2017) el objetivo del presente estudio fue generar y caracterizar biológicamente cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes a KTZ, PMD y KTZ combinado con PMD.

En este documento se presenta inicialmente una revisión bibliográfica que incluye aspectos generales sobre la leishmaniasis, su tratamiento y su situación epidemiológica actual, una mirada rápida sobre la resistencia farmacológica en microorganismos diferentes de *Leishmania* y una recopilación de la información disponible sobre fármaco-resistencia en leishmaniasis. Además, se comentan los mecanismos de acción del KTZ y el PMD y los posibles mecanismos utilizados por los parásitos para adaptarse a concentraciones de estos fármacos que normalmente serían efectivos contra ellos.

Más adelante, se describe el diseño metodológico empleado en el estudio, el cual muestra las tres fases en que se realizó el trabajo. La primera fase se enfocó en la generación de promastigotes resistentes a KTZ y PMD solos y en combinación mediante la metodología de adaptación por etapas, añadiendo a los cultivos de promastigotes concentraciones crecientes de uno o los fármacos correspondientes.

Las fases 1 y 2 estuvieron dirigidas a evaluar características biológicas de las cepas con susceptibilidad disminuida. La fase 2 fue llevada a cabo en modelos *in vitro* de LC y evaluó la

cinética de crecimiento, metaciclogénesis, infectividad en células y susceptibilidad de las cuatro líneas de parásitos, mientras la fase 3 se realizó empleando animales de experimentación con el fin de determinar la capacidad infectiva y la respuesta a un tratamiento intralesional de los parásitos WT, R-K, R-P y R-K/P y la susceptibilidad a KTZ y/o PMD de los parásitos obtenidos luego de la infección y luego del tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran de una manera detallada como el impacto del desarrollo de la resistencia experimental a KTZ, PMD en las características biológicas estudiadas se da principalmente en la susceptibilidad al fármaco al que se generó la resistencia y no sobre el fitness y la virulencia de los parásitos, además, se evidencia que la resistencia es transitoria y aparentemente afecta la presentación de lesiones de LC en ratones BALB/C.

Una de las dificultades en el desarrollo y análisis del presente estudio fue la alta variabilidad obtenida en algunos experimentos, que coincide con la cantidad de datos opuestos reportados por otros autores en estudios previos y que evidencian que estudios inmunológicos, moleculares, proteómicos, metabolómica, de lipidómica y glicómica en las líneas de promastigotes resistentes generadas son necesarios.

Se espera que los resultados encontrados puedan contribuir a la evaluación del impacto de la resistencia farmacológica en la leishmaniasis y sean de utilidad al momento de formular programas de control y tratamiento que busquen el uso de terapias combinadas como alternativa a la monoterapia.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Caracterizar cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes a dos fármacos en modelos experimentales de leishmaniasis cutánea

1.2 Objetivos Específicos

Generar cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes a dos fármacos

Evaluar la infectividad de las cepas resistentes en modelos experimentales

Medir la susceptibilidad a PMD, KTZ, MTF y PM de los parásitos resistentes

Evaluar el efecto de una ME conteniendo dos fármacos en LC producida en ratones BALB/c por cepas resistentes

2. Cuerpo del Trabajo

2.1 Marco teórico/Estado del arte

2.1.1 Leishmaniasis y tratamiento. La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades causadas por protozoarios del género *Leishmania*, introducidos a hospederos vertebrados por la picadura de flebótomos de la familia Psychodidae de los géneros *Lutzomya* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo (Center for Disease Control and Prevention, 2019; Organización Mundial de la Salud, 2017).

El ciclo de vida de *Leishmania* presentan dos estadios morfológicos claramente diferenciados: los promastigotes, de cuerpo y flagelo alargados, encontrados en el intestino y las piezas bucales del vector y los amastigotes intracelulares, redondos y con un flagelo corto, que se hallan en las células del sistema fagocítico mononuclear de los reservorios y hospederos definitivos de la enfermedad (Figura 1) (Sunter y Gull, 2017).

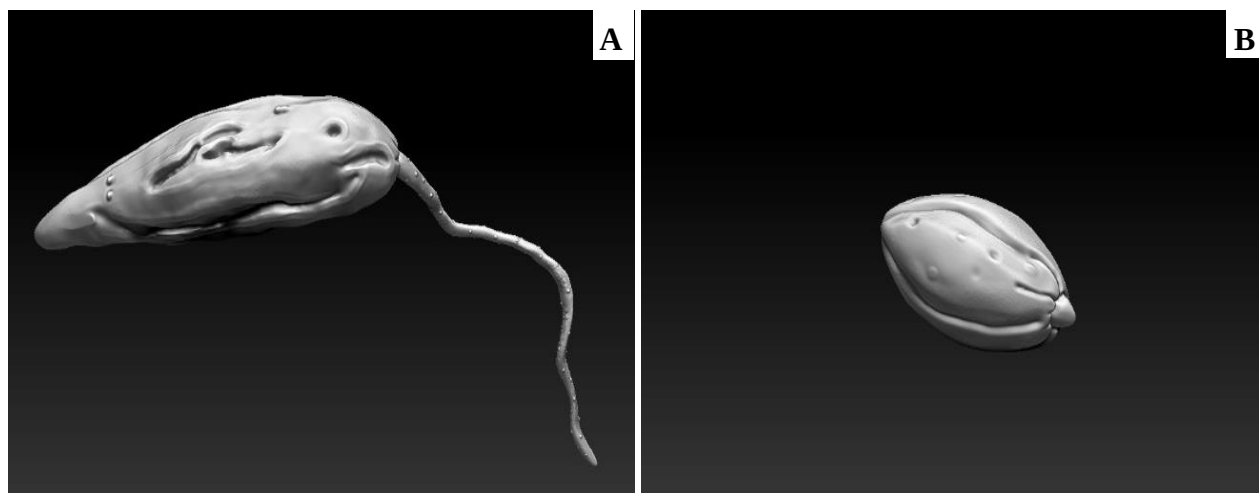


Figura 1. Estadios morfológicos principales del ciclo de vida de *Leishmania*: Promastigote (A) y amastigote (B). Modelados 3D elaborados en ZBrush por Julián Vega con base en micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido.

La infección por *Leishmania* en los humanos se da principalmente por un ciclo zoonótico, en que el flebótomo adquiere amastigotes de un reservorio animal (e.g. perros, zarigüeyas, simios, armadillos), aunque también por uno antroponótico, donde los parásitos que transmite el vector provienen de otro humano previamente infectado (Figura 2) (Chakravarty y Sundar, 2010; Echeverry et al., 2007; Magill, 1995).

La leishmaniasis presenta varias formas clínicas que dependen de la especie de parásito y la respuesta inmune del paciente, siendo la leishmaniasis cutánea (LC) y la leishmaniasis visceral (LV) las más comunes (Center for Disease Control and Prevention, 2019). La forma más frecuente en Colombia es la leishmaniasis cutánea, caracterizada por ocasionar una o más lesiones en piel de tipo nodular que pueden incrementar de tamaño y generar úlceras típicas redondeadas, de color rosado y fondo limpio, rodeada de bordes regulares y elevados (Ramírez et al., 2016).

La prevalencia mundial estimada de todas las formas de la enfermedad es de 12 millones y se sabe que cada año se producen entre 700000 y 1 millones de nuevos casos y entre 20000 y 30000 defunciones por su causa (Drugs for Neglected Diseases initiative, 2018; Organización Mundial de la Salud, 2017). En América se han encontrado 15 especies de *Leishmania* patógenas para los humanos, siendo *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) peruviana*, *L. (L) mexicana*, *L. (L) amazonensis* y *L. (L) venezuelensis* las más comunes (Center for Disease Control and Prevention, 2019). Colombia, en el año 2018 tuvo una incidencia de 108,2 casos de leishmaniasis por cada 100000 habitantes, siendo Santander uno de los departamentos con más casos confirmados. Hasta hoy, luego de las cuarenta y seis semanas epidemiológicas que van de este año, en el SIVIGILA se reporta que la incidencia de LC en el departamento de Santander para el 2019 es de 77,3 casos por 100000 habitantes (Instituto Nacional de Salud, 2019).

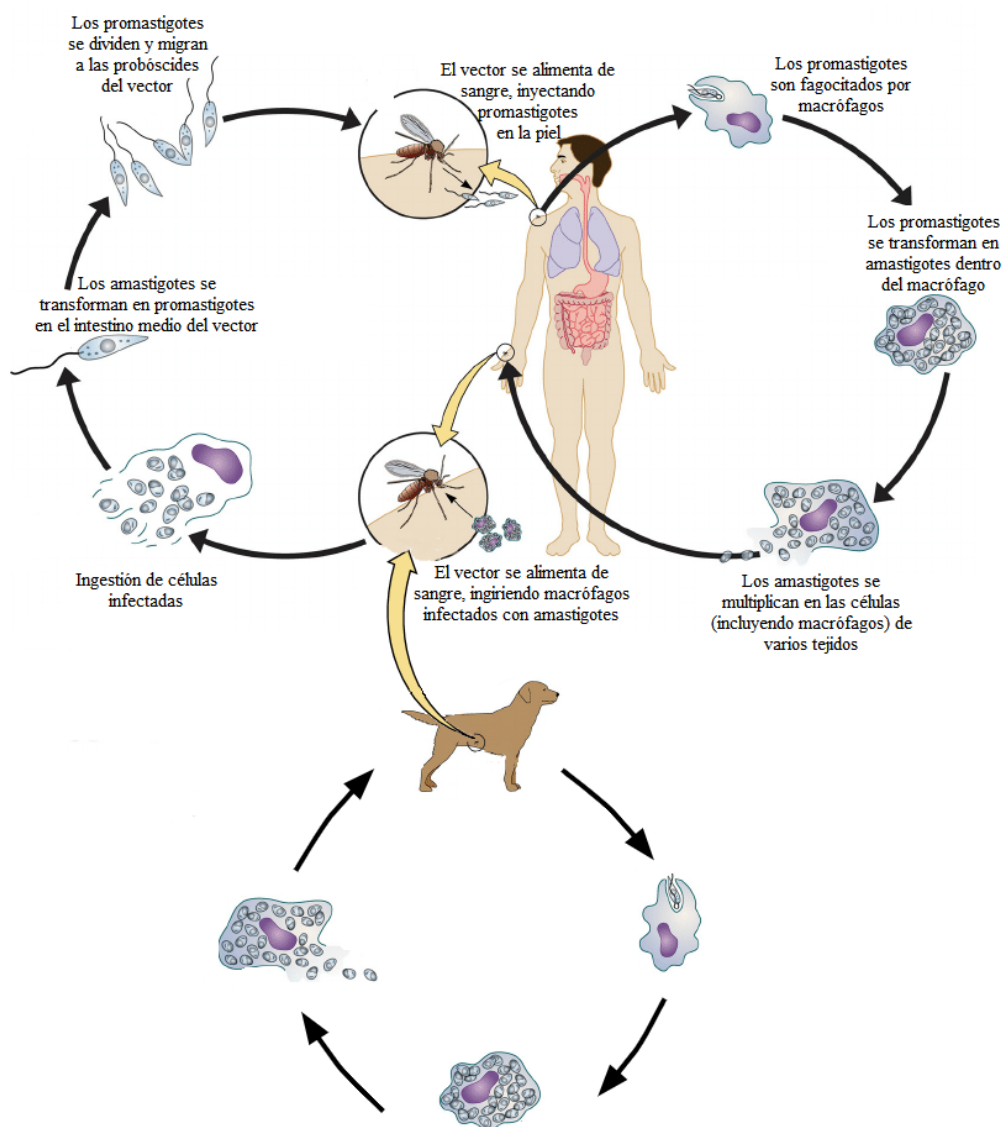


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Adaptado de Esch y Petersen (2013)

La leishmaniasis, por no disponer de tratamientos adecuados y presentarse con frecuencia en poblaciones marginadas, pertenece junto con la tripanosomiasis africana, el chagas, la filariasis, el micetoma, la hepatitis C y el VIH pediátrico, al grupo de "enfermedades olvidadas" (Drugs for Neglected Diseases initiative, 2018)

La Organización Mundial de la Salud (2010) recomienda como medicamentos anti-*Leishmania* los Sb^V, la AmB y su forma lipídica, la PM, el PMD, la MTF y los azoles, y sugiere a los países ajustar los esquemas de tratamiento teniendo en cuenta la relación riesgo-beneficio de cada medicamento, la disponibilidad de estos y la prevención de la fármaco-resistencia. Las terapias locales constituyen una opción atractiva recomendada en algunos casos de LC no complicados (menos de cuatro lesiones recientes con tamaños menores de 5 cm) o donde los tratamientos sistémicos están contraindicados. Se han usado algunos procedimientos tales como crioterapia, infiltración de Sb^V y varias preparaciones de PM tópicas (Ben Salah et al., 2013; Sosa et al., 2013; J. M. Soto et al., 2002); además, la termoterapia ha demostrado una alta efectividad y seguridad, por lo que se ha sugerido como opción de tratamiento en pacientes con contraindicaciones a los Sb^V sistémicos y que vivan en áreas donde la leishmaniasis mucocutánea no es frecuente (Cardona-Arias, Vélez, y López-Carvajal, 2015).

La combinación de los medicamentos anti-*Leishmania* existentes, recomendada por la OMS en el 2010, ha conducido a mejoras en el tratamiento de la leishmaniasis, sin embargo, aún se necesitan tratamientos más efectivos y seguros (Rivas y Gil, 2017). El tratamiento de Pentoxifilina® oral combinada con Sb^V tuvo mayor efectividad que la monoterapia con Sb^V en lesiones por *L. (V.) braziliensis* (Machado et al., 2007) y la combinación de alopurinol con Sb^V durante 15 días en pacientes infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* mostró mayor efectividad que el uso del Sb^V de forma individual (Martínez y Marr, 1992).

En dos estudios clínico independiente realizados por Soto y colaboradores (1998 y 1995), el tratamiento tópico de PM con Sb^V por 7 días mostró curación en el 90% de pacientes (similar al tratamiento individual con Sb^V) en el primer estudio y del 58% (menor que el tratamiento individual con Sb^V) en el segundo (J. Soto, Fuya, Herrera, y Berman, 1998; J. Soto, Hernandez, Mejia, Groggl,

y Berman, 1995). Además, en pacientes con lesiones de LC se vio que el uso tópico de inmunomoduladores como el Imiquimod® junto con dosis de Sb^V aceleraron el tiempo de curación de las lesiones y disminuyendo las consecuencias de la enfermedad (Miranda-Verastegui, Llanos-Cuentas, Arevalo, Ward, y Matlashewski, 2005)

En los últimos años, nuevos compuestos, como los aminotiazoles, tetrazoles derivados del pirazol-4-carbononitrilo y el fexinidazole, han sido evaluados (Mowbray et al., 2015; Rivas y Gil, 2017) y la reformulación, reasignación y reposicionamiento de fármacos son prometedoras (Charlton, Rossi-Bergmann, Denny, y Steel, 2018; de Menezes, Guedes, Petersen, Fraga, y Veras, 2015)

En Colombia, la primera opción farmacológica para la leishmaniasis sigue siendo los Sb^V y en caso de falla terapéutica, alteraciones en la salud del paciente (cardíacas, renales, hepáticas) y otras contraindicaciones se recomienda el uso del PMD, MTF o AmB (Ministerio de la protección social, 2010)

2.1.2 Resistencia a fármacos: Generalidades. Se considera que un microorganismo o célula cancerosa se vuelve resistente cuando al tratarse con uno o más compuestos que antes eran efectivos para matar o inhibir su crecimiento estos ya no lo son (Boslaugh, 2017).

La resistencia a los fármacos se puede dividir en dos grandes categorías: intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca indica que esta existe antes de recibir el tratamiento, lo que hace que la terapia sea ineficaz inicialmente. Por el contrario, la resistencia farmacológica adquirida se desarrolla, durante el tratamiento de células o microorganismos, que eran inicialmente sensibles. La resistencia adquirida puede surgir a través de la selección inducida por la terapia de una subpoblación (Arendrup y Patterson, 2017; Holohan, Van Schaeybroeck, Longley, y Johnston, 2013)

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) en bacterias, virus, hongos o parásitos es un fenómeno natural caracterizado por presentar una disminución en la susceptibilidad a los mismos (OMS, 2014). La RAM en bacterias es considerada un problema de salud pública importante (el tercero) por la OMS y las estrategias orientadas para contener su desarrollo y propagación han sido insuficientes al igual que el desarrollo de nuevos antimicrobianos (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2011). La RAM es un fenómeno multicausal en donde se pueden producir modificaciones del antimicrobiano (generalmente por producción de enzimas), disminución de la absorción del fármaco o aumento del eflujo en la célula bacteriana, cambios en su blanco terapéutico y/o la adaptación de vías bioquímicas completas (Figura 3) (Munita y Arias, 2016). Se sabe que la resistencia se debe a cambios genéticos y/o epigenéticos, algunos de los cuales ya han sido identificado (Lavi, Gottesman, y Levy, 2012). Algunos mecanismos de resistencia en cáncer son compartidos con la RAM (Holohan et al., 2013).

2.1.3 Resistencia a fármacos: En parásitos. La resistencia farmacológica ha sido reportada en diferentes tipos de parásitos, como en helmintos (principalmente en ovejas, cabras y ganado), protozoarios intestinales (e.g. *Giardia intestinalis* y *Blastocystis hominis*) y protozoarios tisulares y sanguíneos como *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Coles, Hunt, y Roos, 1994; El-Taweel, 2015; Sibley y Hunt, 2003).

Se ha demostrado que, en *Giardia*, la generación de resistencia a metronidazol y nitaxonadina se da a nivel multigénico (Müller, Ley, Felger, Hemphill, y Müller, 2008) y que en *Blastocystis*, los parásitos resistentes a metronidazol no toleran eficientemente el estrés nitrosativo y pierden la capacidad de adhesión a los enterocitos humanos, que es crítica para la colonización efectiva del hospedero (Wu, Mirza, y Tan, 2014).

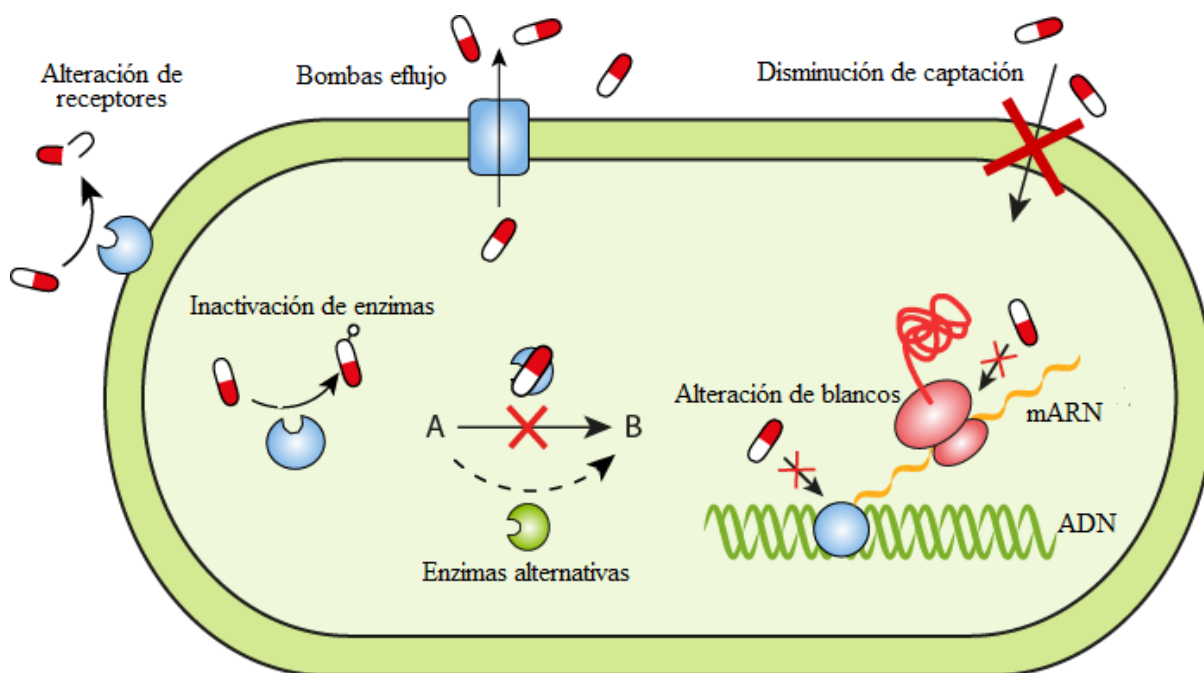


Figura 3. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Adaptado de Gullberg, 2014

En la enfermedad del sueño, causada por *T. brucei* (en humanos) y *T. brucei* o *T. vivax* (en animales), se han reportado fallas del tratamiento con melarsoprol (Burri y Keiser, 2001) y resistencia generalizada al Berenil® (Geerts, Holmes, Diall, y Eisler, 2001) respectivamente. Además, en el Congo, se pueden haber generado poblaciones de *T. brucei* menos sensibles a el PMD (Kayembe y Wery, 1972). Se sabe que, en las tripanosomiasis africanas, los mecanismos de resistencia a las diaminas involucran la reducción de la absorción de drogas por transportadores competitivos, como las acuaporinas AQP2 y AQP3 y el transportador de purina 2 (P2) (Baker et al., 2012).

Se informan con frecuencia fallas en el tratamiento de *T. cruzi* con benznidazol y existe un riesgo demostrado de resistencia cruzada entre este y el nifurtimox (ambos tratamientos de primera línea). El tratamiento con benznidazol por largos periodos puede ocasionar mutaciones en todo el genoma del parásito, generando multidrogoresistencia (Campos et al., 2017)

2.1.4 Resistencia a fármacos: En *Leishmania*. La resistencia en *Leishmania* es una de las causas de la falla terapéutica (FT), ya que puede desencadenar tanto en la falta de respuesta a los anti-leishmánicos como la generación de un segundo episodio después de la cura aparente inicial del paciente (Obonaga et al., 2014; Ponte-Sucre et al., 2017; Vanaerschot et al., 2014).

La resistencia a fármacos en *Leishmania* ya ha sido reportada en aislados clínicos, por ejemplo, en la India, donde el tratamiento de la LV con Sb^V ha sido dejado de lado, por la generación de cepas de *L. donovani* menos susceptibles a estos (Croft y Yardley, 2002; Sundar et al., 2000). En aislamientos clínicos resistentes a Sb^V se han encontrado variaciones genómicas, estructurales y metabólicas, que sugieren un mecanismo multifactorial de resistencia (Berg et al., 2015) concordante con el modo de acción de los Sb^V , que involucra la estimulación de macrófagos e inhibición de la tripanotión reductasa (Ashutosh, Sundar, y Goyal, 2007).

La disminución de la reducción biológica de Sb^V a Sb^{III} y de la internalización del fármaco y, el aumento de los niveles de tripanotión reductasa, son los principales mecanismos que se han implicado en la resistencia a antimoniales (Figura 4) (Ponte-Sucre et al., 2017). Aunque no está claro si los niveles de acumulación de Sb^V se relacionan o no con la sensibilidad en los parásitos con susceptibilidad natural, se ha encontrado que en los parásitos resistentes la acumulación de antimonio es menor (Brochu et al., 2003). Por otro lado, se ha encontrado que la sobreexpresión de la acuaporina 1 (AQP1) hace que los parásitos sean hipersensibles a Sb^{III} , mientras que niveles

reducidos de expresión de la misma se relacionan con la resistencia (Marquis, Gourbal, Rosen, Mukhopadhyay, y Ouellette, 2005).

Se ha demostrado que la expresión aumentada de transportadores de casete de unión a ATP (ABC) involucrados en el transporte activo de una variedad de moléculas a través de membranas influye en el flujo de salida de fármacos y puede estar desempeñar un papel en la resistencia al antimonio en *Leishmania* (Ponte-Sucre et al., 2017); MRPA (por sus siglas en inglés *multidrug resistance protein A*), un transportador de este tipo localizado en vesículas de membrana cerca del bolsillo flagelar confiere resistencia a los antimoniales cuando está sobreexpresado tanto en amastigotes como en promastigotes, al secuestrar conjugados de tiol-metal en vesículas intracelulares (Légaré et al., 2001).

El tripanotión es una forma poco común de glutatión, que contiene dos moléculas de glutatión y una de espermidina y que se encuentra únicamente en tripanosomátidos como *Leishmania*. El tripanotión se une al Sb^{III} para que luego estos conjugados sean secuestrados en un orgánulo intracelular y posteriormente secretados de la célula parasitaria por otras bombas de eflujo o MRPA (El Fadili et al., 2005). La sobreexpresión de las enzimas ornitina descarboxilasa y gamma-glutamylcisteína sintasa, claves en la síntesis del tripanotión se ha asociado con la resistencia junto con la sobreexpresión de MRPA (El Fadili et al., 2005). Finalmente, se ha propuesto que la sobreexpresión de la triparedoxina peroxidasa contribuya a la resistencia a Sb^{III} a través de la elevación de los niveles de tioles intracelulares reducidos (Wyllie, Vickers, y Fairlamb, 2008).

Se ha demostrado además que en la resistencia a antimoniales están implicados cambios en el macrófago ocasionados por variaciones en la fisiología del parásito (Mukherjee et al., 2013). Los glucanos complejos expresados diferencialmente en la superficie de los parásitos resistentes

contribuyen a la regulación positiva de los niveles de interleucina 10 (IL-10) en el huésped lo que provoca una sobreexpresión MDR1 (multidrug resistance protein 1) en los macrófagos, lo que finalmente disminuye los niveles totales de antimonio que llegan a los parásitos (Mukherjee et al., 2013).

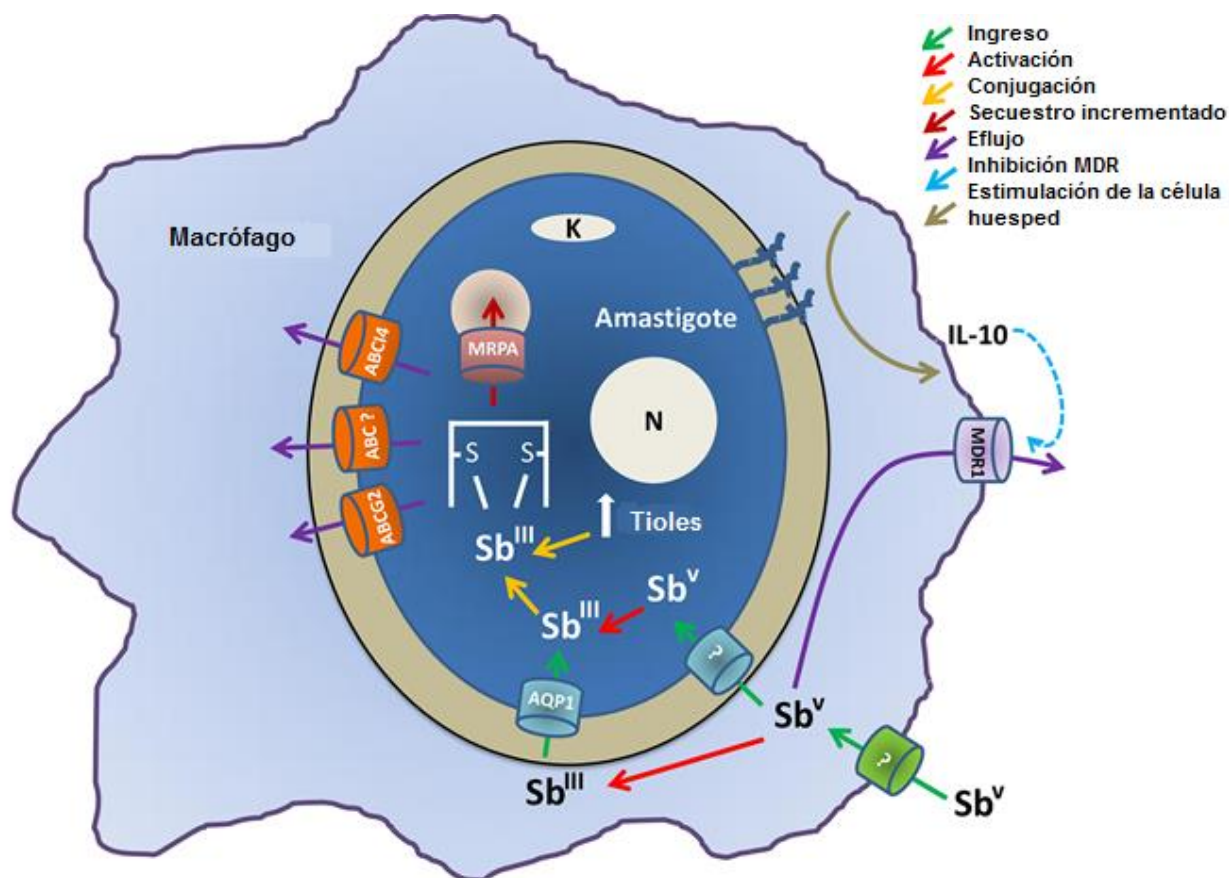


Figura 4. Mecanismos moleculares de resistencia de *Leishmania* sp a los antimoniales pentavalentes. Adaptado de (Ponte-Sucre et al., 2017). La figura muestra un amastigote dentro del fagolisosoma del macrófago hospedero. Explica los métodos de activación y transporte utilizados por los antimoniales para ingresar al parásito y los mecanismos intracelulares utilizados por el parásito para expresar el fenotipo resistente. ABC: casete de unión a ATP; AQP: aquaporina; IL-10: interleucina 10; MDR1, proteína de resistencia a múltiples fármacos 1

La disminución de la susceptibilidad a AmB en *L. infantum* (Di Giorgio et al., 1999) y *L. donovani* (Purkait et al., 2012) y a MTF en *L. donovani* (Srivastava et al., 2017) ha sido reportada. La AmB es un antibiótico con afinidad por el ergosterol, el esteroide predominante en hongos, *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi* (Croft, Sundar, y Fairlamb, 2006) y que en cepas de *Leishmania* resistentes generadas en el laboratorio es sustituido por uno de sus precursores (Mbongo et al., 1998). El mecanismo de acción de la MTF se ha asociado a la alteración de las membranas parasitarias (Rakotomanga et al., 2005 y Santa-Rita et al., 2004) y a la fragmentación del ADN (Moreira et al., 2012), sin embargo, estudios sugieren que la resistencia de *Leishmania* a la MTF está relacionada con mutaciones puntuales en los alelos del transportador responsable de su internalización (Pérez-Victoria et al., 2003).

No se han reportado casos de resistencia generada en pacientes tratados con combinaciones de fármacos, sin embargo la generación de parásitos resistentes a las combinaciones de medicamentos sugeridas por la Organización Mundial de la Salud (AmB+MTF, AmB+PM, AmB+Sb^V, MTF+PM y Sb^V+PM) fue posible en corto tiempo en un estudio de laboratorio llevado a cabo con promastigotes de *L. donovani* (García-Hernández et al., 2012).

Un aspecto interesante que ha cobrado importancia en el estudio de la resistencia en *Leishmania* es la plasticidad de su genoma, pues su enorme potencial de aneuploidía, de variaciones locales en el número de copias de loci específicos y de amplificación circular o lineal extracromosómica de conjuntos de genes en los parásitos implica una mayor variabilidad natural, mosaicismo entre individuos de una misma población clonal y una capacidad incrementada de adaptación (Ponte-Sucre et al., 2017). En estudios experimentales de laboratorio, con parásitos resistentes a antimoniales y metotrexato, se ha encontrado principalmente la amplificación de transportadores y enzimas (Leprohon et al., 2009; Papadopoulou, Roy, y Ouellette, 1993).

2.1.5 Resistencia a PMD y KTZ: Generalidades. El PMD, es una diamidina catiónica con acción frente a bacterias Gram negativas como *Acinetobacter baumannii*, hongos como *Pneumocystis jirovecii* (antiguamente conocido como *P. carinii*) y parásitos como *T. brucei gambiense* y *Leishmania* (Aden Abdi et al., 1995 y Stokes et al., 2017). El PMD, utilizado como inyección intramuscular única de 7 mg/kg es la primera línea de tratamiento contra la leishmaniasis en la Guyana francesa (Bourreau et al., 2016; Delobel y Pradinaud, 2003, Ginouvès et al., 2017). Se han observado efectos adversos como hipo e hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, pancreatitis e hipotensión cuando el PMD es administrado (Jha, 1983). El mecanismo de acción del PMD no está bien definido, pero se sabe que actúa sobre el potencial de membrana mitocondrial e inhibe la síntesis de poliaminas, ADN, ARN y proteínas (Bray et al, 2003; Wishart et al., 2018).

Hay evidencias que sugieren que el PMD se une al surco menor del ADN en regiones que contienen series de 5 o más pares de bases de Adenina-Timina cambiando la forma como está dirigido el esqueleto de ADN y evitando su síntesis (Zolek y Maciejewska, 2010). También se ha encontrado, en estudios llevados a cabo con *Saccharomyces cerevisiae* que la pentamidina (no isetionato) bloquea la traducción mitocondrial en eucariotas al unirse al tARN (Sun y Zhang, 2008)

Stokes y colaboradores (2017) demostraron un nuevo mecanismo de acción que representa su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Usando microscopía de fuerza atómica, observaron ondulaciones en la membrana externa de células de *E. coli* tratada con pentamidina, lo que sugiere la interacción directa de la droga con los componentes de la membrana externa.

Se ha observado también que el PMD inhibe la actividad de la topoisomerasa en *P. jirovecii* al igual que en los tripanosomátidos, lo que resulta en la rotura del ADN circular mitocondrial presente en el kinetoplasto (Lemke y Williams, 2012)

En una cepa ATCC (por sus siglas en inglés *american type culture collection*) de *Acinetobacter baumannii*, se demostró que un sistema de eflujo (el AdeAB) proporciona resistencia a un subconjunto de compuestos dicatiónicos y que la resistencia al PMD depende de la fuente de carbono con la que se desarrolla (Adams et al., 2018). Se generó resistencia *in vitro* al PMD en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, (empleadas anteriormente como modelo para estudiar los efectos del PMD en *P. jirovecii*) y se encontró que mutaciones en el ARN ribosomal de las mitocondrias parecen estar relacionadas con dicha resistencia (Hatfield et al., 1991 y Örs et al., 2004).

El KTZ es un imidazol antimicótico que afecta la síntesis de ergosterol (por inhibición de la conversión del lanosterol) produciendo alteraciones en la membrana celular y afectando su permeabilidad. Ha sido utilizado para tratar enfermedades producidas por hongos (e.g. candidiasis y onicomicosis), además de la LC (vía oral) (López-Carvajal et al., 2016 y Mohapatra, 2014). Cabe resaltar que la FDA limitó el uso oral de KTZ debido a su alta hepatotoxicidad y a la probabilidad de que ocasione problemas en las glándulas suprarrenales (Center for Drug Evaluation, 2018).

Otros mecanismos de acción del KTZ son mencionados, se sugiere que el mecanismo de acción del KTZ “involucran la inhibición de la respiración endógena, la interacción con fosfolípidos de membrana, la inhibición de la absorción de purinas y el deterioro de la biosíntesis de triglicéridos y / o fosfolípidos” (Wishart et al., 2018).

Se ha informado de resistencia clínica al KTZ en infecciones por *Candida albicans*, particularmente en pacientes infectados con VIH (Rautemaa et al., 2008). Se ha demostrado que la resistencia de los hongos al KTZ se debe al aumento de la actividad de los transportadores multimedicamentos ABC y a la transcripción de varios genes que codifican enzimas en la ruta de la biosíntesis de esteroides (Tsao et al., 2009).

2.1.6 Resistencia a PMD y KTZ: En parásitos. Es sabido que en *T. brucei* existe resistencia cruzada melarsoprol/PMD y que esta puede estar mediada por los ya mencionados transportadores P2, AQP2 Y AQP3 (Figura 5); sin embargo, en la resistencia individual a PMD, se han encontrado involucrados otros transportadores de baja afinidad, como los transportadores LAPT1 y HAPT1, lo que sugiere que la resistencia de *Trypanosoma* a PMD está principalmente relacionada con la absorción y eflujo del fármaco (de Koning y Jarvis, 2001 y Munday et al., 2015).

Aunque los estudios indican que, en malaria, las diamidinas son bloqueadores eficientes de la cristalización de hemozoina *in vitro* y que por tanto su modo de acción es similar al de la cloroquina, no se ha encontrado resistencia cruzada entre PMD y cloroquina, ni entre PMD y los demás antimaláricos estándar (Stead et al., 2001)

Por otro lado, en *T. cruzi* tratado con azoles, se ha observado que la inducción de la resistencia se debe a la regulación positiva del nivel de expresión de la esterol-C14-demetilasa, una enzima importante en la biosíntesis del esterol (Buckner et al., 1998).

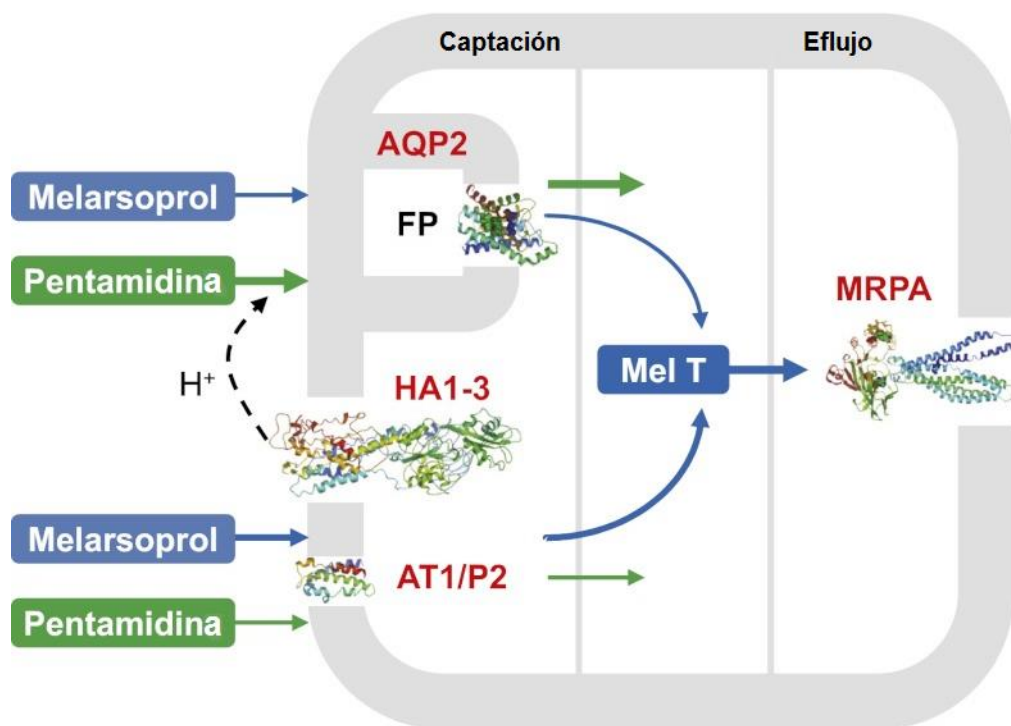


Figura 5. Modelo de transporte de Melarsoprol y PMD en *T. brucei*. Adaptado de (Baker et al., 2012). Los cuatro transportadores se han relacionado con el control de la susceptibilidad a melarsoprol y/o PMD. Ambas drogas ingresan a la célula a través de AT1/P2 y AQP2/HA1-3. El eflujo del melarsoprol tóxico (Mel T) se da a través de MRPA. Los canales AT1/P2 y AQP2 transportan los medicamentos con diferentes eficiencias como lo indican las flechas. FP, bolsillo flagelar; Mel T, conjugado de melarsoprol-trypanotion.

2.1.7 Resistencia a PMD y KTZ: En *Leishmania*. Hasta la fecha no se han confirmado casos de resistencia clínica a PMD en *Leishmania*, pero, durante el período en que utilizó en la India, hubo disminución rápida de la tasa de curación (95% al 70%) en un periodo de 10 años (Jha, 1983 y Jha et al., 1991).

Se han generado *in vitro* cepas de *L. donovani* y *L. (L) amazonensis* resistentes al PMD las cuales mostraron una menor captación y mayor flujo de salida del fármaco, comparadas con las cepas nativas, mecanismo que podría involucrar transportadores de membrana (Bray et al., 2003). Por ejemplo, en el 2003 se halló y mapeo un gen que confería resistencia a PMD, que resultó

ser la hebra molde para la codificación de una proteína perteneciente a la familia de los transportadores ABC que se denominó proteína de resistencia a pentamidina 1 (PRP1) y que además confiere resistencia cruzada a Sb^{III} (Coelho, Beverley, y Cotrim, 2003)

El aumento del tamaño de la mitocondria, la condensación, disrupción y desintegración del ADN del kinetoplasto (kDNA) y la exclusión mitocondrial del fármaco han sido observados en parásitos resistentes al PMD, generados en el laboratorio (Basselin, Badet-Denisot, Lawrence, y Robert-Gero, 1997; Basselin et al., 2002)

En clones de *L. (L) amazonensis* resistentes experimentalmente al KTZ, se encontró actividad aumentada de la enzima C-14 alfa demetilasa, responsable de la transformación de lanosterol en ergosterol (Andrade-Neto et al., 2012), sin embargo, no se descarta que la resistencia de *Leishmania* a los azoles pueda involucrar bombas eflujo (Gülat y Doluca Dereli, 2014).

La resistencia combinada a PMD y KTZ, no se ha reportado, ni en aislados clínicos de *Leishmania*, ni en ensayos *in vitro* con parásitos de este género.

2.2 Materiales y métodos

Este estudio experimental de laboratorio de tipo analítico mixto se llevó a cabo en tres fases (Figura 6). En la fase 1 se indujo resistencia experimental a KTZ y PMD (solos y en combinación) en promastigotes de *Leishmania*, para dar paso a las fases 2 y 3, en las cuales se evaluaron características biológicas de la cepa con susceptibilidad natural (WT) y las cepas con susceptibilidad disminuida. La fase 2 fue llevada a cabo en modelos *in vitro* de LC, mientras que la fase 3 se realizó en un modelo *in vivo* empleando animales de experimentación.

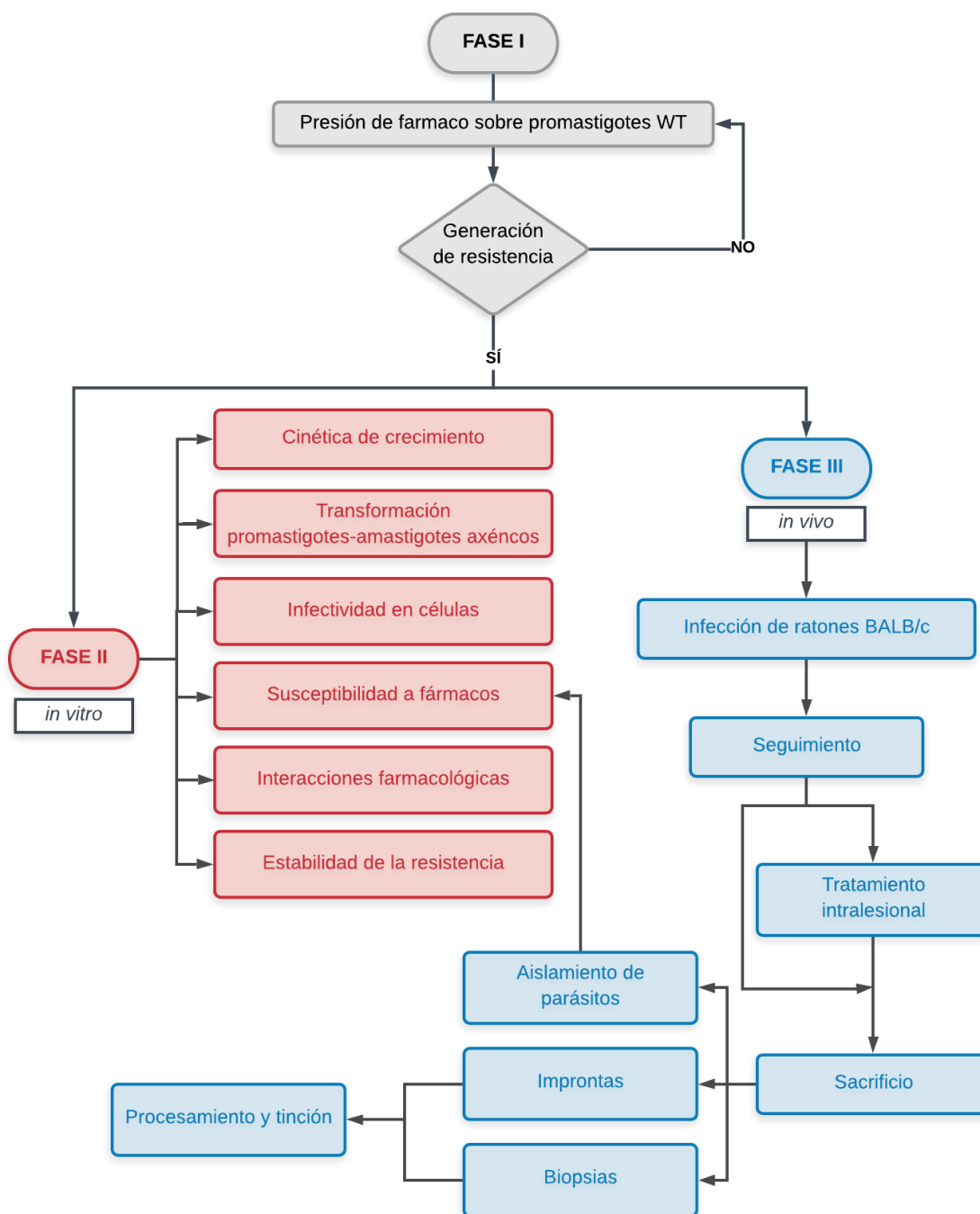


Figura 6. Diseño metodológico del estudio.

2.2.1 Fármacos. El isetionato de PMD, el KTZ, la MTF y el PM fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Las soluciones stock se prepararon disolviendo los medicamentos en dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac®, Barcelona, España) o medio de cultivo Schneider (Sigma-Aldrich) dependiendo de su solubilidad y estabilidad. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio de cultivo Schneider antes de su uso. Las características fisicoquímicas de los fármacos se observan en la tabla 1.

2.2.2. Células. Se emplearon células de monocitos leucémicos humanos, THP-1 (ATCCTIB-202) que fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi, Gibco) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/E, Gibco) a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células fueron transformadas a su fenotipo adherente mediante exposición a 60 ng/mL de forbolmiristato acetato (PMA, Sigma-Aldrich) durante 72 horas.

2.2.3. Parásitos. En este trabajo se utilizó la cepa MHOM/BR/75/M2903 de *L. (V.) braziliensis*. Los promastigotes fueron cultivados en medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de SFBi y 1% de P/E, a 26°C, > 1% de CO₂ y ~70% de humedad.

Los amastigotes axénicos fueron obtenidos mediante cultivo de promastigotes de 3 a 4 días de cultivo en medio Schneider acidificado (pH: 5,5) y suplementado con 20% de SFBi y 1% de P/E a 32°C, 5% de CO₂, 96% de humedad (Debrabant, Joshi, Pimenta, y Dwyer, 2004)

Los amastigotes intracelulares fueron obtenidos infectando células THP-1 transformadas, con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento en una proporción parásito: célula de 5:1.

Tabla 1.

Características fisicoquímicas de los fármacos utilizados en el proyecto (CaymanChemical, 2019; PubChem, 2018; Wishart et al., 2018)

Fármaco	KTZ	PMD	MTF	PM
Fórmula química	$C_{26}H_{28}C_{12}N_4O_4$	$C_{23}H_{36}N_4O_{10}S_2$	$C_{21}H_{46}NO_4P$	$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$
Peso molecular (g/mol)	531,43	592,68	407,57	713,71
Solubilidad en agua (mg/mL)	0,00931	>30	$\geq 2,5$	79,7
logP	4,3	1,32	2,68	-2,9
pKa	6,75	12,13	1,88	9,94
Carga fisiológica	0	2	0	5

Nota: KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; MTF: Miltefosina; PM: Sulfato de paromomicina; logP: Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua; pKa: Logaritmo negativo de la constante de acidez.

2.2.4. Animales de experimentación. Los experimentos fueron realizados en ratones machos y hembras, de entre 6 y 8 semanas de edad de la cepa BALB/c. Los roedores permanecieron en cajas especiales, en un espacio físico con control de la temperatura, la humedad relativa y los ciclos de luz oscuridad (12 horas de luz artificial/ 12 horas de oscuridad). Se aseguró que el consumo de agua e ingesta de alimento fuera *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en la Unidad Experimental del CINTROP ubicada en laboratorio 109 del edificio de investigaciones del Parque Tecnológico Guatiguará- UIS.

La aleatorización de los ratones BALB/c para los experimentos se llevó a cabo usando la página web *Research Randomizer*.

Los ratones BALB/c se obtuvieron del Instituto Nacional de Salud (INS) y fueron intervenidos siguiendo los lineamientos establecidos por la ley 84 de 1989, la resolución 008430 de 1993 para

investigación biomédica con animales de laboratorio y el principio de las tres R's. Esta investigación fue clasificada como SIN RIESGO para los humanos según la normatividad vigente de la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 ya que no se intervino ni se usó ninguna muestra proveniente de participantes humanos.

Durante el desarrollo de este trabajo se veló siempre por el uso racional de los recursos, la mitigación del impacto ambiental y el respeto por el bienestar de todas las formas de vida. Ningún residuo con potencial tóxico o infeccioso entró en contacto directo con el medio ambiente, dado que la disposición final de los residuos biológicos y químicos generados se llevó a cabo de acuerdo con el Plan de Gestión Integral de Residuos de la Universidad Industrial de Santander (PGIR-UIS).

El Comité de Ética para la investigación científica (CEINCI – UIS) dio aval a este proyecto el 18 de enero del 2019, según consta en el Acta N° 01.

2.2.5. Generación de promastigotes de *L. (V) braziliensis* resistentes (Fase 1). La resistencia se generó *in vitro* mediante el método de adaptación por etapas descrito previamente por Gamarro et al. (1994), manteniendo presión continua y creciente del o los fármacos sobre promastigotes de *Leishmania*.

Este proceso comenzó colocando una concentración de 0,5 μM de KTZ, 0,05 μM de PMD y 0,5+0,05 μM de KTZ+PMD en tres subcultivos diferentes de la cepa WT y aumentando gradualmente la concentración de estos durante las semanas siguientes (Tabla 2).

Tabla 2.

Concentraciones y tiempos empleados en la generación de resistencia a fármacos en promastigotes de *Leishmania*.

Línea de promastigotes	Concentración de KTZ [μ M]	Concentración de PMD [μ M]	Número de pases*
Cepa nativa (WT)	0	0	n/a
Resistentes a PMD (R-P)	0	0,5	1
	0	1	5
	0	2	3
	0	5	3
	0	7	2
	0	10	3
	0	15	3
	0	17	3
	0	20	5
	0,05	0	6
Resistentes a KTZ (R-K)	0,1	0	3
	0,3	0	1
	1	0	1
	5	0	3
	10	0	3
	20	0	7
	0,5	0,05	2
Resistentes a KTZ y PMD (R-K/P)	0,75	0,075	3
	1	0,1	2
	1,25	0,125	3
	1,5	0,15	2
	1,75	0,175	1
	2	0,2	2
	2,25	0,225	3
	2,5	0,25	2
	3	0,3	2
	5	0,5	3
	10	1,0	7

Nota: KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD; μ M: Micromolar; *Número de pases: Número de subcultivos realizados antes de escalar la concentración de fármaco. En negrilla se muestran las concentraciones de los fármacos empleadas para generar los parásitos con mayor resistencia.

La concentración del fármaco o la combinación se aumentó cuando las tasas de crecimiento de las cepas resistentes (en generación) fueron equivalentes al de la cepa nativa (WT). Se realizó un subcultivo nuevo cada 3 o 7 días dependiendo de la cantidad de parásitos presente en el cultivo. El número de subcultivos desde la generación de la cepa hasta que su tasa de crecimiento se igualó con la de la cepa WT fue cuantificado (número de pases, Tabla 2).

Todas las líneas de promastigotes generadas fueron cultivadas empleando medio de cultivo Schneider, SFBi y P/E. Los parásitos seleccionados para realizar la caracterización en las fases 2 y 3 fueron: Resistentes a 20 μ M de KTZ (R-K), resistentes a 20 μ M de PMD (R-P) y resistentes a 10 μ M de KTZ + 1 μ M de PMD (R-K/P).

2.2.6. Caracterización *in vitro* de parásitos resistentes (Fase 2). En esta fase del estudio se midieron la cinética de crecimiento, metaciclogénesis, infectividad y susceptibilidad de la cepa WT de *L. (V) braziliensis* y de las cepas con susceptibilidad disminuida generadas en la fase 1 del proyecto.

2.2.6.1. Cinética de crecimiento: Los promastigotes de las cepas WT y resistentes fueron ajustados a 1×10^6 parásitos/mL en medio de cultivo Schneider sin presencia de fármaco, y dejados a 26°C, por 10 días. El crecimiento fue monitoreado diariamente por microscopía óptica mediante recuento en hemocitómetro usando eosina amarilla al 0,025% (Merck®, Darmstadt, Alemania) como colorante vital.

Para cada una de las cepas se calculó el tiempo de duplicación (t_D) el cual equivale al tiempo requerido para que la población se duplique en la fase exponencial de crecimiento. Para esto se empleó la ecuación 1, donde t es el tiempo de uno de los días en que la gráfica muestra

comportamiento exponencial, N es la concentración de parásitos en ese mismo día y N_0 es la concentración inicial de parásitos.

Ecuación 1

$$tD = \frac{t}{3,3 (\log N - \log N_0)}$$

Los resultados fueron expresados como número de parásitos por mililitro en función del tiempo en días.

2.2.6.2. Transformación de promastigotes a amastigotes axénicos: Se obtuvieron amastigotes axénicos de las líneas WT y resistentes a partir de cultivos de promastigotes de 3-4 días según lo descrito anteriormente (Sección 2.2.3). Diariamente, se realizó conteo de parásitos en microscopio óptico (Carl Zeiss-Primo Star, Jena, Alemania), diferenciando entre promastigotes y amastigotes, empleando un hemocitómetro y eosina amarilla al 0,025%. Se calculó el tD para cada una de las cepas según lo descrito en el apartado “Cinética de crecimiento”. Con el fin de obtener imágenes de la transformación, se tomaron 10 μ L de cada cultivo en cada uno de los días de conteo y se colocaron en láminas de vidrio para su posterior fijación con metanol absoluto (Merck) por un minuto y coloración con Giemsa (J.T. Baker™, Reino Unido) durante 15 minutos.

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de transformación diario, el cual fue calculado según la ecuación 2.

$$\text{Ecuación 2} \quad \% \text{ transformación} = \frac{\text{No de amastigotes}}{\text{No de parasitos}} \times 100\%$$

2.2.6.3. Capacidad infectiva de los parásitos en células: Las células THP-1 transformadas con PMA, fueron infectadas con promastigotes de las cepas WT y resistentes en fase estacionaria (7-8 días) de crecimiento, en una proporción parásito: célula de 5:1 durante 24, 48 y 72 horas. El porcentaje y los rangos de infección se determinaron mediante conteo en microscopio óptico del número de células infectadas y del número de amastigotes por célula en 100 células, en láminas fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa.

Los resultados se expresaron como porcentaje de infección y, de acuerdo con intervalos de infección establecidos en rangos de parásito por célula así: 0 amastigotes/célula, 1-10 amastigotes/célula, 11-20 amastigotes/célula y >20 amastigotes/célula.

2.2.6.4. Susceptibilidad al fármaco origen: Los promastigotes (1×10^6 parásitos/mL), amastigotes axénicos (2×10^6 parásitos/mL) y amastigotes intracelulares de las cepas WT y las R-K, R-P y R-K/P fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 del o los fármacos con el o los cuales habían sido sometidos a presión selectiva (KTZ y/o PMD) por 72 h. Parásitos de control permanecieron sin fármaco. Los parásitos WT fueron tratados por separado con ambos fármacos.

Para determinar el efecto de uno o dos de los fármacos en la viabilidad de los promastigotes y amastigotes axénicos, se utilizó la técnica colorimétrica de reducción de la resazurina (Sigma-Aldrich) según lo descrito por Carreño y Escobar, en el 2019. Brevemente, se aplicó resazurina (20 μ L; 0,125 mg/mL) en cada uno de los pozos empleados en el ensayo y se cuantificó la reducción de resazurina (azul) a resofurina (rosada) midiendo la absorbancia a 570 y 600 nm en

un espectrofotómetro Synergy™ H1 (Vermont, USA) luego de mínimo 4 y máximo 24 horas de incubación. El porcentaje de reducción del colorante se determinó aplicando la ecuación 3.

Ecuación 3

$$\% \text{ de reducción} = \left(\frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)} \right) * 100$$

Donde,

O1: Coeficiente de extinción molar (E) de la resazurina oxidada (Azul) a 570 nm

O2: E de la resazurina oxidada a 600 nm

R1: E de la resazurina reducida (rojo) a 570 nm

R2: E de la resazurina reducida a 600 nm

A1: Absorbancia de los pozos tratados at 570 nm

A2: Absorbancia de los pozos tratados a 600 nm

N1: Absorbancia de los controles negativos a 570 nm

N2: Absorbancia de los controles negativos a 600 nm

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de los promastigotes y amastigotes axénicos comparando el porcentaje de reducción de la resazurina de los parásitos tratados versus la de los parásitos control.

En los amastigotes intracelulares, el efecto de los fármacos se determinó utilizando la metodología clásica de conteo directo (Neira, Stashenko, y Escobar, 2014). Se determinaron los porcentajes de inhibición comparando el número de células infectadas en 100 células tratadas y el número de células infectadas en 100 células cultivadas como control. Los conteos se realizaron en

láminas fijadas con metanol absoluto y coloreadas con Giemsa y se llevó a cabo en microscopio óptico.

Con los porcentajes de inhibición obtenidos en promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares se calculó la concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) mediante regresión sigmoideal utilizando el software MxlfittTM (ID Business solution, UK).

Para determinar si la disminución de la susceptibilidad de los promastigotes a los fármacos se trataba realmente de resistencia se calculó el índice de resistencia (IR) dividiendo la CI₅₀ del fármaco **A** para la cepa resistente entre la CI₅₀ del fármaco **A** para la cepa WT. Cuando el valor del IR fue mayor de 5, se consideró que la población bajo estudio tenía características de resistencia fuertemente pronunciadas, esto teniendo en cuenta que una variación de dos veces en los valores de IC₅₀ en ensayos con medicamentos es común (Berg et al., 2015; Seifert, K et al., 2003).

2.2.6.5. Susceptibilidad cruzada (a fármacos diferentes al fármaco origen): Se determinó la susceptibilidad cruzada de los parásitos a fármacos diferentes a los de origen: MTF y PM (Características, tabla 1). Los promastigotes (1×10^6 parásitos/mL), fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de MTF y PM en las mismas condiciones descritas anteriormente. Como control se usaron parásitos mantenidos en medio de cultivo sin fármacos. La determinación del efecto de los fármacos en la viabilidad del parásito y el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento, la CI₅₀ y el IR fueron realizados como se describió anteriormente.

2.2.6.6. Susceptibilidad a combinación de dos fármacos: Para determinar la actividad de los medicamentos en combinación, promastigotes (1×10^6 parásitos/mL) WT y resistentes fueron tratados por 3 días a 26° C con diluciones seriadas 1:3 de mezclas de radio fijo 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 y 0:5 de KTZ y PMD. Las soluciones empleadas para la preparación de las mezclas tuvieron una concentración de PMD y KTZ al menos 3 veces mayores que las CI_{50} 's obtenidas para los medicamentos usados individualmente.

La inhibición del crecimiento de los promastigotes se midió mediante el ensayo colorimétrico de reducción de resazurina y las CI_{50} 's de cada uno de los compuestos y de las combinaciones sinérgicas fueron calculadas mediante regresión no lineal en el software de regresión sigmoidal MxslfitTM. Adicionalmente el índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF) y la sumatoria de los CIFs fueron calculados según la ecuación 4, dónde CI_{50A} y CI_{50B} son los valores de CI_{50} de cada compuesto solos y A y B son los valores de CI_{50} de A o B cuando el tratamiento se llevó a cabo en combinación.

Ecuación 4

$$\sum CIF = \frac{A}{CI_{50A}} + \frac{B}{CI_{50B}}$$

Las CIFs fueron usadas para construir isobologramas. La $\sum CIF$ fue calculada para cada combinación y usada para clasificar la naturaleza de la interacción así: $\sum CIF \leq 0,5$ definido como sinérgico, indiferente o sumatoria $\sum CIF$ entre 0,5 y 4; y antagonismo $\sum CIF > 4$ (Carreño y Escobar, 2019).

2.2.6.7. Estabilidad de la susceptibilidad en promastigotes: Subcultivos de los promastigotes de las líneas R-K, R-P y R-K/P fueron mantenidos en medio de cultivo sin presión del fármaco durante 1, 2, 3 y 5 meses.

La susceptibilidad de los parásitos a los fármacos después de cada tiempo fue determinada tratando los parásitos, por 72 horas, con diluciones seriadas 1:3 del fármaco(s) con el cual(es) habían sido sometidos a presión selectiva (KTZ y/o PMD). Se determinó la inhibición del crecimiento y se calculó la CI_{50} según lo descrito anteriormente.

2.2.7. Caracterización de los parásitos resistentes *in vivo* (Fase 3). En la fase 3 de este proyecto, se evaluó, en un modelo murino, la capacidad infectiva de los parásitos WT y cepas resistentes R-K, R-P y R-K/P, la respuesta a un tratamiento intralesional y la susceptibilidad a KTZ y/o PMD de los parásitos obtenidos de luego de la infección y luego del tratamiento.

2.2.7.1. Infección, seguimiento y sacrificio: Los ratones BALB/c de entre 6 a 8 semanas de edad fueron infectados con un millón de promastigotes en fase estacionaria (7 días), mediante inoculación percutánea en la región lumbosacra. La distribución de los ratones por cepa se describe en la tabla 3.

Para el seguimiento de la infección, cada semana, hasta por 28 semanas, se monitoreó la zona en el sitio de inoculación en búsqueda de lesiones de LC; inmediatamente se encontró algún tipo de lesión se dio inicio al seguimiento semanal.

Tabla 3.

Distribución de ratones BALB/c de acuerdo con la línea de promastigotes con que se realizó su infección.

	n	Ratones	
		Código interno	Código en el proyecto
WT	6	In 24-R1	w.1
		In 24-R2	w.2
		In 24-R3	w.3
		In 33-R1	w.4
		In 33-R2	w.5
		In 40- R1	w.6
R-K	12	In 24-R4	k.1
		In 24-R5	k.2
		In 24-R6	k.3
		In 33-R3	k.4
		In 33-R4	k.5
		In 40-R6	k.6
		In 40-R7	k.7
		In 40-R8	k.8
		In 40-R15	k.9
		In 40-R16	k.10
		In 40-R17	k.11
		In 40-R18	k.12
R-P	8	In 33-R-5	p.1
		In 33-R6	p.2
		In 40- R2	p.3
		In 40- R3	p.4
		In 40- R4	p.5
		In 40- R5	p.6
		In 45-R1	p.7
		In 45-R2	p.8
R-K/P	8	In 40-R9	m.1
		In 40-R10	m.2
		In 40-R11	m.3
		In 40-R12	m.4
		In 40-R13	m.5
		In 40-R14	m.6
		In 45-R3	m.7
		In 45-R4	m.8

Nota: n: Número de ratones por grupo experimental; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD; In n: Infección número n; R n: Ratón número n.; m: mixta

Para el sacrificio, entre 5 y 15 semanas después de la aparición de las lesiones de LC, los ratones fueron sedados mediante aplicación de 120 mg/kg de peso, de clorhidrato de ketamina (Holliday-Scott S.A.S, Argentina)] y 10 mg/kg de peso, de clorhidrato de xilacina (Holliday-Scott S.A.S, Argentina) y posteriormente sacrificados mediante dislocación cervical. Los ratones que no desarrollaron lesiones fueron sacrificados junto con el (los) último(s) individuos con lesiones de su grupo. Se realizaron aislamiento de parásitos para cultivo, improntas y biopsias de lesión y biopsias de órganos para estudios histopatológicos.

2.2.7.2. Evolución de la LC ocasionada en ratones por parásitos resistentes: Con el fin de evaluar la evolución de las lesiones de LC generadas luego de la inoculación de los ratones BALB/c con parásitos de las líneas WT, R-K, R-P y R-K/P se realizó un seguimiento semanal que constó del registro fotográfico y de la medición del diámetro longitudinal y transversal de lesiones y úlceras empleando un calibrador digital (Tracedable®, VWR, Radnor, USA). El área de las lesiones y úlceras se calcularon como describe la ecuación 5.

Ecuación 5

$$\text{Area} = \frac{\text{Diametro longitudinal}}{2} \times \frac{\text{Diametro trasversal}}{2} \times 3,14$$

Los resultados de la evaluación de la evolución de las lesiones producidas fueron expresados como área de la lesión vs tiempo en semanas.

Se determinó la presencia o ausencia de parásito mediante la toma de improntas de lesión o piel (del sitio de inoculación) en láminas portaobjetos de vidrio, que luego fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa.

2.2.7.3. Determinación de los patrones histopatológicos

2.2.7.3.1. Toma de muestra y procesamiento: Se recolectaron muestras de lesión o piel, riñón, hígado y bazo, que fueron colocados en formalina (Merk) bufferada al 10% (pH: 7,0). Los tejidos almacenados fueron procesados en el laboratorio del Departamento de Patología de la Facultad de Salud-UIS. Tanto lesiones como órganos fueron cortados y almacenados en casetes para biopsias. Posteriormente los tejidos fueron parafinados y se les realizaron cortes de 5 micras empleando un micrótomos de sistema manual rotativo (Modelo 2135, Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA) que fueron ubicados sobre láminas de vidrio.

La eliminación de la parafina se llevó a cabo en dos pasos, primero, se sometió a las láminas a una temperatura de 70°C por 30 min y luego se realizaron tres baños de xilol (70, 80 y 90% v/v) de cuatro minutos cada uno. El xilol fue retirado mediante el paso de las láminas por alcohol (98% v/v). Las láminas desparafinadas y fijadas fueron coloreadas con hematoxilina y eosina durante 30 segundos.

2.2.7.3.2. Características histopatológicas de las lesiones: Las biopsias de lesiones y piel fueron observadas en microscopio óptico a 10, 40 y 100x, con el fin de comparar el patrón histológico producido por la cepa WT y las cepas resistentes.

Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron, en la epidermis: acantosis (lesión epidérmica por multiplicación exagerada o hipertrofia de las células del cuerpo de Malpighi), hiperqueratosis (acumulación excesiva de queratina en la epidermis con aparición de espacios de tamaño variable alrededor de los núcleos de las células de la capa superior de la epidermis), paraqueratosis (desaparición del estrato granuloso y persistencia de los núcleos del estrato corneo), atrofia (disminución del tamaño celular y alteración morfológica de las células), espongiosis (aumento

de los espacios intra-epidérmicos, con separación de las células epidérmicas, especialmente las del estrato de Malpighi, observándose como pequeñas vesículas) y fibrosis (formación o desarrollo del tejido conectivo fibroso como bandas vacuoladas o débilmente teñidas). En la dermis se evaluó la presencia de infiltrado inflamatorio, amastigotes intra y extracelulares de *Leishmania*, la extravasación de glóbulos rojos y la presencia/ausencia de necrosis.

Los resultados se expresaron utilizando una escala semi-cuantitativa ajustada a cada patrón histopatológico teniendo en cuenta el grado de la variable en 50 campos microscópicos así: leve (1-15/campo), moderado (16-30/campo) o severo (>30/campo) (Neira, Peña, Vera, Mantilla, y Escobar, 2019).

2.2.7.3.3. Presencia de amastigotes en órganos: Las biopsias de riñón, hígado y bazo fueron examinadas por microscopía óptica en objetivo de inmersión en busca de amastigotes, mononucleares y polimorfonucleares. Además, se evaluó la integridad de las estructuras celulares.

2.2.7.4. Aislamiento, cultivo de los parásitos y susceptibilidad de los parásitos aislados pos-infección: Tanto de los ratones que presentaron lesiones como de los que no, se realizaron cultivos de lesión (o piel del sitio de la inoculación) de la siguiente manera: después del sacrificio y en esterilidad se retiró parte de la lesión, que fue macerada y colocada en medio Schneider, 10% SFBi con 100 µL de P/E (Volumen final: 2,6 mL) a 26 °C. Luego del primer cultivo, los parásitos aislados (promastigotes) fueron subcultivados por pases seriados tal como se describió anteriormente (Sección 2.2.3)

Una vez obtenidos los cultivos de promastigotes, se evaluó la susceptibilidad de estos a los fármacos de origen. Tal como se describió anteriormente, los promastigotes fueron tratados con

diluciones 1:3 del fármaco (KTZ y/o PMD) por 72 h a 26°C en placas de 96 pozos. Como control se usaron parásitos mantenidos en medio de cultivo sin fármacos. Se determinó la inhibición del crecimiento y se calcularon las CI_{50} , CI_{90} y el IR como se describió previamente.

2.2.7.5. Eficacia al tratamiento de los ratones infectados con las cepas resistentes

2.2.7.5.1. Formulación: Se prepararon microemulsiones (ME) de KTZ y PMD por el método de titulación acuosa mediante el principio de emulsificación espontánea según lo descrito por Carreño y Escobar, 2019. Para esto, se mezcló una cantidad apropiada de aceite, surfactante/co-surfactante (Smix) y agua (20, 30 y 47 %) con el fin de obtener las mejores características posibles. Para la preparación de la ME, KTZ y PMD fueron disueltos en ácido oleico (Panreac®, Barcelona, España) por agitación magnética a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Posteriormente, la Smix preparada por disolución del kolliphor (Sigma-Aldrich) y el propilenglicol (Carlo Erba, Rodano, Italia) en un ratio de 1:2 fuertemente mezclados por vórtex fue agregada a la preparación y agitada por 45 minutos adicionales.

Finalmente, el agua gota a gota fue agregada y la agitación se mantuvo constante durante 30 minutos con el fin de lograr un equilibrio en la ME. La concentración de KTZ y PMD utilizada en todas las preparaciones siempre fue del 2 y el 0,5% respectivamente. Vitamina E (Suquin LTDA, Bucaramanga, Colombia) al 1% fue agregada como antioxidante. Una vez preparadas las MEs fueron caracterizadas y mantenidas en refrigeración hasta su uso.

2.2.7.5.2. *Esquema de tratamiento:* Ratones BALB/c infectados previamente con promastigotes de las cepas WT y resistentes, que desarrollaron lesiones de LC fueron tratados vía intralesional con 100 μ L de una dilución 1:10 de la formulación previamente descrita. El tratamiento fue administrado tres veces por semana, evitando aplicación en días sucesivos, hasta completar 18 dosis. La distribución de los ratones se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.

Distribución por cepas, de ratones tratados con ME de KTZ y PMD.

	N	Ratones	
		Código interno	Código en el proyecto
WT	1	In 40- R1	w.6
R-K	2	In 40-R6	k.6
		In 40-R8	k.8
R-P	2	In 40- R4	p.5
		In 40- R5	p.6
R-K/P	2	In 40-R10	m.2
		In 40-R13	m.5

Nota: n: Número de ratones por grupo experimental; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD; In n: Infección número n; R n: Ratón número n; *Ratones infectados previamente, no pertenecientes al ensayo de infección de este proyecto.

2.2.7.5.3. *Evaluación de efectividad del tratamiento:* A partir de la primera dosis de tratamiento se tomó registro semanal del diámetro longitudinal y trasversal de las lesiones y las úlceras. En los casos en los que el tratamiento afectó la apariencia externa de la lesión, no se realizó medición de la úlcera. El área de lesiones y úlceras fue calculada como se describe en la ecuación 5 (página 37).

Luego de 15 días de finalizado el tratamiento los ratones fueron sedados y sacrificados como se comentó de forma previa. Se realizó aislamiento y cultivo de parásito y toma de improntas y muestras de lesión o piel que fueron colocadas en formalina bufferada al 10% (pH: 7,0) y

procesadas como se menciona anteriormente. Los resultados fueron expresados como área de lesión vs tiempo.

2.2.7.5.4. Aislamiento, cultivo de los parásitos y susceptibilidad de los parásitos aislados post-tratamiento: Los parásitos fueron aislados y cultivados de la misma forma como se describió en la sección 2.2.7.4. La susceptibilidad de los parásitos aislados de lesiones generados por promastigotes resistentes, posteriormente tratadas con la ME de KTZ y PMD, fueron expuestos a diluciones 1:3 de KTZ y PMD por 72 h a 26°C. Se determinó la inhibición del crecimiento y se calcularon las CI_{50} , CI_{90} y el IR como se describió previamente.

2.2.7.5.5. Características histopatológicas de las lesiones tratadas: Las biopsias de lesiones y piel fueron observadas en microscopio óptico a 10, 40 y 100x, con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento con la ME.

Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron presencia del parásito, infiltrado inflamatorio, acantosis, hiperqueratosis, paraqueratosis, atrofia, espongirosis y fibrosis (Ver definiciones en la sección: Características histopatológicas de las lesiones).

2.2.8 Análisis estadístico. Se comprobó la normalidad de los datos empleando la prueba de Kolmogorov Smirnov.

Los resultados de los ensayos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías comparando las medias de los cuatro grupos experimentales.

La prueba post hoc aplicada fue la prueba de Turkey. Un valor p menor de 0.05 se consideró significativo. Los datos se procesaron utilizando el paquete de software Graph Pad Prism® Versión 4.0.

Los resultados de los estudios histopatológicos se asumieron como variables cualitativas.

2.3 Resultados

2.3.1. Generación de promastigotes de *L. (V) braziliensis* resistentes (Fase 1). Se generaron nueve (9) cepas de parásitos resistentes a KTZ (R-0,5 a R-20); siete (7) resistentes a PMD (R-0,05 a R-20); y doce (12) resistentes a KTZ + PMD (R-0,5/0,05 hasta R-10/1) (Tablas 2 y 5). El proceso de generación fue escalonado (Tabla 5) y el tiempo requerido para inducir la resistencia (definido como el tiempo en que las nuevas poblaciones crecieron igual que la WT) fue variable, entre 1 y 7 semanas (Tabla 2). La tabla 5 muestra el mes en que se obtuvo cada una de las líneas resistentes.

Las máximas concentraciones de fármacos a las que se obtuvieron promastigotes viables en cultivo fueron 20 μ M de KTZ y 20 μ M de PMD cuando estos se aplicaron en solitario y 10 μ M de KTZ y 1 μ M de PMD cuando se combinaron. No fue posible generar líneas resistentes a mayores concentraciones de fármacos, dado que los promastigotes morían entre uno y tres días después de haber sido puestos en contacto con las nuevas concentraciones de medicamentos. La generación de promastigotes viables en presencia de las concentraciones más altas de KTZ, PMD y KTZ más PMD empleados requirió 8, 11 y 9 meses respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5.

Obtención de líneas resistentes a KTZ y PMD, solos y en combinación. Verde R-K, Morado R-P y Azul R-K/P.

	Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
R-K	WT											
	R-0,5											
	R-1											
	R-2											
	R-5											
	R-7											
	R-10											
	R-15											
	R-17											
	R-20											
R-P	WT											
	R-0,05											
	R-0,1											
	R-0,3											
	R-1											
	R-5											
	R-10											
	R-20											
R-K/P	WT											
	R-0,5/0,05											
	R-0,75/0,075											
	R-1/0,1											
	R-1,25/0,125											
	R-1,5/0,15											
	R-1,75/0,175											
	R-2/0,2											
	R-2,25/0,225											
	R-2,5/0,25											
	R-3/0,3											
	R-5/0,5											
	R-10/1,0											

Nota: WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD; R-(n): Parásitos resistentes a n concentración (µM) de fármaco.

La inducción de resistencia a 10 μ M de KTZ y 1 μ M de PMD en combinación tomó más de doble de tiempo (9 meses) del que se requirió para inducir resistencia a las mismas concentraciones de los fármacos usados individualmente, que fue de 4 meses en ambos casos (Tabla 5).

Los parásitos seleccionados para ser caracterizados en las fases 2 y 3 fueron los resistentes a 20 μ M de KTZ (R-K), 20 μ M de PMD (R-P) y a 10 μ M de KTZ + 1 μ M de PMD (R-K/P).

2.3.2. Caracterización in vitro de parásitos resistentes (Fase 2)

2.3.2.1. Cinética de crecimiento: Los resultados de cinética de crecimiento corresponden a ensayos realizados en parásitos WT y en nueve diferentes líneas de promastigotes resistentes generadas; tal como se muestra en la figura 7A, 7B y 7C se evaluaron las líneas R-15, R-17 y R-20 de KTZ, las R-5, R-10 y R-20 de PMD y las R-3/0,3, R-5/0,5 y R-10/1 de KTZ en combinación con PMD.

La cepa WT y las cepas resistentes R-K, R-P, R-K/P (en sus diferentes grados de susceptibilidad a los fármacos) mostraron similitudes en cuanto a que en todas se evidenció un crecimiento exponencial con un pico de concentración máxima de promastigotes entre los días 5 y 6 ($>105 \times 10^6$ parásitos/mL) (Figura 7); sin embargo, se observaron algunas diferencias entre los días 7 y 10, cuando el número de parásitos en los cultivos era decreciente (Figura 7).

Al comparar el crecimiento de los parásitos resistentes a tres diferentes concentraciones de PMD (5, 10 y 20 μ M) o tres distintas combinaciones de KTZ y PMD (3/0,3, 5/0,5 10/1 μ M) se encontró un crecimiento homogéneo entre ellas (Figuras 7B y 7C). Sin embargo, los promastigotes resistentes a 15, 17 y 20 μ M de KTZ, mostraron, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la densidad de parásitos en cultivo en días tanto de la fase de crecimiento exponencial como en la de muerte (Figura 7A).

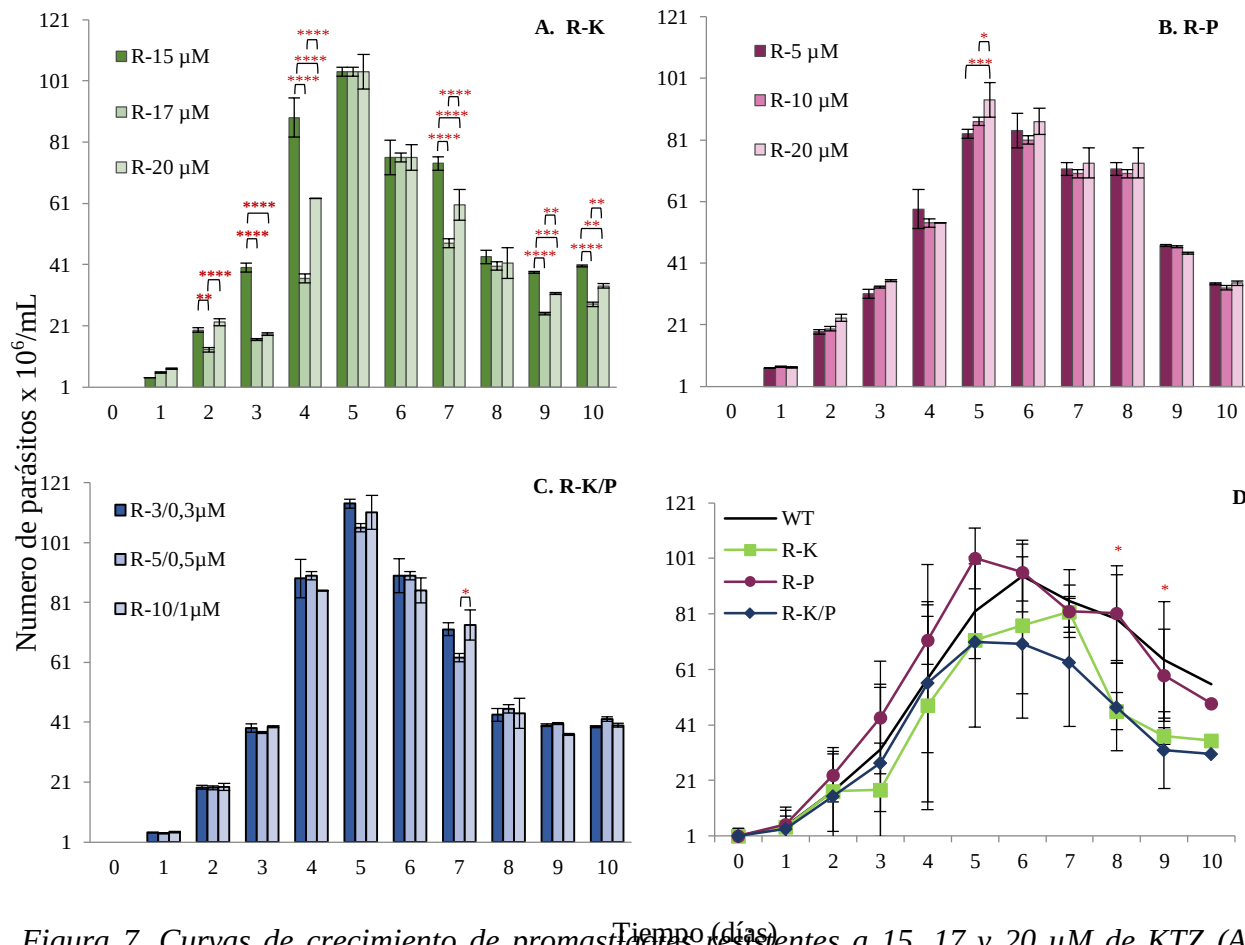


Figura 7. Curvas de crecimiento de promastigotes resistentes a 15, 17 y 20 μM de KTZ (A), promastigotes resistentes a 5, 10 y 20 μM de PMD (B) y parásitos resistentes a 3+0,3, 5+0,5 y 10+1 μM de KTZ+PMD (C). Cinética de crecimiento de promastigotes WT y resistentes a 20 μM de KTZ, 20 μM de PMD y 10+1 μM de KTZ+PMD (D). WT: Parásitos de tipo silvestre (wild type); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD; R-(n): Parásitos resistentes a n concentración (μM) de fármaco. Eje x: Tiempo en días; Eje y: Numero de parásitos $\times 10^6/\text{mL}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes $\pm$ DE. Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

Cuando se compararon las cinéticas de crecimiento de los parásitos resistentes [R-K (20 μM), R-P (20 μM) y R-K/P (10/1)] entre ellas y con la de los promastigotes WT (no resistentes), se encontraron diferencias que parecen depender de las fases de crecimiento. En las fases exponencial y estacionaria no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 7D);

sin embargo, en la fase de decrecimiento, la línea R-K (día 8) y de la línea R-K/P (días 8 y 9) mostraron un crecimiento significativamente menor ($p < 0,05$) que el de la línea WT (Figura 7D).

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tiempo que necesitan los parásitos resistentes y WT en duplicar su número (tiempo de duplicación, tD). Se encontraron tDs entre 18,95 y 20,44 horas (Tabla 6).

Tabla 6.

Tiempos de duplicación de promastigotes y amastigotes axénicos WT y resistentes R-K, R-P, R-K/P, calculados en la fase de crecimiento exponencial de los parásitos (t = Día 5 de crecimiento para los promastigotes y t = Día 3 para los amastigotes axénicos)

$tD \pm DE$ [horas]		
Cepa	Promastigotes	Amastigotes axénicos
WT	$19,36 \pm 1,77$	$60,39 \pm 23,82$
R-K (20uM)	$20,44 \pm 2,79$	$45,40 \pm 8,74$
R-P (20 μM)	$18,95 \pm 1,26$	$27,59 \pm 14,39$
R-K/P (10/1 μM)	$19,76 \pm 2,29$	$51,56 \pm 7,40$

Nota: tD : Tiempo de duplicación; DE: Desviación estándar; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD. Los resultados corresponden al promedio de tres ensayos independientes $\pm$ DE. Las diferencias estadísticas se precisan en el texto.

El tD de los promastigotes fue calculado comparando el número de parásitos en el día de máximo crecimiento (día 5 en todos los casos) con la concentración inicial de promastigotes (1×10^6 parásitos/mL) (Figura 7).

2.3.2.2. Transformación de promastigotes a amastigotes axénicos: Tal como se observa en la figura 8 (barras claras [amastigotes] y barras oscuras [promastigotes]), fue posible, en las cuatro líneas de *L. (V) braziliensis* (WT y resistentes R-K, R-P, R-K/P) la obtención de amastigotes axénicos a partir de los cultivos de promastigotes (Figura 9). Los amastigotes axénicos se observaron cómo parásitos de aspecto ovalado, sin flagelo observable (Figura 9).

Desde el primer hasta el séptimo día para las líneas WT, R-P y R-K/P y hasta el quinto para los parásitos R-K se observó en los cultivos poblaciones mixtas de promastigotes y amastigotes. En el día 4 todos los cultivos habían alcanzado por lo menos el 40% de transformación y para el último día de conteo ya se había alcanzado en todos los casos el 100% de transformación, es decir no se observaban promastigotes (parásitos alargados y flagelados) en ellos (Figuras 8 y 9 y tabla 7).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$), en ninguno de los días, en los porcentajes de transformación diarios de las cepas R-P y R-K/P al ser comparadas entre ellas y con la línea WT, en ninguno de los dos experimentos individuales llevados a cabo (Tabla 7).

Sin embargo, en los días 3, 4, 5 y 6 se evidenció que el porcentaje de transformación de los parásitos resistentes a 20 μ M de KTZ fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que el de los parásitos de las demás líneas (Tabla 7).

Los *tD* calculados para los amastigotes axénicos de los parásitos WT y resistentes R-K, R-P, R-K/P estuvieron entre 27,59 y 60,39 horas, sin diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) al ser comparados entre sí (Tabla 6). Se observó una variabilidad alta entre los experimentos 1 y 2 (Tabla 7).

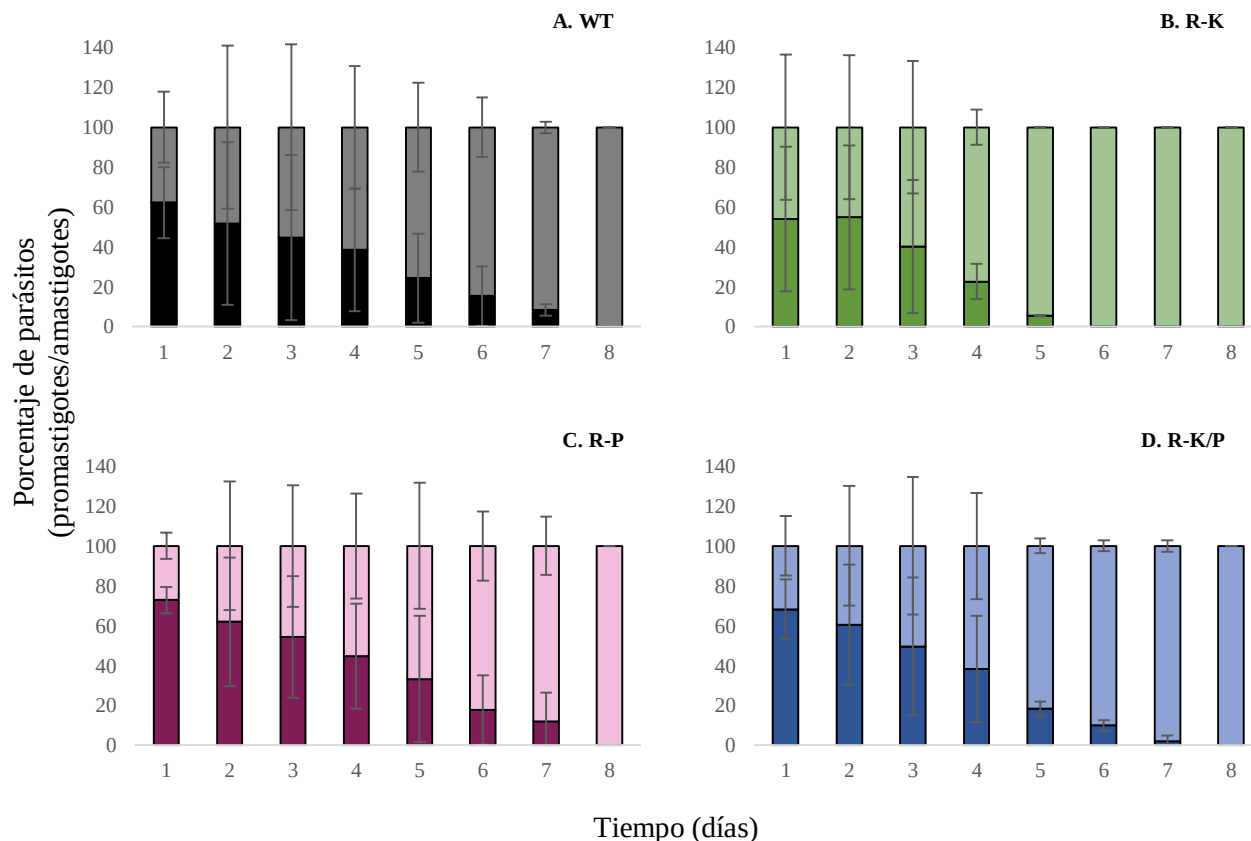


Figura 8. Porcentaje de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos de las líneas WT (A), R-K (B), R-P (C) y R-K/P (D). Las barras oscuras hacen referencia a los parásitos en su forma de promastigotes, mientras que las barras claras representan los amastigotes axénicos. Eje x: Tiempo en días; Eje y: porcentaje de parásitos (promastigotes/amastigotes). Las diferencias estadísticamente significativas se precisan en la tabla 7. Los valores mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes $\pm$ DE. Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

Al comparar los tiempos de duplicación de promastigotes y amastigotes axénicos, se encontró que los tD de los amastigotes fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de los promastigotes mantenidos en las condiciones de cultivo descritos en la sección 2.2.6.1 (Tabla 6). El tD de los amastigotes fue calculado comparando el número de parásitos en el tercer día de crecimiento con la concentración de promastigotes en el día 1.

Tabla 7.

Porcentaje de transformación diario de promastigotes a amastigotes axénicos.

Día	Cepa	% transformación $\pm$ DE	
		Experimento 1	Experimento 2
1	WT	50,42 $\pm$ 0,60	25,25 $\pm$ 7,43
	R-K	71,83 $\pm$ 1,76	20,44 $\pm$ 1,97
	R-P	31,78 $\pm$ 1,17	22,59 $\pm$ 2,34
	R-K/P	42,42 $\pm$ 0,32	21,20 $\pm$ 2,35
2	WT	77,11 $\pm$ 0,43	19,35 $\pm$ 1,56
	R-K	70,87 $\pm$ 0,05	19,61 $\pm$ 0,54
	R-P	60,88 $\pm$ 2,70	15,19 $\pm$ 4,84
	R-K/P	60,89 $\pm$ 1,60	18,33 $\pm$ 2,36
3	WT	84,82 $\pm$ 2,10	26,14 $\pm$ 1,61
	R-K	83,47 $\pm$ 0,19	36,28 $\pm$ 7,90**
	R-P	67,15 $\pm$ 8,38	24,04 $\pm$ 2,57
	R-K/P	74,89 $\pm$ 2,87	26,08 $\pm$ 7,85
4	WT	83,25 $\pm$ 4,95	40,00 $\pm$ 0,04
	R-K	83,60 $\pm$ 0,38	71,21 $\pm$ 1,32*****
	R-P	73,99 $\pm$ 5,35	46,84 $\pm$ 4,45
	R-K/P	80,60 $\pm$ 3,50	42,86 $\pm$ 5,32
5	WT	91,45 $\pm$ 1,85	60,00 $\pm$ 1,20
	R-K	94,67 $\pm$ 1,65	94,34 $\pm$ 0,40*****
	R-P	89,13 $\pm$ 1,69	44,44 $\pm$ 2,01
	R-K/P	84,45 $\pm$ 3,54	79,17 $\pm$ 2,86
6	WT	95,20 $\pm$ 0,05	74,14 $\pm$ 1,12
	R-K	100,00 $\pm$ 0,00**	100,00 $\pm$ 0,00****
	R-P	94,55 $\pm$ 1,27	70,00 $\pm$ 3,11
	R-K/P	92,11 $\pm$ 2,31	88,23 $\pm$ 3,41
7	WT	93,57 $\pm$ 3,54	89,49 $\pm$ 3,31
	R-K	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
	R-P	98,37 $\pm$ 0,02	77,78 $\pm$ 5,60
	R-K/P	95,91 $\pm$ 3,77	100 $\pm$ 0,00
8	WT	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
	R-K	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
	R-P	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
	R-K/P	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00

Nota: DE: Desviación estándar; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a 20 μ M de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μ M de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μ M de KTZ/PMD. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ****p < 0,001. Los resultados mostrados corresponden a las dos replicas internas de cada experimento $\pm$ DE.

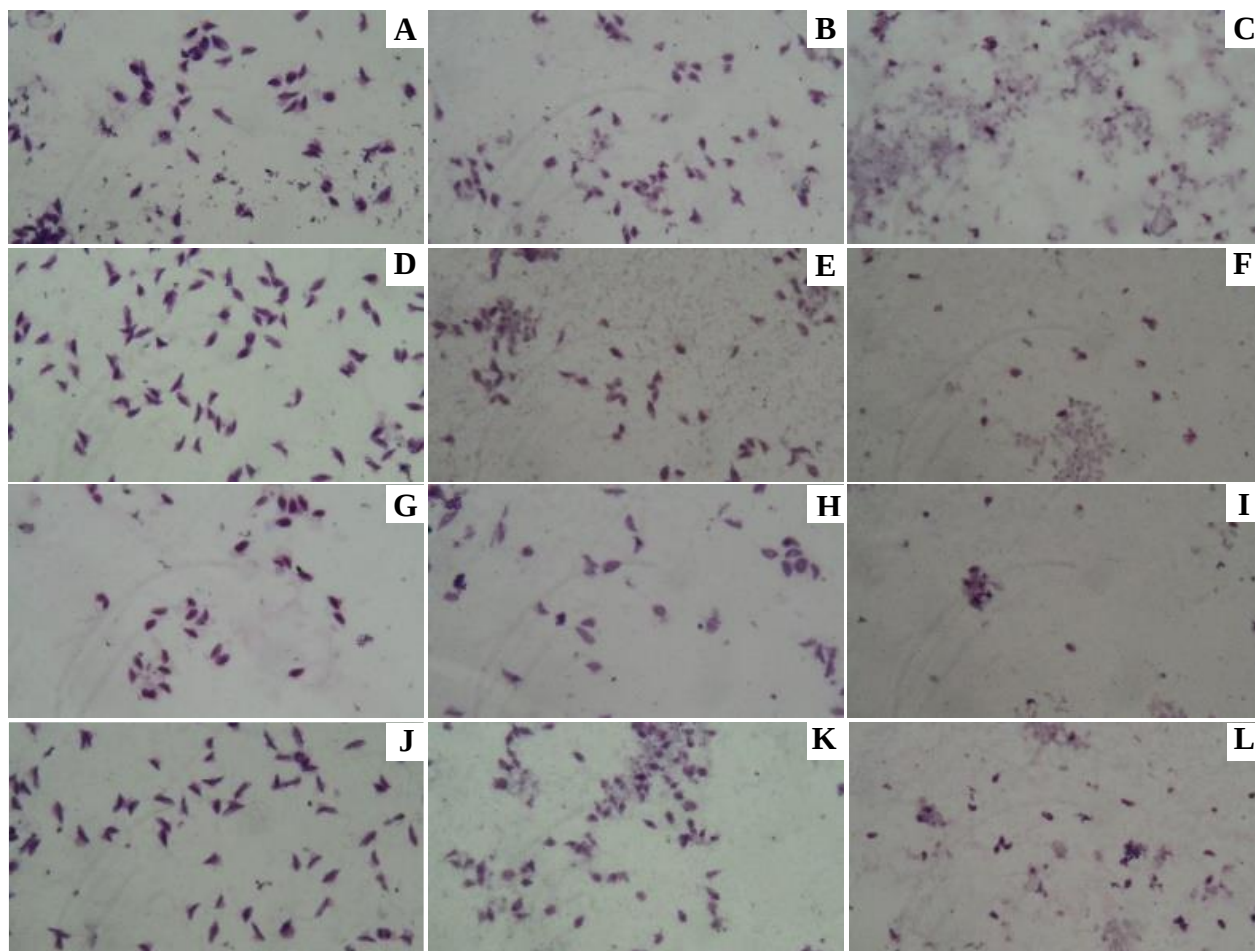


Figura 9. Parásitos WT (A, B y C), R-K (D, E y F), R-P (G, H y I) y R-K/P (J, K y L) teñidos con Giemsa en tres tiempos diferentes del proceso de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos (100x). Cada columna corresponde a días diferentes: primero, cuarto y octavo vistos de izquierda a derecha.

2.3.2.3. Capacidad infectiva de los parásitos en células: Los promastigotes de la cepa WT y resistentes R-K, R-P, R-K/P fueron capaces de infectar in vitro las células THP-1 transformadas.

La infectividad en células THP-1 de los parásitos fue similar, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar tanto los porcentajes de infección como la cantidad de parásitos por célula infectada en ninguno de los tiempos evaluados (Figuras 10 y 11).

Las infecciones obtenidas en todos los tiempos fueron mayores de 45 por ciento para las cuatro líneas parasitarias evaluadas (Figuras 10 y 11D). Los porcentajes de infección aumentaron en relación directa con el tiempo, llegando aproximadamente al 90 por ciento de infección en el tiempo 3, es decir a las 72 horas (Figuras 10 y 11D).

Con el paso del tiempo (24, 48 y 72 horas), el número de amastigotes/célula fue en aumento por lo que el número de células infectadas con más de 20 amastigotes, que para las 24 horas representaba menos del 10 por ciento del total de células contadas, pasó a ser de aproximadamente 15 y 25 por ciento a las 48 y 72 horas respectivamente (Figuras 10, 11A, 11B y 11C).

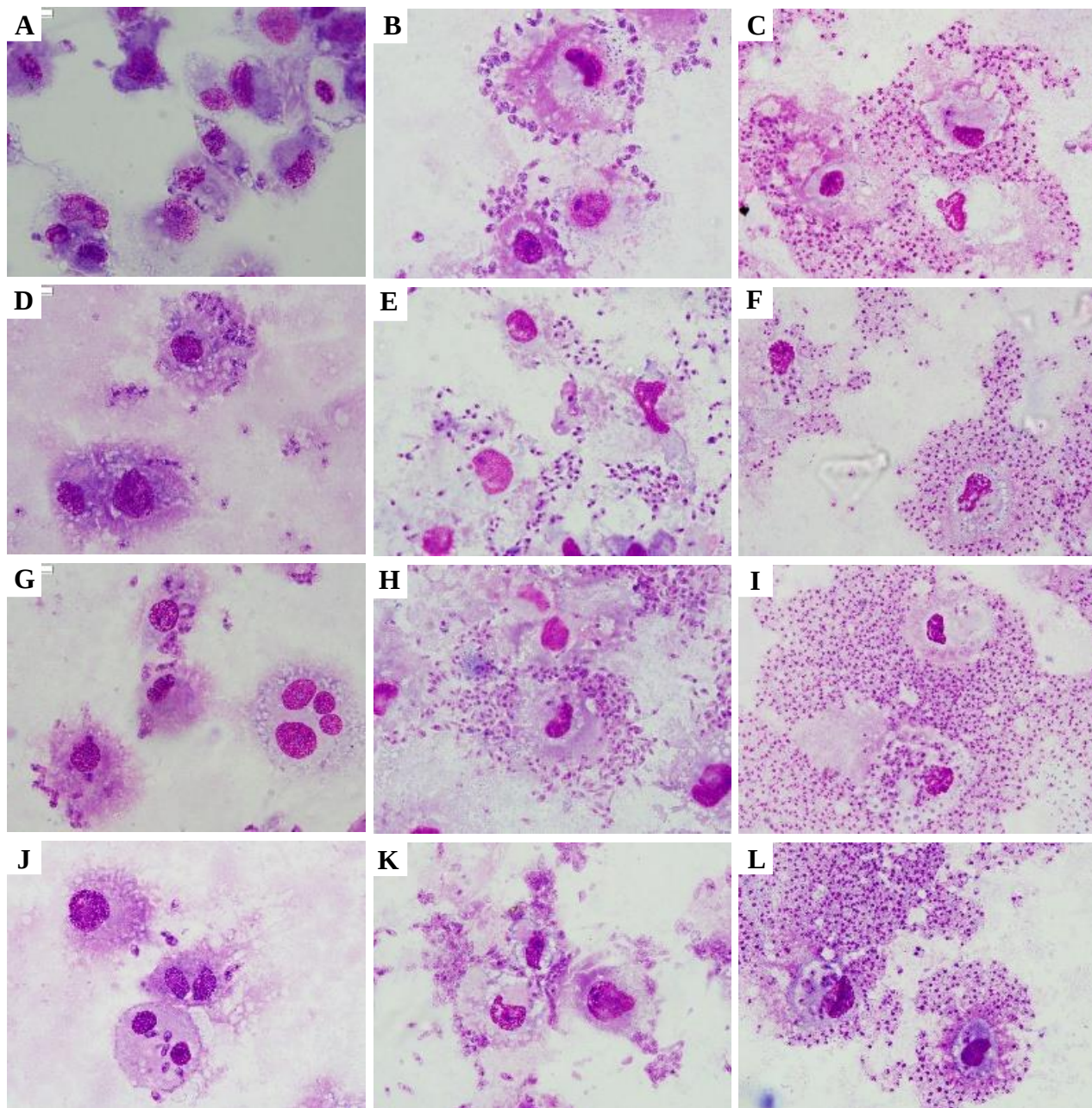


Figura 8. Amastigotes intracelulares WT (A, B y C), R-K (D, E y F), R-P (G, H y I) y R-K/P (J, K y L) en tres momentos diferentes del proceso de infección de células THP, teñidos con Giemsa (100x). Cada columna corresponde a tiempos diferentes: 24, 48 y 72 horas, vistos de izquierda a derecha.

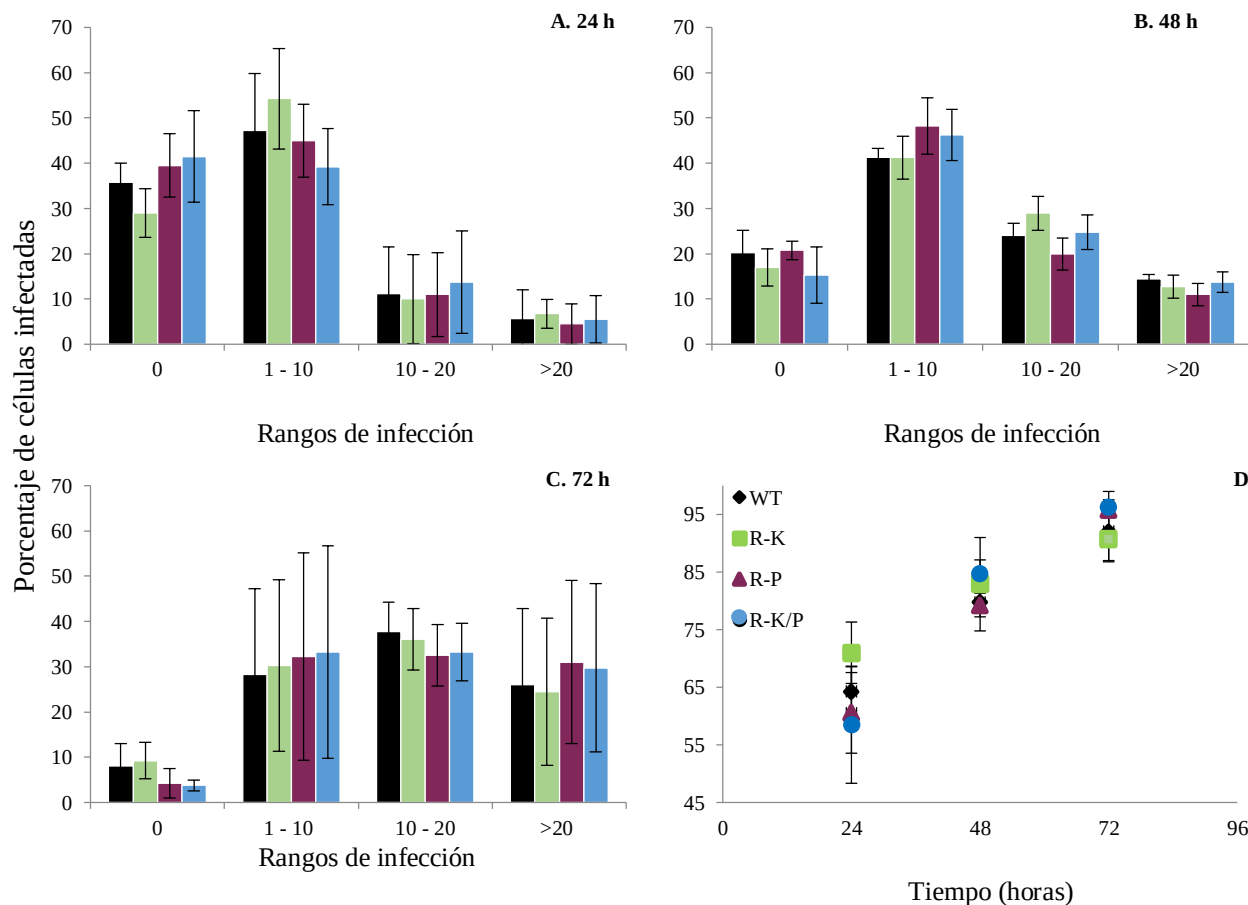


Figura 9. Rangos (A, B y C) y porcentajes (D) de infección de células THP-1 con parásitos WT, R-K, R-P y R-K/P 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas pos-infección. WT: Parásitos de tipo silvestre (wild type); R-K: Parásitos resistentes a 20 μ M de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μ M de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μ M de KTZ y PMD. Eje x (A, B y C): Rangos de infección; Eje y (A, B y C): Porcentaje de células infectadas. Eje x (D): Tiempo en horas; Eje y (D): Porcentaje de células infectadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Los valores mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes $\pm$ DE. Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

2.3.2.4. Susceptibilidad al fármaco origen: Tal como se observa en la tabla 8 (para promastigotes) y en la tabla 9 (para amastigotes axénicos e intracelulares) las cepas WT y las resistentes R-K, R-P, R-K/P mostraron diferentes grados de susceptibilidad al KTZ y al PMD. Las actividades a los fármacos en término de CI_{50} 's fueron menores para la WT (más susceptibles) que para las cepas resistentes R-K, R-P, R-K/P en todas las formas parasitarias evaluadas (Tablas 8 y 9).

Tabla 8.

Perfiles de susceptibilidad a KTZ, PMD, MTF y PM de promastigotes WT y resistentes. Un índice de resistencia mayor de 5 se interpreta como resistencia fuertemente pronunciada.

Fármaco	Actividad en promastigotes							
	$\mu M \pm DE$							
	WT		R-K		R-P		R-K/P	
	CI_{50}	IR	CI_{50}	IR	CI_{50}	IR	CI_{50}	IR
KTZ	$6,80 \pm 2,6$	NA	$43,6 \pm 18,3^{*****}$	6,4	$7,48 \pm 1,18$	1,1	$20,7 \pm 9,6^*$	3,0
PMD	$0,88 \pm 0,2$	NA	$2,3 \pm 0,3$	2,6	$10,71 \pm 1,23^{**}$	12,0	$3,61 \pm 3,2$	4,1
MTF	$7,66 \pm 1,8$	NA	$7,62 \pm 2,3$	1,0	$9,03 \pm 3,6$	1,2	$8,48 \pm 3,0$	1,1
PM	$209,6 \pm 66,1$	NA	$174,6 \pm 78,7$	0,8	$233,5 \pm 71,1$	1,1	$152,7 \pm 59,8$	0,7

Notas: Índices de resistencia calculados como se describe en la sección 2.2.6.4. CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; μM : Micromolar, DE: Desviación estándar; NA: No aplica; KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; MTF: Miltefosina; PM: Sulfato de paromomicina; WT: Parásitos de tipo silvestre (wild type); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Los resultados mostrados corresponden al promedio de tres o más experimentos independientes $\pm DE$. Las diferencias estadísticas se precisan en el texto.

En cuanto al KTZ, los parásitos de la cepa resistente R-K (que se cultivó con 20 μM de KTZ), en sus diferentes formas de vida evaluadas mostraron una actividad al KTZ con valores en

promastigotes de $CI_{50} = 43,6 \pm 18 \mu M$ de KTZ, en amastigotes axénicos de $CI_{50} = 330 \pm 21,6 \mu M$ de KTZ y en amastigotes intracelulares de $CI_{50} = 40,1 \pm 10,5 \mu M$ de KTZ. Ellas fueron entre 6 y 15 veces menos susceptibles al KTZ que la cepa WT ($p < 0,05$) la cual mostró valores de CI_{50} de $6,80 \pm 2,6 \mu M$ en promastigotes, $22,1 \pm 10,8 \mu M$ en amastigotes axénicos y $6,7 \pm 1,0 \mu M$ en amastigotes intracelulares. Los valores calculados de IR fueron mayores de 6 en las diferentes formas de vida evaluadas. (Tablas 8 y 9).

Tabla 9.

Susceptibilidad a KTZ y PMD de amastigotes axénicos e intracelulares WT y resistentes. Un índice de resistencia mayor de 5 se interpreta como resistencia fuertemente pronunciada.

Forma parasitaria	Fármaco	$\mu M \pm DE$							
		WT		R-K		R-P		R-K/P	
		CI_{50}	IR	CI_{50}	IR	CI_{50}	IR	CI_{50}	IR
Amastigotes axénicos	KTZ	$22,1 \pm 10,8$	NA	$330 \pm 21,6^{****}$	14,9	ND	ND	$105,4 \pm 66,9^{**}$	4,8
	PMD	$9,24 \pm 1,04$	NA	ND	ND	$99,8 \pm 8,4^{****}$	10,8	$8,2 \pm 1,96$	0,89
Amastigotes intracelulares	KTZ	$6,7 \pm 1,0$	NA	$40,1 \pm 10,5^*$	6,00	ND	ND	$33,5 \pm 10,0^*$	5,00
	PMD	$11,3 \pm 1,0$	NA	ND	ND	$27,1 \pm 0,3^*$	2,40	$25,8 \pm 0,5^*$	2,28

Nota: Índices de resistencia calculados como se describe en la sección 2.2.6.4. CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; μM : Micromolar, DE: Desviación estándar; NA: No aplica; ND: No determinado; KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Los resultados mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes $\pm DE$. Las diferencias estadísticas se precisan en el texto.

En lo que respecta al PMD, los parásitos de la cepa resistente R-P (que se cultivó con 20 μM de PMD), en sus diferentes formas de vida evaluadas mostraron valores en promastigotes de $CI_{50} = 10,71 \pm 1,23 \mu M$ de PMD, en amastigotes axénicos de $CI_{50} = 99,8 \pm 8,4 \mu M$ de PMD y en

amastigotes intracelulares de $CI_{50} = 27,1 \pm 0,3 \mu M$ de PMD. Ellas fueron entre 2 y 12 veces menos susceptibles al PMD que la cepa WT ($p < 0,05$) la cual mostró actividades con valores de CI_{50} de $0,88 \pm 0,2 \mu M$, $9,24 \pm 1,04 \mu M$ y $11,3 \pm 1,0 \mu M$ de PMD en promastigotes, amastigotes axénicos y en amastigotes intracelulares respectivamente. Los valores de IR en promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares fueron de 12, 10,8 y 2,4 respectivamente (Tablas 8 y 9).

Con referencia tanto al KTZ como el PMD, los parásitos de la cepa resistente R-K/P (que creció con $10 \mu M$ de KTZ y $1 \mu M$ de PMD) mostró valores de actividad en promastigotes de $CI_{50} = 20,7 \pm 9,6 \mu M$ de KTZ y CI_{50} de $3,61 \pm 3,2 \mu M$ de PMD, en amastigotes axénicos de $CI_{50} = 105,4 \pm 66,9 \mu M$ de KTZ y CI_{50} de $8,2 \pm 1,96 \mu M$ de PMD y en amastigotes intracelulares de $CI_{50} = 33,5 \pm 10,0 \mu M$ de KTZ y CI_{50} $25,8 \pm 0,5 \mu M$ de PMD. Ellas fueron entre 3 y 5 veces menos susceptibles al KTZ ($p < 0,05$) y entre 0,8 y 4 veces menos susceptibles al PMD ($p > 0,05$) que la cepa WT, que tuvo valores en promastigotes de CI_{50} $6,80 \pm 2,6 \mu M$ de KTZ, en amastigotes axénicos de $22,1 \pm 10,8 \mu M$ de KTZ y en amastigotes intracelulares de CI_{50} $6,7 \pm 1,0 \mu M$ de KTZ y valores en promastigotes de CI_{50} $0,88 \pm 0,2 \mu M$ de PMD, en amastigotes axénicos de $9,24 \pm 1,04 \mu M$ de PMD y en amastigotes intracelulares de CI_{50} $11,3 \pm 1,0 \mu M$ de PMD. Los valores de IR en promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares fueron de 3, 4,8 y 5 para el KTZ y de 4,0, 0,89 y 2,28 para el PMD (Tablas 8 y 9).

Las diferencias encontradas al comparar la CI_{50} del PMD en los parásitos R-K/P con la CI_{50} del mismo fármaco en parásitos WT, en las tres formas parasitarias evaluadas (promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

2.3.2.5. Susceptibilidad cruzada (a fármacos diferentes al fármaco origen): Con referencia a la MTF, la cepa WT y las resistentes R-K, R-P, R-K/P fueron susceptibles a este fármaco con CI_{50} 's de $7,66 \pm 1,8$, $7,62 \pm 2,3$, $9,03 \pm 3,6$ y $8,48 \pm 3,0$ μM de MTF respectivamente (Tabla 8). Los IR fueron de 1,0, 1,2 y 1,1 (Tabla 8).

Para el caso del PM, las líneas WT y resistentes (R-K, R-P, R-K/P) fueron susceptibles a este fármaco con CI_{50} de $209,6 \pm 66,1$, $174,6 \pm 78,7$, $233,5 \pm 71,1$ y $152,7 \pm 59,8$ μM respectivamente (Tabla 8). Los IR obtenidos fueron 0,8, 1,1 y 0,7 (Tabla 8).

En lo que respecta al KTZ, la cepa WT y la cepa resistente R-P mostraron CI_{50} 's de $6,80 \pm 2,6$ μM y $7,48 \pm 1,18$ μM (con un IR=1,1) (Tabla 8).

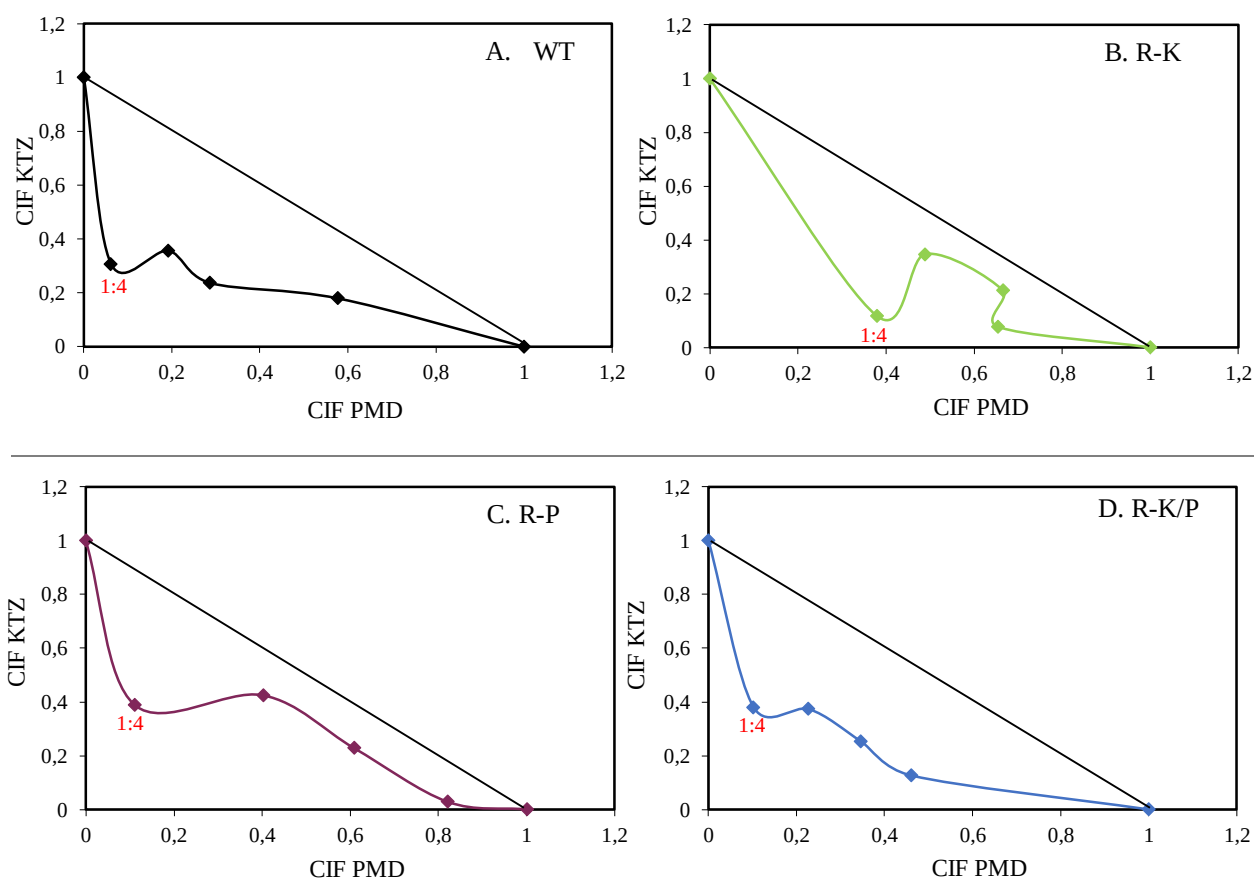
Con referencia al PMD, la cepa WT y la cepa resistente R-K mostraron CI_{50} 's de $0,88 \pm 0,2$ μM y $2,3 \pm 0,3$ μM (IR=2,6) respectivamente (Tabla 8).

No se observó ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) al comparar la susceptibilidad de las cepas WT y resistentes (R-K, R-P y R-K/P) a compuestos diferentes al/los fármacos origen.

2.3.2.6. Susceptibilidad a combinación de dos fármacos: Las ΣCIF 's para cada uno de los radios evaluados y los isobologramas representativos se muestran en las tablas 10, 11 y 12. Las interacciones se clasificaron como sinérgicas con $\Sigma CIFs \leq 0,5$, como antagónicas con $\Sigma CIFs > 4$, y como indiferentes con $\Sigma CIFs > 0,5$ y ≤ 4 . La interacción de KTZ con PMD fue indiferente en promedio, con valores de CIF 's de entre 0,55 y 1,89.

Tabla 10.

Isobologramas y concentraciones inhibitorias fraccionadas de la interacción KTZ: PMD en promastigotes WT y resistentes (R-K, R-P y R-K/P). Un $\sum \text{CIF} < 0,5$ se interpreta como interacción sinérgica, > 4 : antagonónica y $\geq 0,5$ y ≤ 4 : sumatoria o indiferente. (Experimento 1)

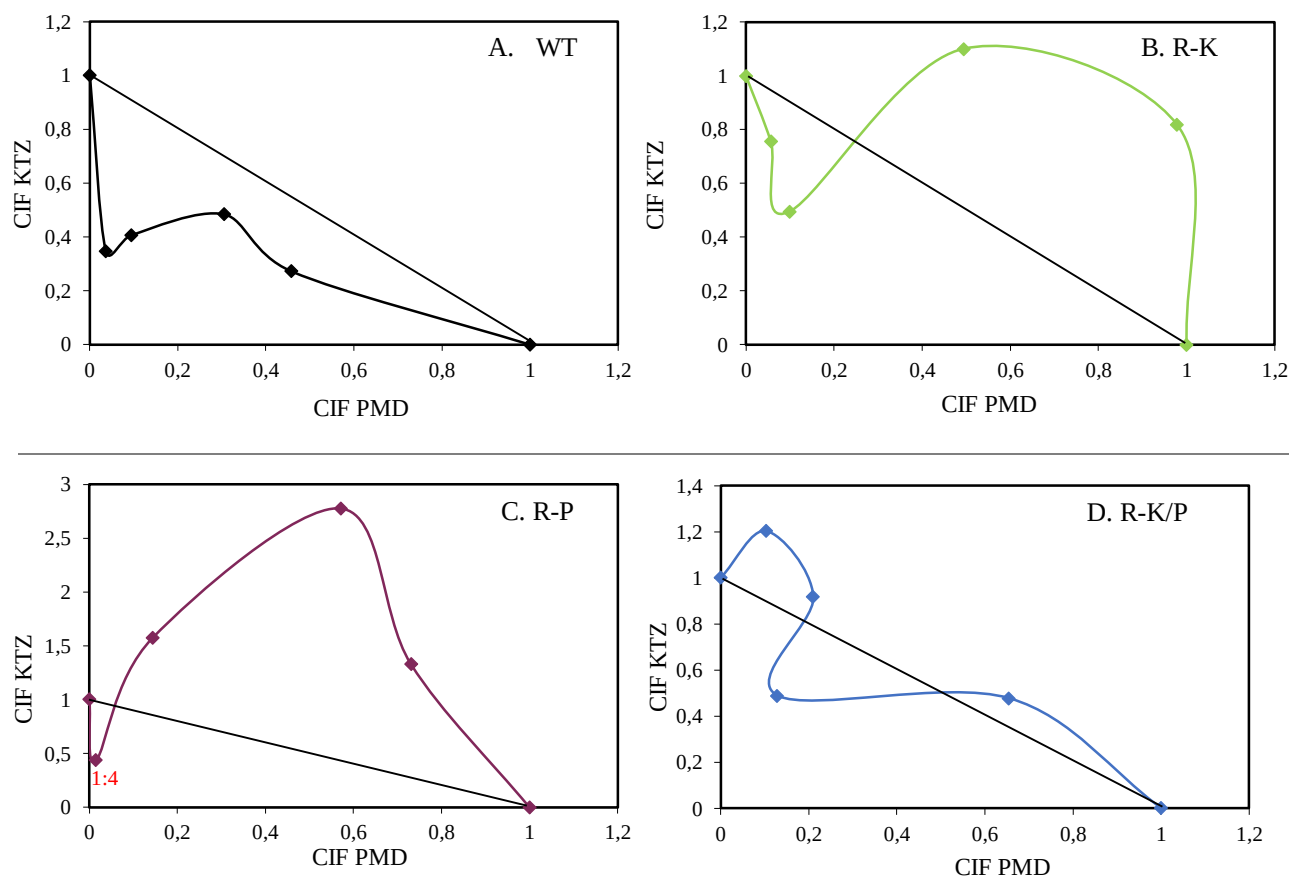


	KTZ:PMD	WT	R-K	R-P	R-K/P
$\sum \text{CIF's}$	5:0	1	1	1	1
	4:1	0,76	0,73	0,85	0,59
	3:2	0,52	0,87	0,84	0,60
	2:3	0,55	0,84	0,83	0,60
	1:4	0,37	0,49	0,49	0,48
	0:5	1	1	1	1
$\bar{X} \text{ CIF} \pm \text{DE}$		$0,55 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,2$	$0,75 \pm 0,2$	$0,57 \pm 0,1$

Nota: Concentraciones inhibitorias fraccionadas calculadas como se describe en la sección 2.2.6.6. CIF: Concentración inhibitoria fraccionada; $\bar{X}$: Promedio; DE: Desviación estándar; KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD. En negrilla se resaltan los CIF's sinérgicos.

Tabla 11.

Isobologramas y concentraciones inhibitorias fraccionadas de la interacción KTZ: PMD en promastigotes WT y resistentes (R-K, R-P y R-K/P). Un $\sum \text{CIF} < 0,5$ se interpreta como interacción sinérgica, > 4 : antagónica y $\geq 0,5$ y ≤ 4 : sumatoria o indiferente. (Experimento 2)

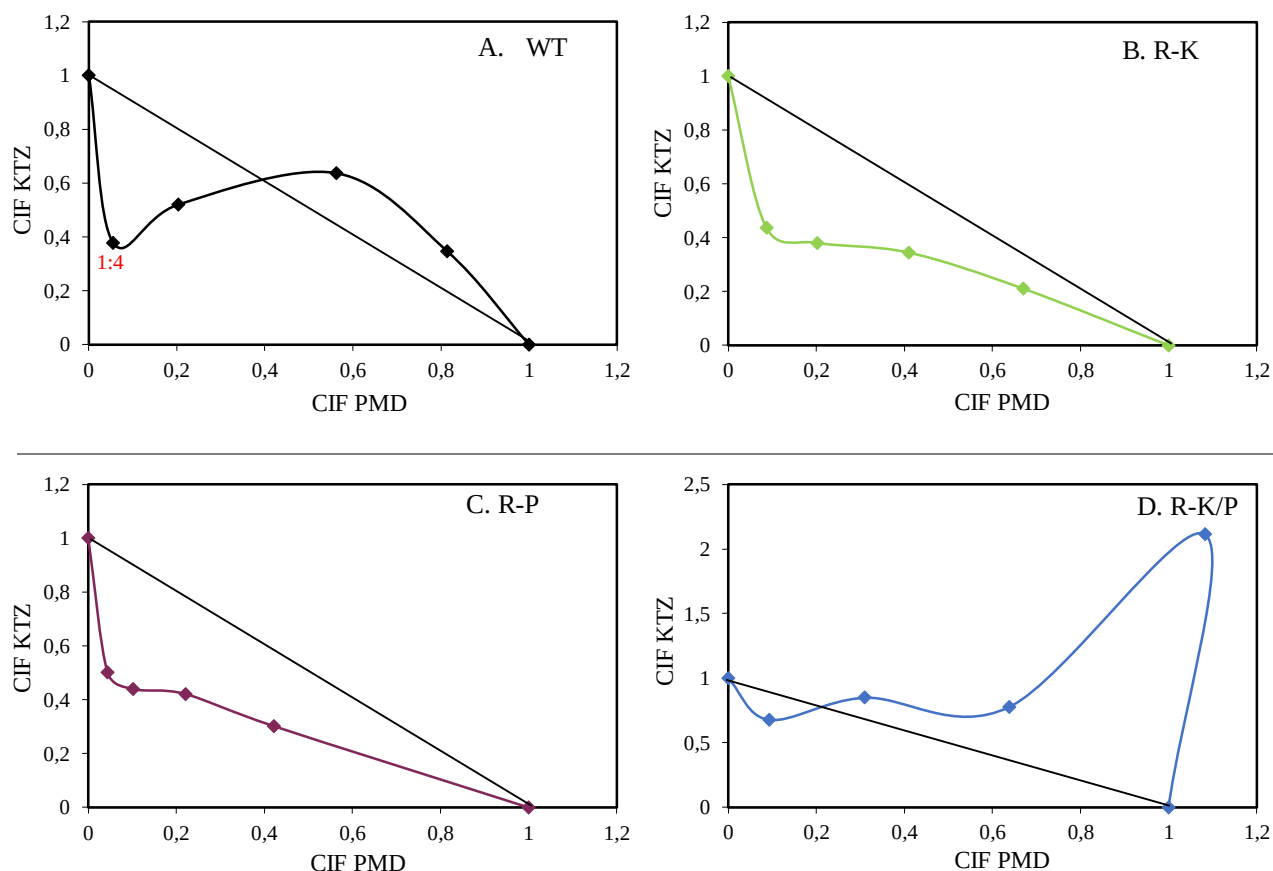


	KTZ:PMD	WT	R-K	R-P	R-K/P
$\sum \text{CIF's}$	5:0	1	1	1	1
	4:1	0,73	1,80	2,06	1,13
	3:2	0,80	1,60	3,35	0,62
	2:3	0,50	0,59	1,72	1,13
	1:4	0,38	0,81	0,45	1,31
	0:5	1	1	1	1
$\bar{X} \text{ CIF} \pm \text{DE}$		0,60 $\pm$ 0,2	1,20 $\pm$ 0,6	1,89 $\pm$ 1,2	1,05 $\pm$ 0,3

Nota: Concentraciones inhibitorias fraccionadas calculadas como se describe en la sección 2.2.6.6. CIF: Concentración inhibitoria fraccionada; $\bar{X}$: Promedio; DE: Desviación estándar; KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD. En negrilla se resaltan los CIF's sinérgicos.

Tabla 12.

Isobogramas y concentraciones inhibitorias fraccionadas de la interacción KTZ: PMD en promastigotes WT y resistentes (R-K, R-P y R-K/P). Un $\sum \text{CIF} < 0,5$ se interpreta como interacción sinérgica, > 4 : antagónica y $\geq 0,5$ y ≤ 4 : sumatoria o indiferente. (Experimento 3)



	KTZ:PMD	WT	R-K	R-P	R-K/P
$\sum \text{CIF's}$	5:0	1	1	1	1
	4:1	1,16	0,88	0,72	3,20
	3:2	1,20	0,75	0,64	1,42
	2:3	0,73	0,58	0,54	1,16
	1:4	0,43	0,52	0,55	0,77
	0:5	1	0,88	1	1
$\bar{X} \text{ CIF} \pm \text{DE}$		$0,90 \pm 0,4$	$0,69 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,09$	$1,6 \pm 1,0$

Nota: Concentraciones inhibitorias fraccionadas calculadas como se describe en la sección 2.2.6.6. CIF: Concentración inhibitoria fraccionada; $\bar{X}$: Promedio; DE: Desviación estándar; KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD.

Existió variabilidad entre los ensayos realizados (Tablas 10, 11 y 12). En el primer ensayo, la concentración inicial de KTZ y de PMD para preparar las mezclas fue de 22 y 1 μM (10: 0,45) para la cepa WT, 77 y 3,5 μM (10:0,45) para la cepa R-K, 82 y 10 μM (10:1,23) para la cepa R-P y 30 y 14 μM (10:4,67) para la cepa R-K/P. Si bien los promedios de CIF $0,5 \pm 0,1$ a $0,73 \pm 0,2$ fueron ligeramente mayores de 0,5. En el radio 1:4 se encontró interacción sinérgica entre KTZ y PMD para las cepas WT, R-K, R-P y R-K/P con sumatorias de las concentraciones inhibitorias fraccionadas de 0,37, 0,49, 0,49 y 0,48 respectivamente (Tabla 10).

En el segundo ensayo, la concentración inicial de KTZ y de PMD para preparar las mezclas fue de 10 y 1 μM (10:1) para la cepa WT, 90 y 1 μM (10:0,11) para la cepa R-K, 10 y 6 μM (10:6) para la cepa R-P y 40 y 4 μM (10:1) para la cepa R-K/P. Los promedios de CIF mostraron valores entre $0,60 \pm 0,2$ y $1,89 \pm 1,2$. En el radio 1:4, se encontraron valores menores de 0,5 (interacción sinérgica) sólo en las cepas WT y R-K (ΣCIF de 0,38 y 0,45 respectivamente). Las otras, R-K y R-K/P mostraron valores mayores a 0,5 (Tabla 11)

En el ensayo número tres, la concentración inicial de KTZ y de PMD para preparar las mezclas fue de 90 y 9 μM respectivamente (relación 10:1). Solo se halló interacción sinérgica del KTZ y el PMD para la cepa WT, en el radio 1:4, con un valor de ΣCIF de 0,43 (Tabla 12).

2.3.2.7. Estabilidad de la susceptibilidad en promastigotes: Los valores de susceptibilidad de los promastigotes mantenidos sin presión de KTZ y/o PMD durante uno, dos, tres y cinco meses variaron con respecto a los obtenidos cuando estos eran mantenidos bajo presión del fármaco (Figura 12).

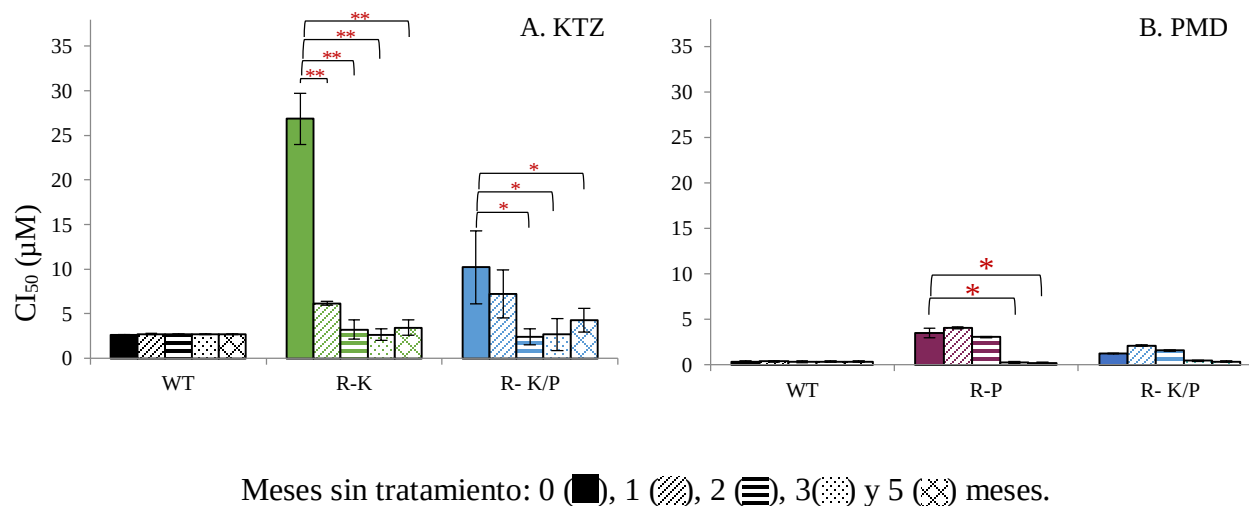


Figura 10. Concentración inhibitoria 50 de KTZ (A) y PMD (B) en promastigotes WT y resistentes mantenidos con y sin presión de medicamento por 1, 2, 3 y 5 meses. WT: Parásitos de tipo silvestre (wild type); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD. Eje x: Líneas parasitarias evaluadas; Eje y: Concentración del fármaco [μM]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Los resultados mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes $\pm$ DE. Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

Con respecto a los parásitos R-K sin presión de KTZ, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el mes 0 y los meses 1, 2, 3 y 5. Se obtuvo una CI₅₀ de $26,86 \pm 2,9$ μM de KTZ para los parásitos con presión permanente de KTZ (mes 0), mientras que para los parásitos un mes después de quitar el fármaco la CI₅₀ fue de $6,17 \pm 0,22$ μM (Figura 12A y tabla 13). El IR al final (5 meses) fue de 1,2 (Tabla 13).

En cuanto a los parásitos R-P sin presión de PMD, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el mes 0 y los meses 3 y 5. La actividad del PMD (mes 0) en parásitos con presión permanente mostró una CI₅₀ de $3,49 \pm 0,5$ μM, mientras que tres meses después de quitar el fármaco fue de $0,25 \pm 0,1$ (Figura 12B y tabla 13). El IR al final (5 meses) fue de 0,6 (Tabla 13).

Tabla 13.

Perfiles de susceptibilidad a KTZ y PMD de promastigotes WT y resistentes mantenidos con y sin presión de medicamento por 1, 2, 3 y 5 meses. Un índice de resistencia mayor de 5 se interpreta como resistencia fuertemente pronunciada.

Cepa	Tiempo (meses)	$\mu\text{M} \pm \text{DE}$			
		KTZ		PMD	
		CI ₅₀	IR	CI ₅₀	IR
WT	0	2,65 $\pm$ 0,9		0,31 $\pm$ 0,1	
	1	2,72 $\pm$ 0,4		0,38 $\pm$ 0,1	
	2	2,70 $\pm$ 0,1	NA	0,32 $\pm$ 0,1	NA
	3	2,71 $\pm$ 0,2		0,35 $\pm$ 0,2	
	5	2,79 $\pm$ 0,4		0,35 $\pm$ 0,1	
R-K	0	26,86 $\pm$ 2,9	10,1		
	1	6,17 $\pm$ 0,22**	2,3		
	2	3,21 $\pm$ 1,1**	1,2	NA	NA
	3	2,63 $\pm$ 0,7**	0,9		
	5	3,44 $\pm$ 0,9**	1,2		
R-P	0			3,49 $\pm$ 0,5	11,3
	1			4,05 $\pm$ 0,1	10,7
	2	NA	NA	3,04 $\pm$ 0,1	9,5
	3			0,25 $\pm$ 0,1*	0,7
	5			0,21 $\pm$ 0,1*	0,6
R-K/P	0	10,2 $\pm$ 4,1	3,9	1,23 $\pm$ 0,01	4,0
	1	7,19 $\pm$ 2,7	2,6	2,10 $\pm$ 0,1	5,5
	2	2,40 $\pm$ 0,9*	0,9	1,58 $\pm$ 0,4	4,9
	3	2,69 $\pm$ 1,8*	1,0	0,44 $\pm$ 0,1	1,3
	5	4,27 $\pm$ 1,3*	1,5	0,35 $\pm$ 0,1	1,0

Nota: Índices de resistencia calculados como se describe en la sección 2.2.6.4. CI₅₀: Concentración inhibitoria 50; μM : Micromolar, DE: Desviación estándar; NA: No aplica; KTZ: Ketoconazol; PMD: Isetionato de pentamidina; WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a 20 μM de KTZ; R-P: Parásitos resistentes a 20 μM de PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a 10/1 μM de KTZ/PMD. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ****p < 0,001. Los resultados mostrados corresponden al promedio de dos experimentos independientes $\pm$ DE. Las diferencias estadísticas se precisan en el texto.

Para la línea R-K/P solo aparecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la CI_{50} original ($10,2 \pm 4,1$) dos meses después de retirado el KTZ de los cultivos (Figura 12), cuando la CI_{50} disminuyó hasta $2,4 \pm 0,09$ (Figuras 12A y 12B y tabla 13). El IR al final (5 meses) fue de 1,5 (Tabla 13).

2.3.3. Caracterización de los parásitos resistentes *in vivo* (Fase 3). Los códigos de los ratones utilizados se encuentran en la tabla 3 “Distribución de ratones BALB/c de acuerdo con la línea de promastigotes con que se realizó su infección” en la sección de materiales y métodos (M&M)

2.3.3.1. Efecto de los parásitos en la infección en ratones BALB/c: El efecto de los parásitos de la cepa WT (w 1-6) y las resistentes R-K (k 1-6 y 8-12), R-P (p 1-8) y R-K/P (m 2-8) con relación a la infectividad y evolución de las lesiones se muestran en la Figura 13. Las curvas se observan truncadas en diferentes días debido a que los ratones fueron sacrificados en diferentes días post infección (mínimo 15 días después de aparecer las lesiones) exceptuando los ratones k.7 y m.1, que fueron sacrificados 85 días después de la infección, por presentar comportamiento agresivo y laceraciones similares a mordidas y cortes en el sitio de inoculación.

En general el tiempo entre la infección y la aparición de las lesiones fue variable (Figura 13) y no todos los ratones infectados desarrollaron lesiones de LC en el sitio de inoculación. Los porcentajes de ratones infectados para cada una de las líneas WT, R-K, R-P y R-K/P fue de 83,3%, 72,7%, 100% y 85,7% respectivamente (Tabla 14). Se evidenció un aumento progresivo del tamaño de las lesiones desde el momento de aparición de estas hasta el último día de su seguimiento (Figura 13).

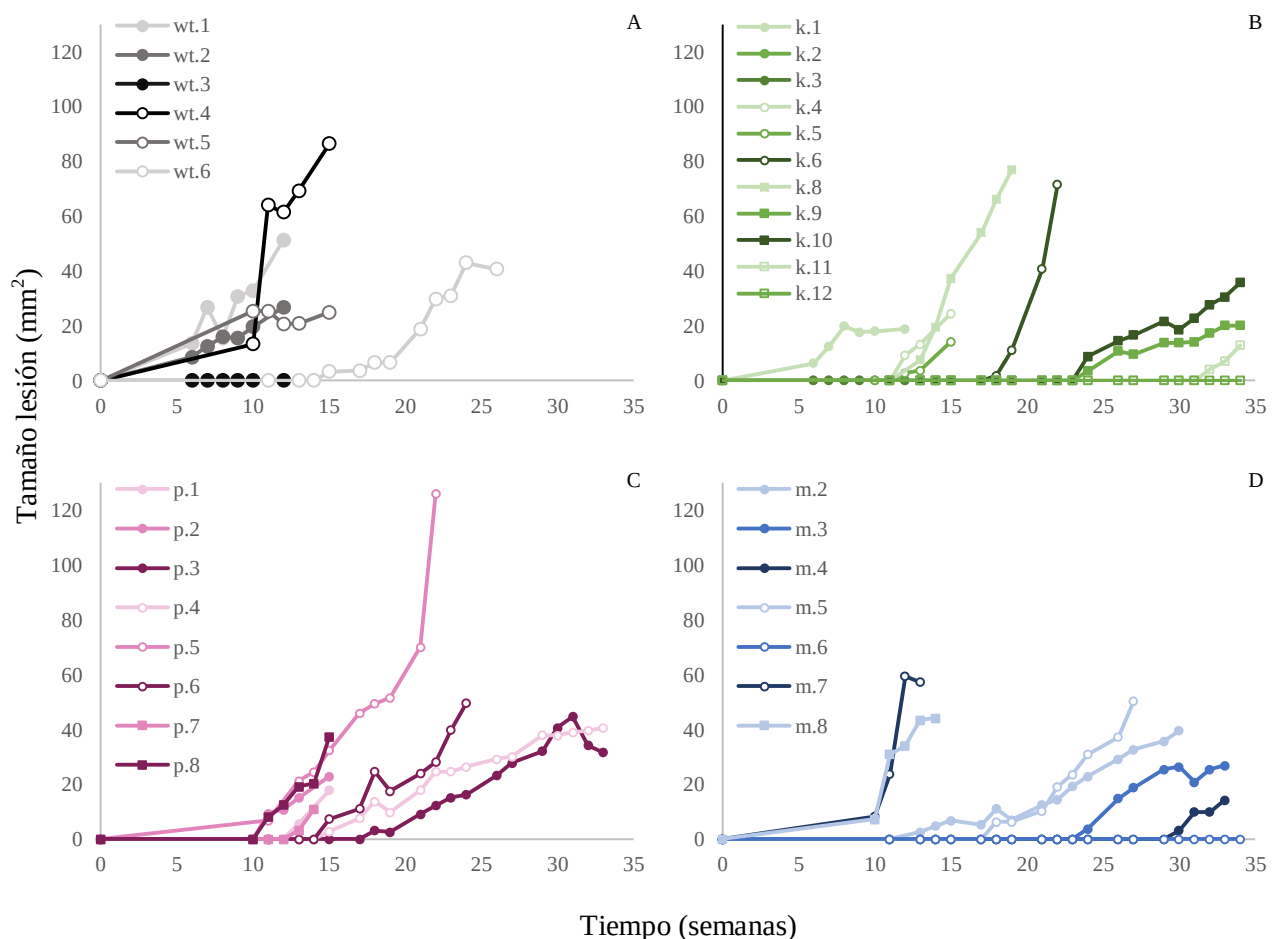


Figura 11. Evolución de la infección con parásitos de las líneas WT (A), R-K (B), R-P (C) y R-K/P (D) en ratones BALB/c. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 3. Los resultados corresponden al seguimiento individual semanal de los ratones en estudio. Eje x: Tiempo en semanas; Eje y: Tamaño del nódulo en mm². Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

Las lesiones de LC en los ratones infectados con la cepa de tipo WT fueron perceptibles macroscópicamente como una pápula de al menos 3,3 mm² de área entre 38 y 104 días después de realizada la inoculación (Figura 13); estas pápulas se transformaron en nódulos más o menos simétricos, cuyas áreas, cuatro semanas después, llegaron a medir entre 18 y 70 mm² (Figura 14).

En los 5 individuos de este grupo que desarrollaron lesiones se vio ulceración en algunos casos acompañada de eritema (Figura 13).

Tabla 14.

Porcentaje de infección de ratones BALB/c con parásitos WT, R-K, R-P y R-K/P.

Cepa	n _{total}	n _{con lesión}	n _{sin lesión}	% infección
WT	6	5	1	83,33
R-K	11	8	3	72,72
R-P	8	8	0	100
R-K/P	7	6	1	85,71

Nota: n_{total}: Número de ratones por grupo experimental; n_{con lesión}: Número de ratones por grupo experimental que desarrollaron lesiones compatibles con LC en el sitio de infección; n_{sin lesión}: Número de ratones por grupo experimental que no desarrollaron lesiones cutáneas en el sitio de inoculación. WT: Parásitos de tipo silvestre (*wild type*); R-K: Parásitos resistentes a KTZ; R-P: Parásitos resistentes a PMD; R-K/P: Parásitos resistentes a combinaciones de KTZ y PMD

En los ratones infectados con la cepa resistente R-K, la aparición de la pápula inicial se dio entre 38 y 218 días después de realizada la infección (Figura 13). La aparición de dichas pápulas dio paso a la formación de nódulos elevados que cuatro semanas después tenían un área mínima de aproximadamente 12 mm² (Figura 15). En 5 de los 8 individuos que presentaron lesión no se observó formación de úlcera hasta el día de su sacrificio y las úlceras de los otros 3 individuos no crecieron más de 6,5 mm² de área.

En el caso de los ratones inoculados con promastigotes de la línea resistente a PMD, R-P, la lesión demoró en aparecer entre 75 y 141 días (Figura 13), las pápulas iniciales se transformaron en nódulos elevados e indurados de morfología irregular, que dos semanas después midieron mínimo 11 mm² de área y que en las semanas posteriores a su aparición llegaron a tener áreas de hasta 125,9 mm² (p.5, 73 días después de la aparición de la lesión) (Figura 16). Las úlceras de los

ratones que las tuvieron se presentaron entre 1 y 9 semanas después de la aparición de los nódulos. Dos de los individuos del grupo, que fueron seguidos solo durante dos semanas después de la aparición de las lesiones no presentaron úlceras.

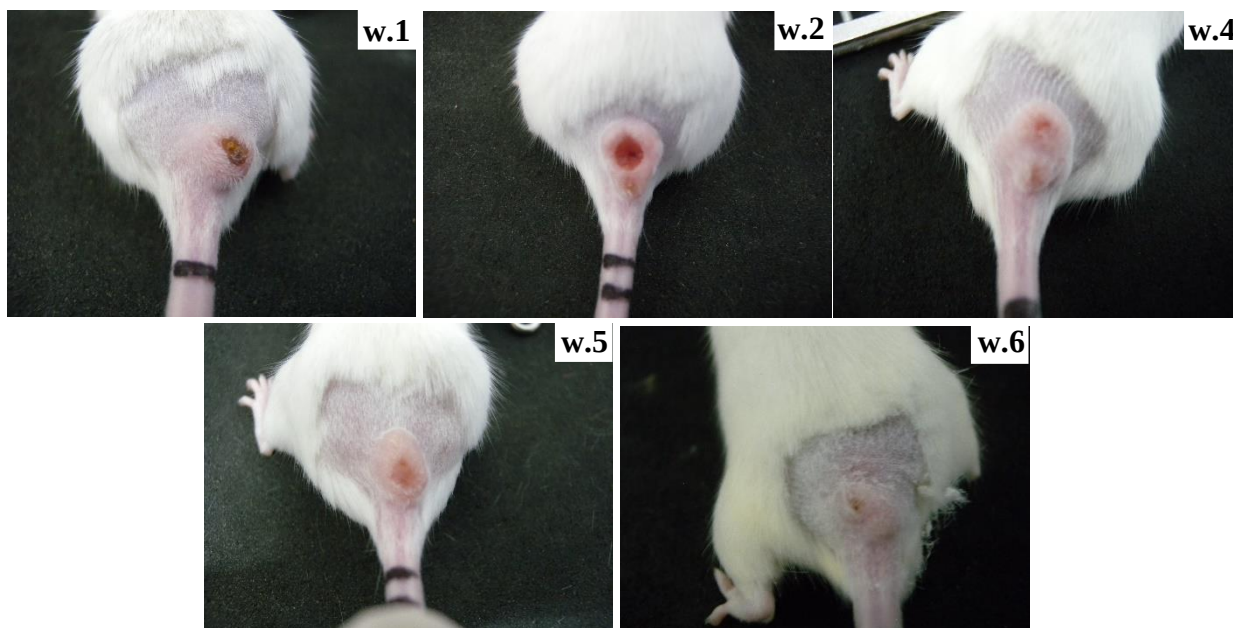


Figura 12. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos WT de L. (V) braziliensis. Las fotografías corresponden al estado de las lesiones cuatro semanas después de la aparición de estas. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 3.

Las lesiones en los ratones infectados con la línea R-K/P empezaron a evidenciarse 69-205 días pos-infección con la formación de una pequeña pápula ovoide, cuatro semanas después de la aparición de dichas lesiones, se encontraron nódulos menos elevado que los producidos por las otras tres líneas de parásitos con áreas de entre 5,3 y 57,3 mm² (Figura 17). Los ratones m.3 y m.4 no formaron úlcera, los demás presentaron ulceraciones entre 4 y 8 semanas después del primer seguimiento de tamaño del nódulo.

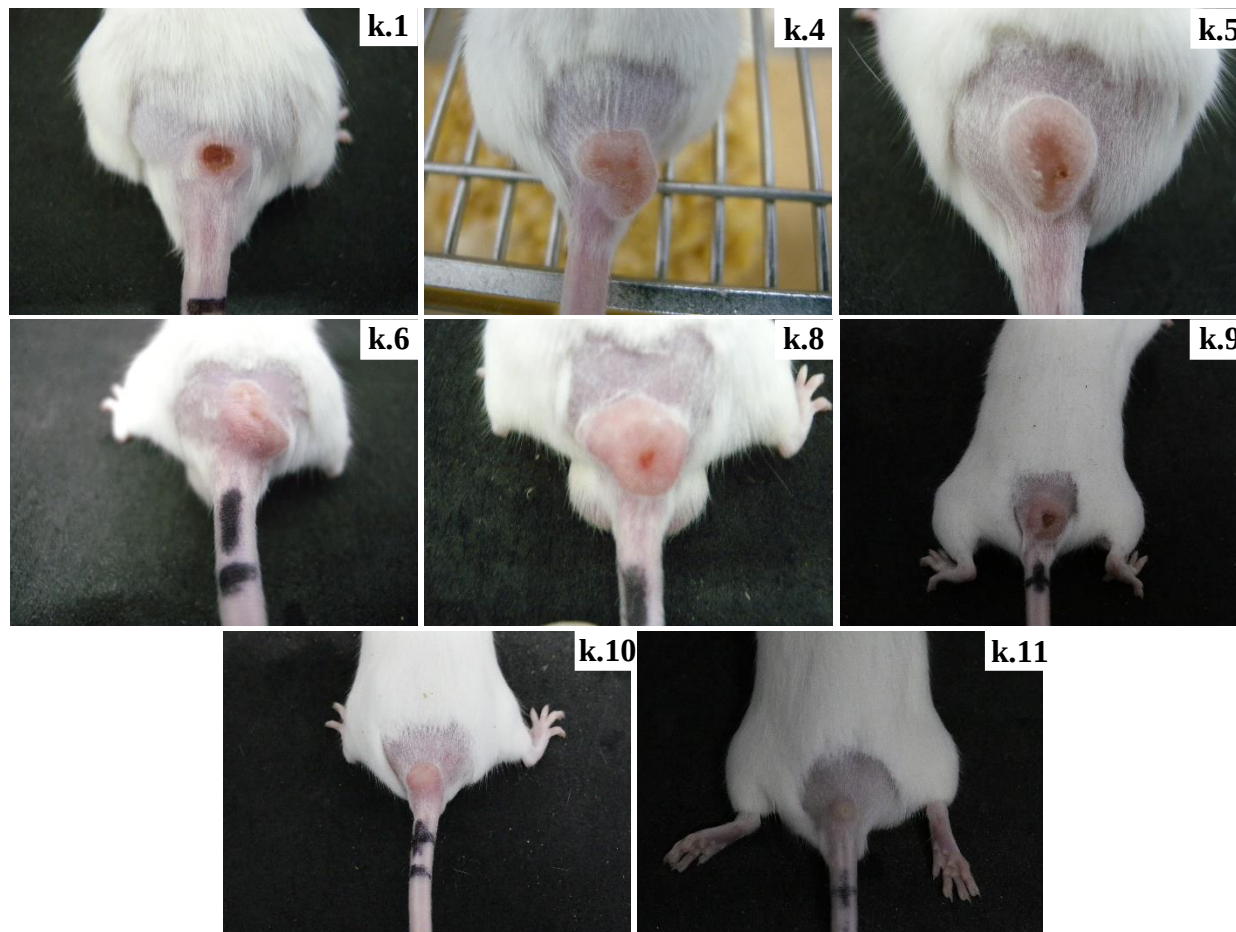


Figura 13. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos resistentes a KTZ de *L. (V) braziliensis*. Las fotografías corresponden al estado de las lesiones cuatro semanas después de la aparición de estas excepto la del ratón k.11 que representa la lesión tres semanas luego de su aparición. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 3.

En los días 11, 12, 13 y 15 se encontró que el promedio del tamaño de las lesiones de los ratones infectados con la cepa WT fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de las cepas R-K y R-P; por otra parte en el día 22 se observó que los promedio de las áreas de las lesiones de los individuos infectados con las cepas R-K y R-K/P fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) que los de la línea R-P, en este día no se comparó el tamaño de lesión de los ratones inoculados con los parásitos WT (Figura 18) .

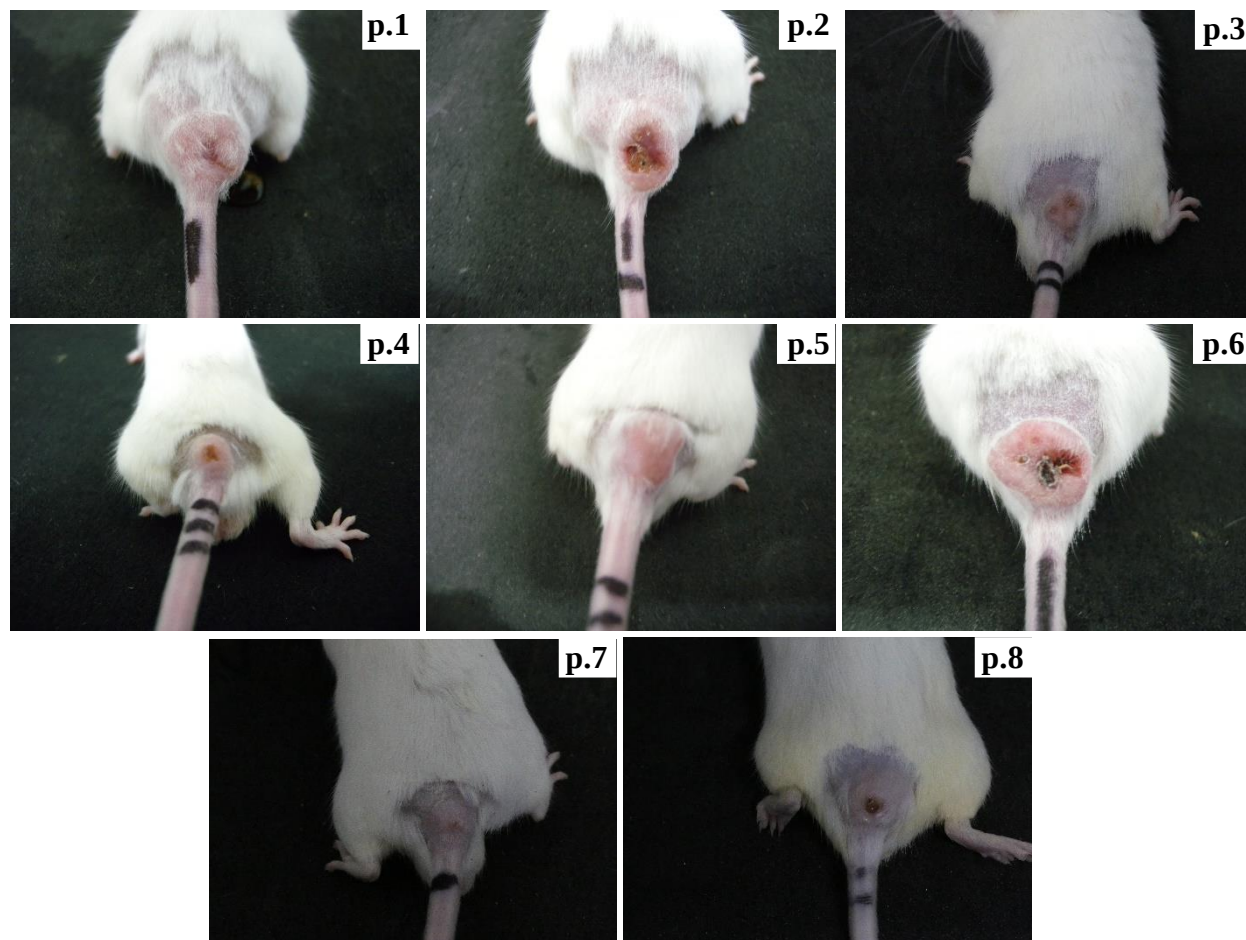


Figura 14. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos resistentes a 20 μ M de PMD de *L. (V) braziliensis*. Las fotografías corresponden al estado de las lesiones cuatro semanas después de la aparición de estas, excepto las de los ratones p.1 p.7 y p.8 que representan las lesiones dos o tres semanas luego de su aparición. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 3.

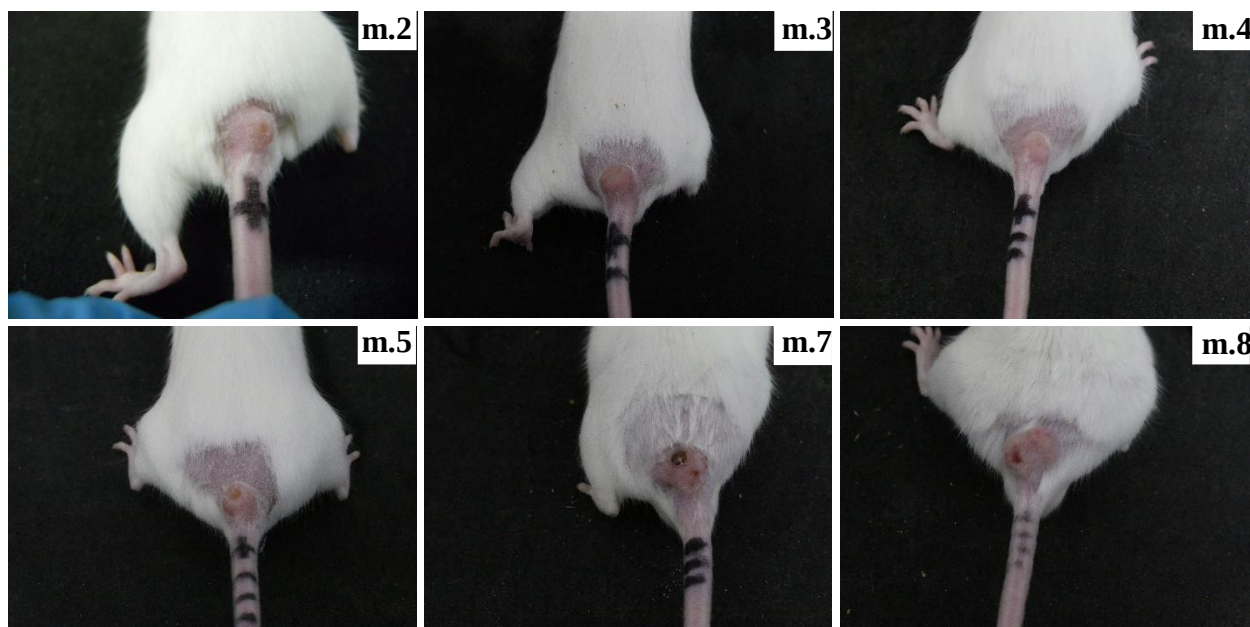


Figura 15. Lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con parásitos de *L. (V) braziliensis* resistentes a 10/1 μ M de KTZ/PMD. Las fotografías corresponden al estado de las lesiones cuatro semanas después de la aparición de estas. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 3.

En todas las improntas de las lesiones se observó microscópicamente la presencia de abundantes amastigotes extra e intracelulares, mientras que en las improntas tomadas de la piel inoculada pero no lesionada no se encontró presencia de parásitos de *Leishmania* o de células de la respuesta inflamatoria.

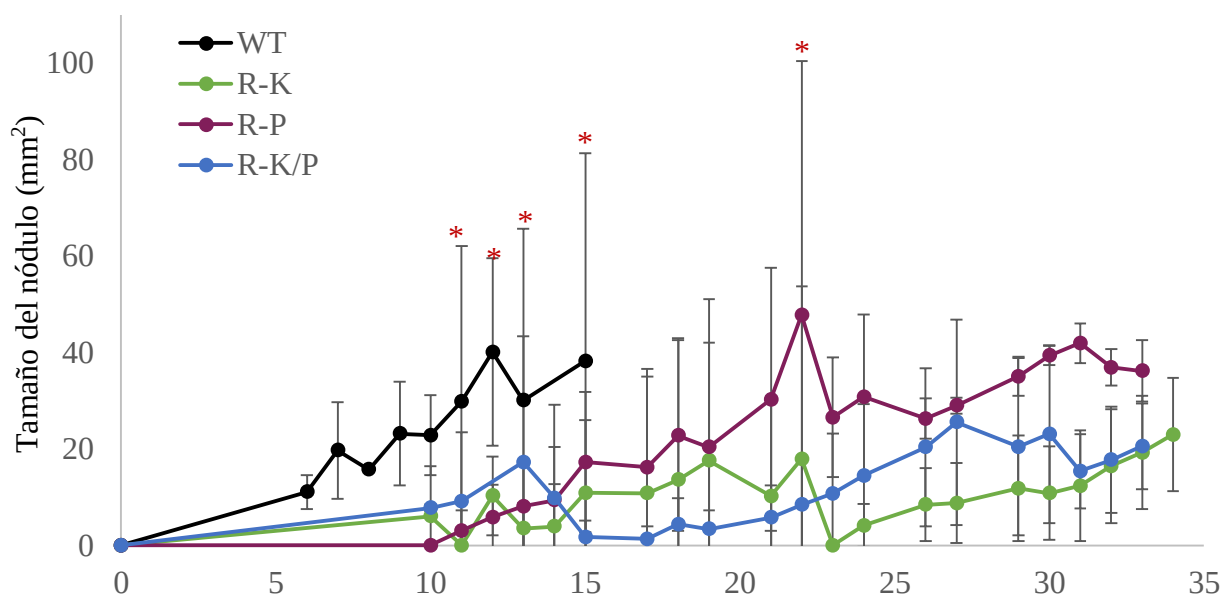


Figura 16. Evolución de la infección con parásitos de las líneas WT, R-K, R-P y R-K/P en ratones BALB/c. Eje x: Tiempo en semanas; Eje y: Tamaño del nódulo en mm². * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Los resultados corresponden al promedio del seguimiento individual semanal de los ratones de cada grupo que desarrollaron un nódulo compatible con LC en el sitio de infección (Tabla 3). Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

2.3.3.2. Determinación de los patrones histopatológicos:

2.3.3.2.1. Características histopatológicas de las lesiones: Después de la infección y el sacrificio de los ratones BALB/c se observaron cambios estructurales en la epidermis y dermis de las lesiones de ratones que desarrollaron LC (Figura 19). Se observaron diferentes patrones en la histología de la epidermis de los cuatro grupos de ratones evaluados (Figura 19).

En la epidermis de los ratones infectados con parásitos de la línea WT se observó un aumento moderado de las capas de la epidermis (acantosis), además de espongiosis moderada e hiper y paraqueratosis leves (Figuras 19A y 19B). En los ratones infectados con la cepa de parásitos resistente a KTZ solo se evidenció acantosis y espongiosis leve (Figuras 19D a 19E), mientras que en las lesiones producidas por parásitos resistentes a 20 μ M de PMD se halló moderada acantosis y leves paraqueratosis, espongiosis e hiperplasia papilar (Figura 19G a 19H).

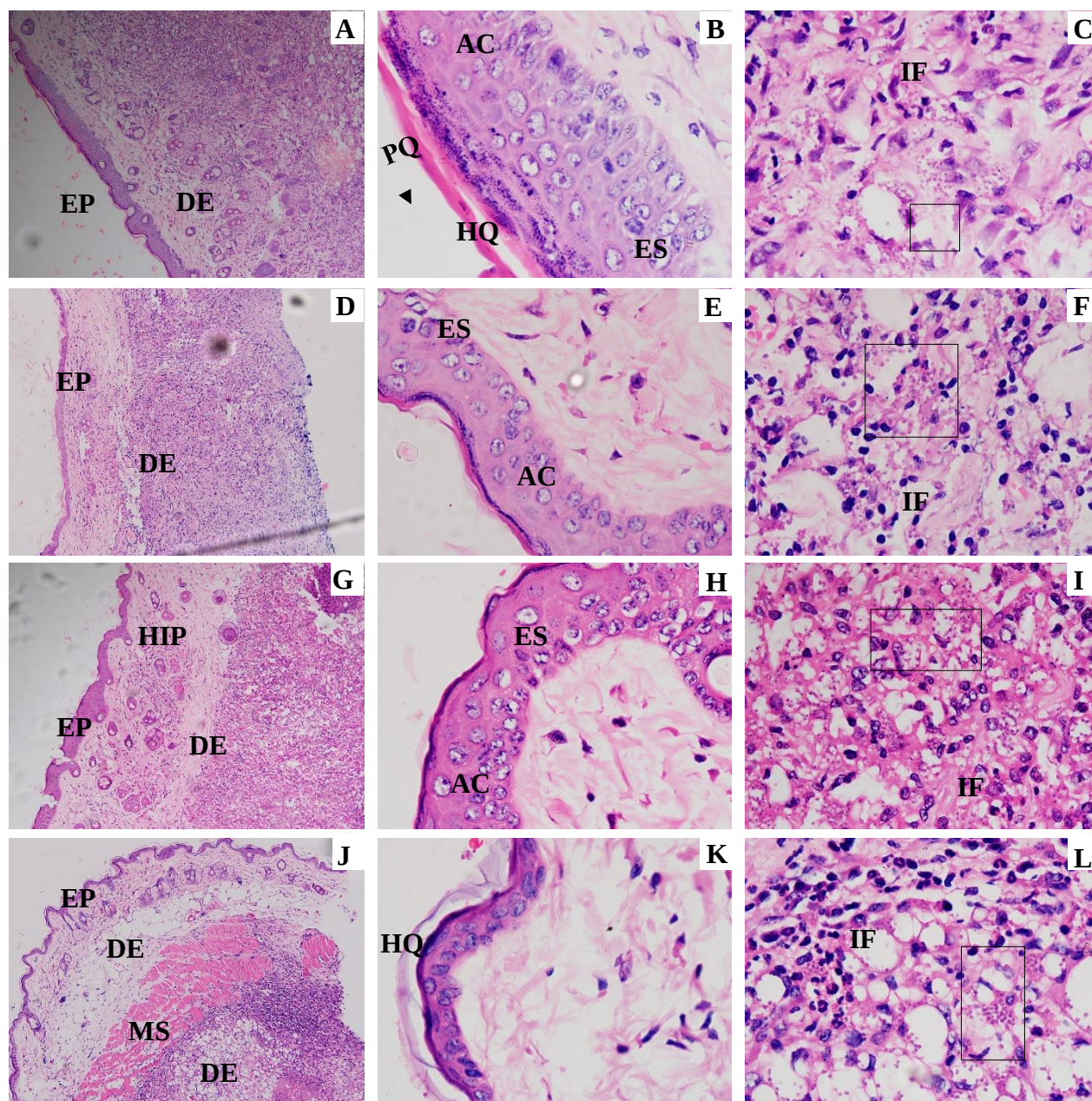


Figura 17. Características histopatológicas de piel con LC en ratones BALB/c infectados con parásitos de las líneas WT (A-C), R-20 μ M de KTZ (D-F), R-20 μ M de PMD (G-I) y R-10/1 μ M de KTZ/PMD (J-L) en biopsias teñidas con hematoxilina-eosina. Las columnas corresponden de izquierda a derecha a: piel de lesión (100x), epidermis (1000x) y dermis (1000x). EP: Epidermis; DE: Dermis; MS: Músculo; HIP: Hiperplasia papilar; HQ: Hiperqueratosis; PQ: Paraqueratosis; AC: Acantosis; ES: Espongiosis; IF: Infiltrado inflamatorio. Los recuadros negros señalan la presencia de amastigotes intracelulares. Se muestran los resultados de la histopatología de un individuo por grupo.

La única alteración en la epidermis de ratones infectados con la cepa cultivada en presencia de la combinación KTZ/PMD fue una leve hiperqueratosis (Figura 19J a 19K).

La dermis de todos los individuos analizados perdió su delimitación; en esta capa de la piel se encontró, en todos los casos, gran cantidad de amastigotes intra y extracelulares de *Leishmania* acompañados de abundante infiltrado inflamatorio mixto con predominio de macrófagos y neutrófilos (Figura 19). Además, en todas las lesiones se encontraron células gigantes multinucleadas tipo Langhans y algunos linfocitos activados (Figura 19). Se observó necrosis moderada solo en los cortes histopatológicos de las lesiones generadas por parásitos R-P.

No se observó sobreinfección, ni alteración de los folículos pilosos, glándulas sebáceas o vasos sanguíneos en ninguno de los casos.

2.3.3.2.2. *Presencia de amastigotes en órganos*: No se encontró presencia de amastigotes intracelulares o extracelulares de *Leishmania* en ninguno de los campos microscópicos observados de los órganos extraídos de ratones infectados previamente con parásitos WT, resistentes a 20 μ M de KTZ, 20 μ M de PMD y 10/1 μ M de KTZ/PMD de esta especie (Figura 20).

No hubo infiltrado inflamatorio en ninguno de los órganos procesados (Figura 20) excepto en el hígado del ratón k.1 (infectado con parásitos de la línea R-K), en el que se observaron pequeños focos inflamatorios compuestos principalmente por polimorfonucleares (Figura 20D). En los bazo se observó una ligera pérdida de la proporción entre la pulpa roja y la pulpa blanca con aumento de folículos esplénicos (Figuras 20B, 20E, 20H y 20K). La estructura y celularidad de todos los órganos evaluados se encontró preservada (Figura 20).

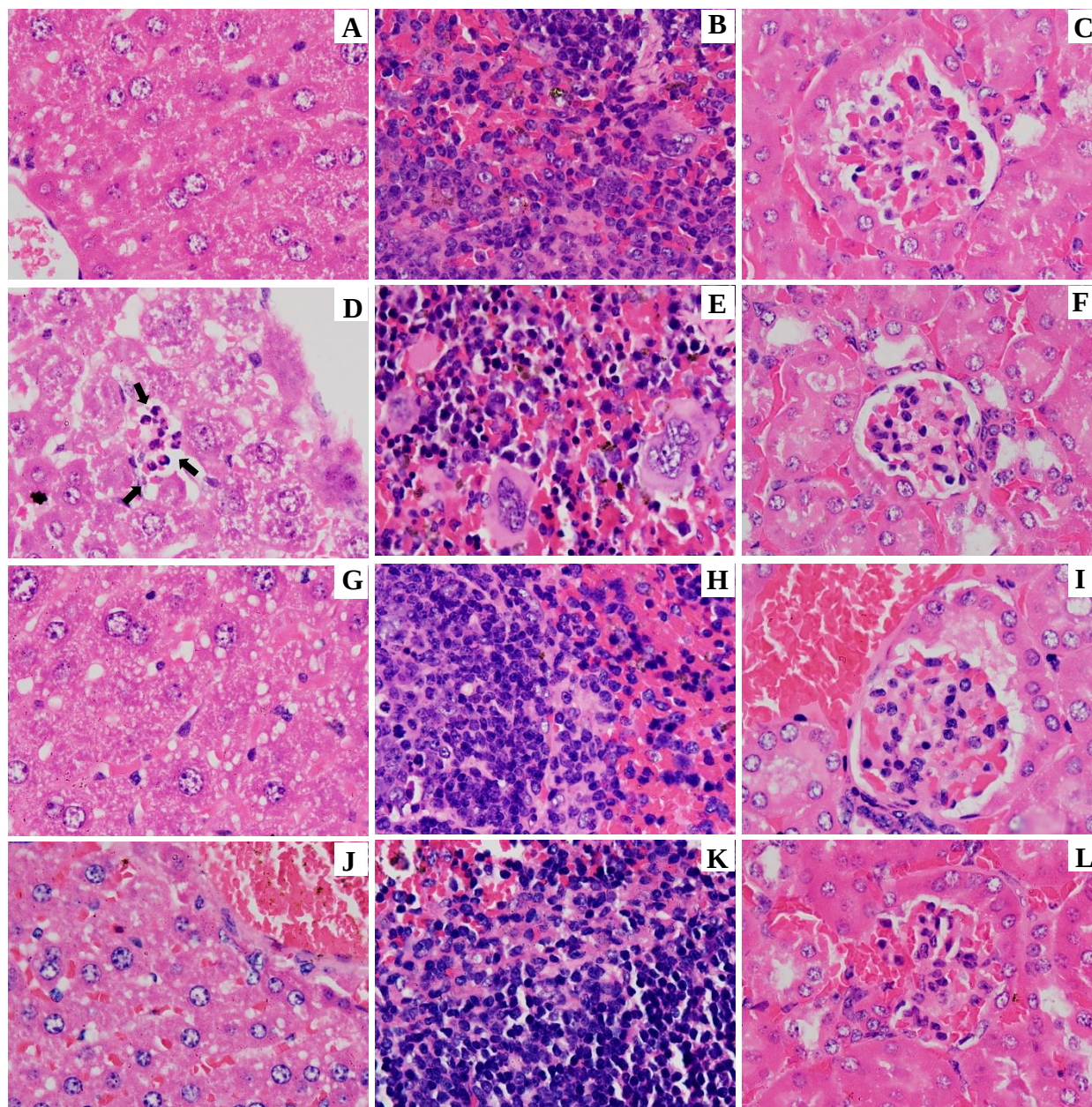


Figura 18. Características histopatológicas de órganos de ratones BALB/c infectados con parásitos de las líneas WT (A-C), R-20 μ M de KTZ (D-F), R-20 μ M de PMD (G-I) y R-10/1 μ M de KTZ/PMD en biopsias teñidas con hematoxilina-eosina (100x). Cada columna corresponde a un órgano diferente: hígado, bazo y riñón vistos de izquierda a derecha. Las flechas negras señalan un pequeño foco de inflamación con predominio de células polimorfonucleares. Se muestran los resultados de la histopatología de un individuo por grupo.

2.3.3.3. Susceptibilidad de los parásitos aislados pos-infección: Ninguno de los cultivos de promastigotes aislados de los ratones infectados con las líneas WT y resistentes (R-K, R-P y R-K/P) mostró susceptibilidad disminuida al fármaco origen (Tabla 15).

Los parásitos recuperados de la lesión del individuo w.5, infectado con promastigotes de tipo WT, tuvo CI_{50} 's de $9,4 \pm 0,7$ para el KTZ y de $2,8 \pm 1,1 \mu M$ para el PMD, valores similares a los obtenidos para la cepa WT mantenida en cultivo (CI_{50} : $6,80 \pm 2,6$ para KTZ y CI_{50} : $0,88 \pm 0,2 \mu M$ para el PMD) (Tablas 8 y 15). Las CI_{50} del KTZ y el PMD en los promastigotes provenientes de la lesión del individuo k.4 fueron $10,8 \pm 3,6$ (IR: 1,6) y $0,7 \pm 0,01$ (IR: 0,8) respectivamente (Tabla 15).

En el caso de los promastigotes provenientes de lesiones de ratones infectados con parásitos de la línea resistente a $20 \mu M$ de PMD (p.2, p.4, p.7 y p.8), las CI_{50} fueron de $11,6 \pm 1,5$, $2,1 \pm 1,0$, $6,9 \pm 3,1$ y $20,3 \pm 7,0 \mu M$ para el KTZ y de $0,2 \pm 0,1$, $1,9 \pm 0,9$, $1,2 \pm 0,4$ y $1,2 \pm 0,4$ para el PMD respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar la susceptibilidad de los parásitos R-P aislados con la susceptibilidad de los del tipo WT.

Las CI_{50} de los parásitos aislados de los individuos m.4, m.7 y m.8, infectados con parásitos R-K/P fueron de entre $14,7$ y $20,6 \mu M$ para el KTZ y de $1,3$ y $1,7$ para el PMD (Tabla 15), no muy diferentes ($p > 0,05$) que las reportados en la tabla 8 para los promastigotes WT.

Tabla 15.

Susceptibilidad a KTZ y PMD de promastigotes aislados de ratones infectados con parásitos WT y resistentes (R-K, R-P y R-K/P) pos-infección y pos-tratamiento. Un índice de resistencia mayor de 5 se interpreta como resistencia fuertemente pronunciada.

	Ratón	$\mu\text{M} \pm \text{DE}$			
		KTZ		PMD	
		CI ₅₀	IR	CI ₅₀	IR
Aislados pos-infección	w.5	9,4 $\pm$ 0,7	1,4	2,8 $\pm$ 1,1	3,2
	k.4	10,8 $\pm$ 3,6	1,6	0,7 $\pm$ 0,01	0,8
	p.2	11,6 $\pm$ 1,5	1,7	2,8 $\pm$ 1,1	3,2
	p.4	2,1 $\pm$ 1,0	0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,2
	p.7	6,9 $\pm$ 3,1	1,0	1,9 $\pm$ 0,9	2,2
	p.8	20,3 $\pm$ 7,0	3,0	1,2 $\pm$ 0,4	1,4
	m.4	19,9 $\pm$ 4,4	2,9	1,7 $\pm$ 1,1	1,9
	m.7	14,7 $\pm$ 4,1	2,1	1,3 $\pm$ 0,5	1,5
	m.8	20,6 $\pm$ 7,6	3,0	1,7 $\pm$ 0,3	1,9
Aislados pos-tratamiento	w.6	17,9 $\pm$ 6,6	2,6	0,8 $\pm$ 0,3	0,9
	k.6	33,6 $\pm$ 13*	5,0	4,3 $\pm$ 2,1*	4,9
	k.8	27,6 $\pm$ 5,0*	4,1	10,5 $\pm$ 2,4**	11,9
	p.5	19,3 $\pm$ 0,8	2,8	1,2 $\pm$ 0,1	1,4
	p.6	14,4 $\pm$ 5,7	2,1	1,7 $\pm$ 0,5	1,9
	m.5	24,4 $\pm$ 2,9*	3,5	0,6 $\pm$ 0,1	0,7

Nota: Índices de resistencia calculados dividiendo la CI₅₀ obtenida para el parásito aislado entre la CI₅₀ del fármaco en promastigotes del tipo WT reportada en la sección 2.3.2.4. CI₅₀: Concentración inhibitoria 50; μM : Micromolar, DE: Desviación estándar; IR: Índice de resistencia. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 3. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ****p < 0,001. Los resultados mostrados corresponden al promedio de al menos dos experimentos independientes $\pm$ DE.

2.3.3.4. Eficacia del tratamiento en los ratones infectados con las cepas resistentes:

2.3.3.4.1. *Evaluación de efectividad del tratamiento:* El tratamiento intralesional con la microemulsión (ME) de KTZ y PMD no fue efectivo como tratamiento de las lesiones de LC producidas por parásitos de *L. (V) braziliensis* de tipo WT y resistentes (Figuras 21 y 22). Cuatro de los seis individuos tratados con las 18 dosis del esquema propuesto en la sección 2.2.7.5 finalizaron el tratamiento con lesiones que tenían áreas entre un 39 y un 126,96 por ciento más grandes que las lesiones iniciales (Figuras 21 y 22).

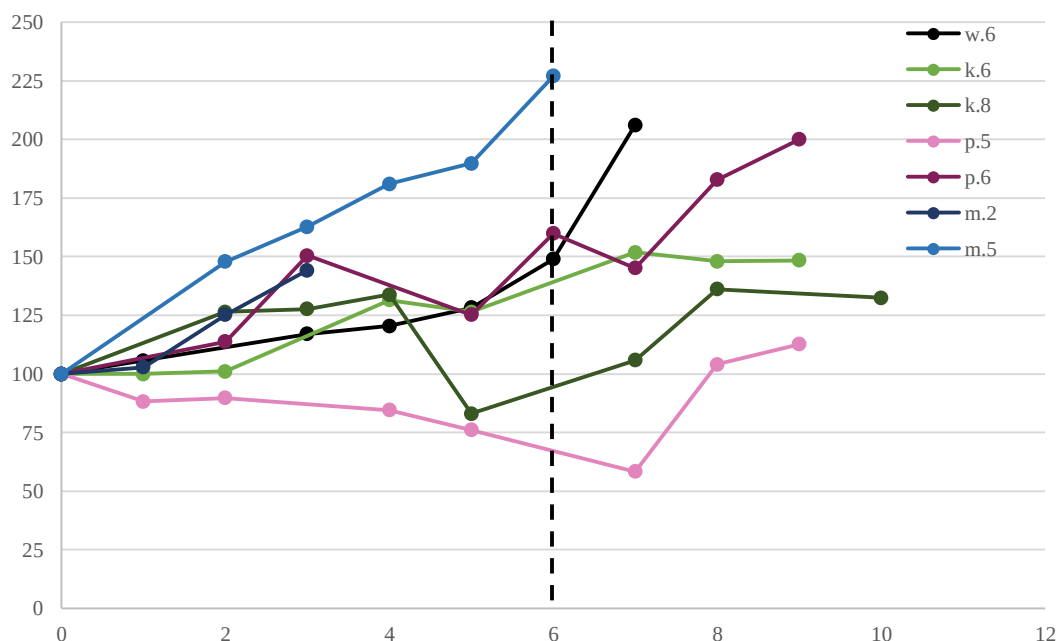


Figura 19. Efectividad del tratamiento con una microemulsión (ME) de KTZ y PMD en lesiones de LC de ratones BALB/C infectados con parásitos WT y resistentes de *L. (V) braziliensis*. Eje x: Tiempo en semanas; Eje y: % de tamaño de las lesiones. El tamaño de las lesiones fue normalizado, tomando como 100% el área del nódulo al momento de iniciar el tratamiento. La línea punteada marca el final del tratamiento; el individuo m.5 fue sacrificado inmediatamente después de que este fuera finalizado. El ratón m.2 no recibió la dosificación completa del tratamiento, le fueron aplicadas solo 9 dosis. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 4. Negro WT, verde R-K, morado R-P y azul R-K/P.

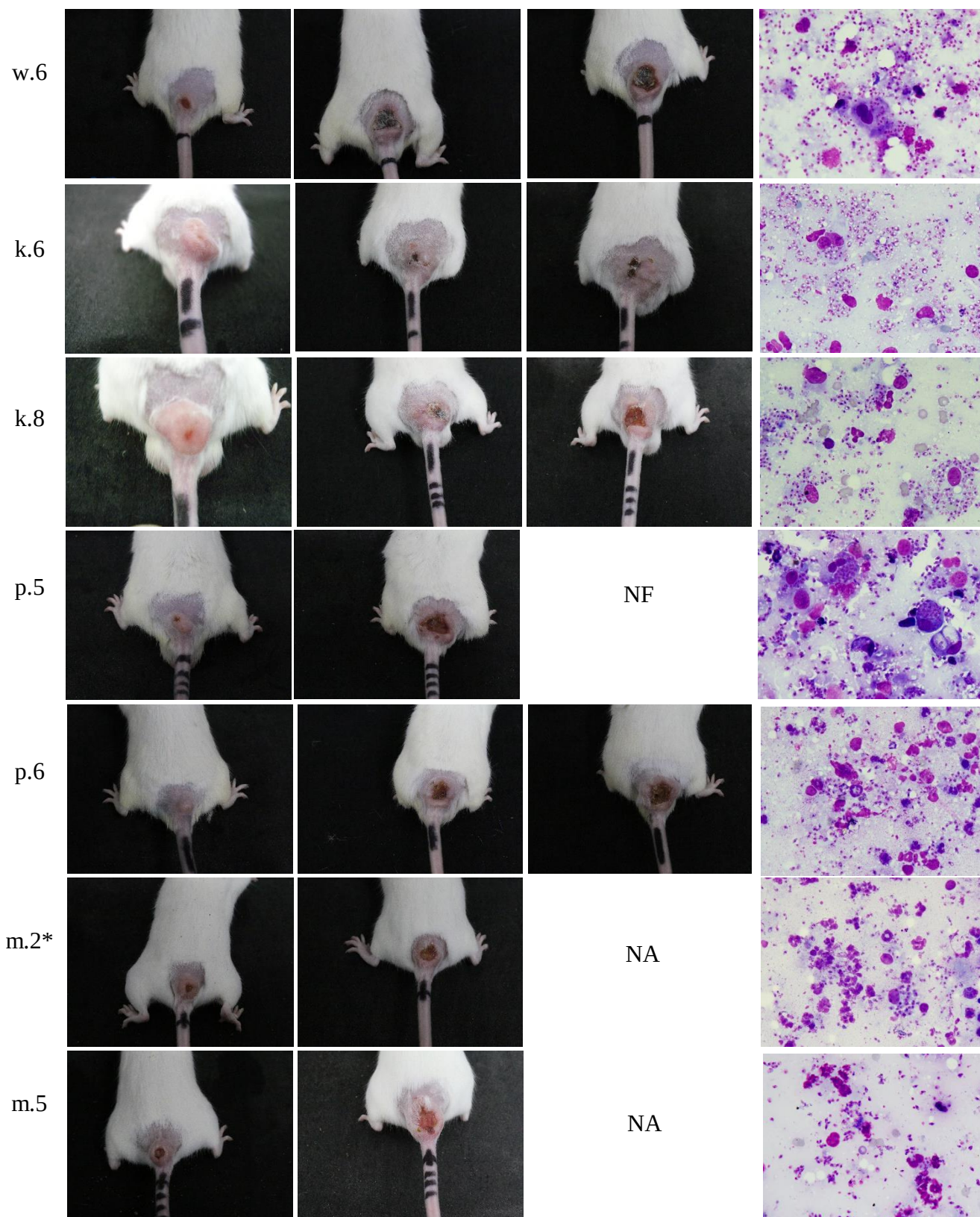


Figura 20. Efectividad del tratamiento con una microemulsión (ME) de KTZ y PMD en lesiones de LC de ratones BALB/C infectados con parásitos WT y resistentes de *L. (V) braziliensis*. La identificación de cada uno de los individuos se encuentra en la tabla 4. Cada columna de fotografías corresponde de izquierda a derecha a: lesiones al momento de iniciar el tratamiento, lesiones al finalizar el tratamiento o antes del sacrificio, lesiones dos o tres semanas postratamiento e improntas de las lesiones teñidas con Giemsa (100x). NA: No aplica; NF: Fotografía no disponible. *El ratón m.2 no recibió la dosificación completa del tratamiento, se les aplicaron solo 9 dosis del tratamiento intralesional.

Al finalizar la aplicación de las 18 dosis, las áreas de las lesiones de los ratones k.8 y p.5 fueron un 5,6 y un 32,8 por ciento menores que las de los nódulos al inicio del tratamiento (Figuras 21 y 22); sin embargo, todas las lesiones continuaron creciendo durante el periodo de seguimiento postratamiento, sobrepasando el tamaño de las lesiones en el día de aplicación de la primera dosis (Figuras 21 y 22). El ratón m.5 solo fue tratado con la mitad de las dosis propuestas, pues la lesión aumentaba gradualmente de tamaño, siendo 44,1% más grande que la lesión inicial para el día del sacrificio, además no se observó ningún tipo de mejora en el ratón m.2, infectado con la misma cepa de parásitos y tratado previamente (Figuras 21 y 22).

La aplicación de la microemulsión causó agrandamiento de la úlcera y aparente necrosis en todas las lesiones tratadas (Figura 22). En las improntas de las lesiones de todos los ratones tratados se observó microscópicamente la presencia de abundantes amastigotes tanto intracelulares como extracelulares (Figura 22).

2.3.3.4.2. Características histopatológicas de las lesiones tratadas: Después de la infección, tratamiento y sacrificio de los ratones BALB/c se observaron cambios tanto en la epidermis como en la dermis de las lesiones (Figura 23). Se observaron patrones histológicos similares en la piel lesionada de los cuatro grupos de ratones tratados con la microemulsión de KTZ y PMD y no se observó sobreinfección en ninguno de los casos (Figura 23)

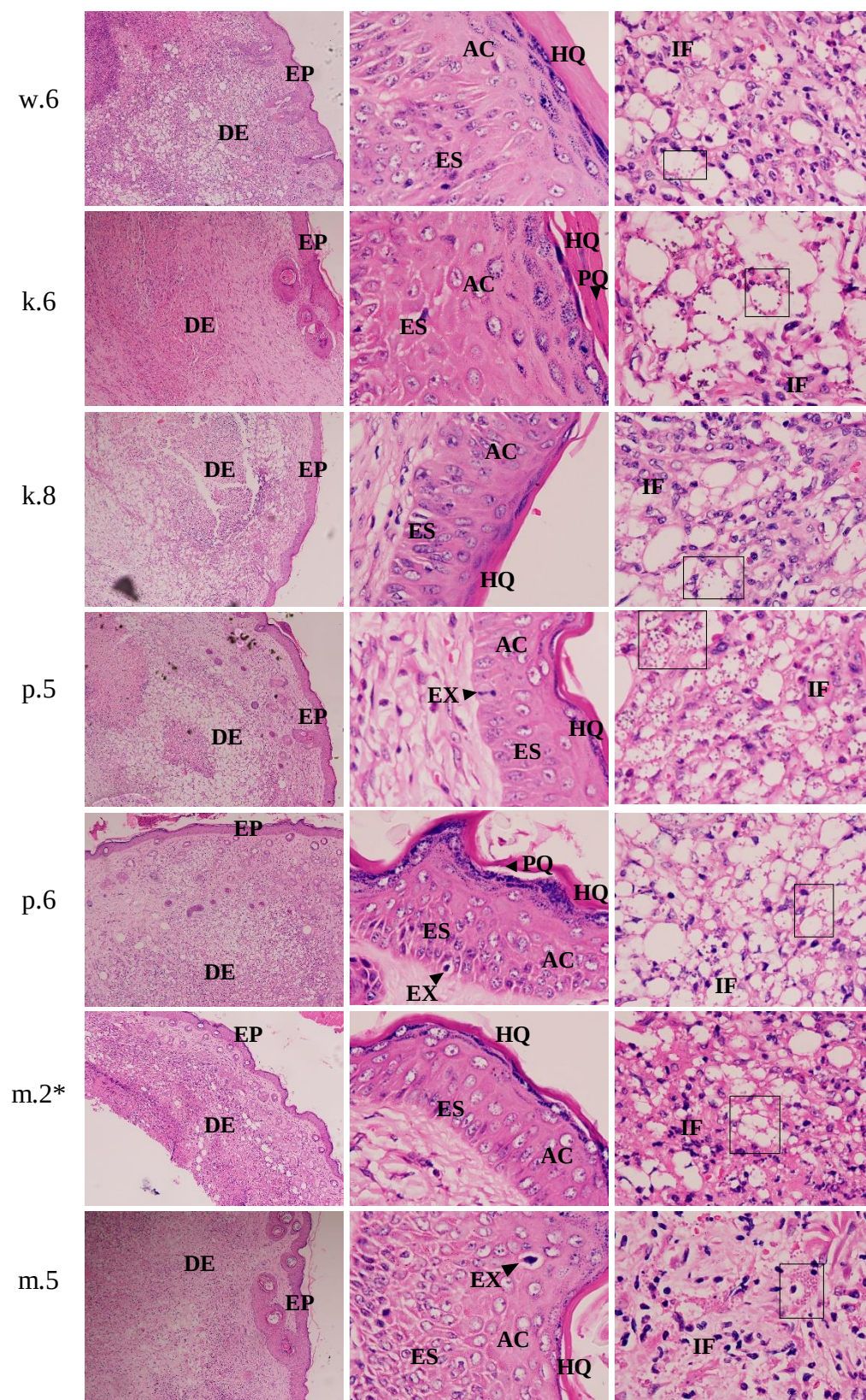


Figura 21. Características histopatológicas de lesiones de LC en ratones BALB/c tratados con una microemulsión (ME) de KTZ y PMD en biopsias teñidas con hematoxilina-eosina. Las columnas corresponden de izquierda a derecha a: piel de lesión (10x), epidermis (100x) y dermis (100x). *El ratón m.2 no recibió la dosificación completa del tratamiento, se les aplicaron solo 9 dosis del tratamiento intralesional. EP: Epidermis; DE: Dermis; HQ: Hiperqueratosis; PQ: Paraqueratosis; AC: Acantosis; ES: Espongiosis; EX: Exocitosis; IF: Infiltrado inflamatorio. Los recuadros negros señalan la presencia de amastigotes intracelulares.

En la epidermis de todos los ratones tratados se observó entre moderada y severa hiperqueratosis, acantosis y espongiosis (Figura 23). La presencia de paraqueratosis solo fue evidente en las biopsias de los ratones w.6, k.6 y p.6 (Figura 23). Solo se encontró presencia de células no propias de la epidermis, es decir exocitosis, en las lesiones ocasionadas por parásitos de las líneas R-P y R-K/P (p.5, p.6, m.2 y m.5) posteriormente tratadas con la ME de KTZ y PMD (Figura 23).

La dermis de todos los individuos analizados perdió su delimitación; en esta capa de la piel se encontró, en todos los casos, cantidad abundante de amastigotes intra y extracelulares de *Leishmania* acompañados de infiltrado inflamatorio mixto con predominio de macrófagos y neutrófilos (Figura 23). La cantidad de linfocitos presentes en el infiltrado inflamatorio fue mayor en la dermis de los ratones infectados con la cepa resistente a la combinación de KTZ y PMD que en los infectados con parásitos de otra línea, además, en las biopsias de estos dos ratones se hallaron algunos plasmocitos (Figura 23). En todas las lesiones se encontró cantidad moderada de células gigantes multinucleadas tipo Langhans (Figura 23). Se observó necrosis moderada en los cortes histopatológicos de las lesiones generadas y tratadas en los individuos w.6 y k.8 y se evidenció extravasación de glóbulos rojos en los ratones tratados infectados previamente con parásitos resistentes a 20 μ M de KTZ.

2.3.3.4.3. *Susceptibilidad de los parásitos aislados pos-tratamiento*: No en todos los cultivos de promastigotes obtenidos de los ratones infectados con las líneas WT y resistentes tratados con la ME de KTZ y PMD se observó disminución significativa ($p > 0,05$) de la susceptibilidad a estos dos fármacos (Tabla 15).

Los parásitos recuperados de la lesión del individuo w.6, infectado con promastigotes de tipo WT, tratado con las 18 dosis de la ME y sacrificado dos semanas después de que finalizó el tratamiento, tuvo CI_{50} 's de $17,9 \pm 6,6$ para el KTZ y de $0,8 \pm 0,3 \mu M$ para el PMD, valores similares a los obtenidos para la cepa WT mantenida en cultivo (CI_{50} : $6,80 \pm 2,6$ para KTZ y CI_{50} : $0,88 \pm 0,2 \mu M$ para el PMD) (Tablas 8 y 15).

En el caso de los promastigotes provenientes de lesiones de ratones infectados con parásitos de la línea R-P (p.5 y p.6), tratados con una ME de KTZ y PMD y sacrificados 3 semanas después de la aplicación de la última dosis, las CI_{50} fueron de $19,3 \pm 0,8$ y $14,4 \pm 5,7 \mu M$ para el KTZ y de $1,2 \pm 0,1$ y $1,7 \pm 0,5 \mu M$ para el PMD respectivamente; no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar la susceptibilidad de estos parásitos con la susceptibilidad de los promastigotes del tipo WT (Tabla 15).

Las CI_{50} del KTZ y el PMD en los promastigotes provenientes de las lesiones de los individuos infectados con los parásitos resistentes a $20 \mu M$ de KTZ (R-K) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los reportados en la tabla 8 para los parásitos WT. Los aislados de los ratones k.6 y k.8, que recibieron el esquema de tratamiento completo con una ME de KTZ y PMD y se sacrificaron 3 y 4 semanas después de finalizado el mismo, tuvieron CI_{50} 's de $33,6 \pm 13$ (IR: 5) y $27,6 \pm 5,0$ (IR: 4,1) μM para el KTZ y CI_{50} 's de $4,3 \pm 2,1$ (IR: 4,9) y $10,5 \pm 2,4$ (IR: 11,9) μM para el PMD (Tabla 15).

Las CI_{50} 's de los parásitos aislados del individuo m.5, infectado con parásitos R-K/P, tratado con la ME de KTZ y PMD y sacrificado inmediatamente después de finalizar el tratamiento fueron de $24,4 \pm 2,9$ para el KTZ y de $0,6 \pm 0,1$ para el PMD (Tabla 15). Los IR's calculados fueron 3,5 y 0,7 respectivamente (Tabla 15).

2.4 Discusión

La búsqueda de tratamientos orientados a la disminución de los efectos adversos y la falla terapéutica (FT) ocasionadas por los esquemas de tratamiento anti-*Leishmania* actuales, es uno de los principales retos de la investigación en leishmaniasis (World Health Organization, 2012). Se ha reportado FT en tratamientos con todos los medicamentos anti-*Leishmania* de uso típico: Sb^V, MTF, AmB y PMD, principalmente en casos de LV relacionados con transmisión antroponótica y/o coinfección con VIH, pero también en áreas geográficas endémicas de LC y LMC (Lachaud et al., 2009; Lira et al., 1999; Mans et al., 2016; Obonaga et al., 2014; Ostyn et al., 2014; Sundar et al., 2000). Las diferencias en la susceptibilidad de los parásitos a los fármacos (natural o adquirida, inter o intra especies) es uno de las principales desencadenantes de la FT y ya han sido observadas en parásitos aislados de pacientes infectados antes y después del tratamiento (Fernández et al., 2014; Ginouvès et al., 2017; Rojas et al., 2006; Srivastava et al., 2017).

Dos opciones prometedoras de tratamiento, a corto tiempo, son la combinación de fármacos y el reposicionamiento y/o reformulación de los mismos (Charlton et al., 2018; World Health Organization, 2012). En un trabajo previo, nuestro grupo demostró la interacción sinérgica *in vitro* de dos fármacos: KTZ y PMD, los cuales fueron reformulados de su uso oral e intramuscular a un único tratamiento tópico (Carreño y Escobar, 2019). Queriendo adelantarnos a lo que pudiera suceder en términos de resistencia en caso que una formulación conteniendo estos fármacos fuera

utilizada en el tratamiento de lesiones de LC, se generaron y caracterizaron cepas de *Leishmania* resistentes a ambos fármacos de la combinación sinérgica. La generación de resistencia *in vitro* ha sido una herramienta interesante para elucidar los mecanismos involucrados en resistencia: blancos y/o biomarcadores (Rivas y Gil, 2017) determinando además el riesgo potencial y las características de la resistencia a fármacos en parásitos del género *Leishmania*.

En este trabajo se generaron cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes a KTZ y PMD individualmente y a KTZ/PMD en combinación mediante el método de adaptación por etapas (sección M&M). Esta metodología ha sido empleada por otros autores que han conseguido generar resistencia a medicamentos en promastigotes tanto de *L. (V.) braziliensis* como de otras especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* (Andrade-Neto et al., 2012; Gamarro et al., 1994; García-Hernández et al., 2012; Liarte y Murta, 2010; A. Mukherjee, Padmanabhan, Sahani, Barrett, y Madhubala, 2006; Regli et al., 2018; Turner et al., 2015).

El tiempo que tardaron los parásitos para adaptarse a la concentración máxima posible del (los) fármaco(s) fue de 9 meses en la cepa combinada (KTZ: PMD a 10:1 μM , IR's: 3 y 4,1) y de 8 y 11 meses en las cepas con resistencia individual a KTZ (20 μM , IR: 6,4) y PMD (20 μM , IR: 12) respectivamente. Es importante decir que los parásitos con resistencia combinada no pudieron sobrevivir (en el tiempo que duró el estudio) a las concentraciones máximas alcanzadas por los parásitos con resistencia a un solo fármaco y que el tiempo requerido para generar resistencia individual a 10 μM de KTZ y 1 μM de PMD (concentraciones máximas para la cepa R-K/P) fue apenas de 4 meses. Lo anterior sugiere que la combinación KTZ/PMD retrasa la aparición experimental de resistencia en *L. (V.) braziliensis*.

El tiempo de generación de la resistencia (considerado como el tiempo que tardan los parásitos en adaptarse a una concentración del fármaco que normalmente afectaría su supervivencia) debería ser un factor a tener en cuenta al momento de proponer un esquema de tratamiento anti-*Leishmania*, sin embargo, no es la única variable a considerar, ya que el desenlace de los tratamientos es el resultado de la interacción de varios factores, dependientes del fármaco (farmacocinética/farmacodinamia), de la especie de parásitos involucrada, de las características y estado inmune del huésped etc. (Ponte-Sucre et al., 2017). A pesar de esto, conocer qué combinaciones de fármacos hacen menos probable el desarrollo de resistencia farmacológica *in vitro* podría orientar la formulación y aplicación de nuevos tratamientos anti-*Leishmania*.

En estudios *in vitro*, el tiempo de generación de resistencia y la concentración máxima de fármacos empleados varía dependiendo del o los fármacos, de la especie y estadio del parásito en estudio e incluso del protocolo metodológico usado; por ejemplo, se encontró que el tiempo de generación de resistencia a tartrato de antimonio y potasio (Sb^{III}) en *L. (V) guyanensis*, *L. (V) braziliensis*, *L. (L) amazonensis* y *L. infantum* fue de 18 meses, alcanzando dosis máximas en cultivo de 4 μM de Sb^{III} e índices de resistencia de entre 4 y 40 (Liarte y Murta, 2010). En *L. donovani* el tiempo de generación de resistencia fue de 24 semanas (5,6 meses) alcanzando una concentración máxima de 40 μM de MTF (IR: 15) en cultivo (Seifert et al., 2003).

Los niveles de resistencia máximos (considerado este como la máxima concentración de fármaco [μM] que permitió un crecimiento igual que los parásitos WT) a PMD y KTZ solos, alcanzados por las cepas generadas en este trabajo, son comparables a los logrados en estudios anteriores (Andrade-Neto et al., 2012; Sereno y Lemesre, 1997). Sereno y Lemesre (1997) generaron una cepa de *L. (L.) mexicana* resistente a 20 μM de PMD y Andrade-Neto et al (2012) lograron promastigotes de *L. (L.) amazonensis* resistentes hasta 16 μM de KTZ.

La generación de promastigotes resistentes a concentraciones de PMD mayores de 20 μM ha sido posible en otras especies, este es el caso de *L. donovani* para la que se obtuvieron parásitos creciendo en cultivos con 40 μM de PMD (Basselin et al., 1997) y de *L. (L) mexicana* que creció en presencia de hasta 30 μM de PMD (Basselin et al., 2002).

No existen reportes de trabajos previos que hayan generado cepas de *Leishmania* resistentes a la combinación de KTZ y PMD; sin embargo, en el 2012, García-Hernández y colaboradores, lograron generar líneas de *L. donovani* resistentes a combinaciones de fármacos anti-*Leishmania* de uso común que han sido caracterizadas posteriormente; las combinaciones para las cuales se logró dicha resistencia fueron AmB+MTF (IR's: 2 para AmB y 3 para MTF), AmB+PM (IR's: 2 para AmB y 2,12 para PM), AmB+Sb^{III} (IR's: 2 para AmB y 2,05 para Sb^{III}), MTF+PM (IR's: 4,4 para MTF y 14,3 para PM) y Sb^{III}+PM (IR's: 21 para Sb^{III} y 30,2 para PM) (Berg et al., 2015; García-Hernández, Gómez-Pérez, Castanys, y Gamarro, 2015; García-Hernández et al., 2012).

Resultados publicados anteriormente han evidenciado que además de los cambios en la susceptibilidad a los fármacos involucrados (discutido más adelante), la presión constante de medicamentos en cultivos de *Leishmania* podría tener impacto en propiedades biológicas importantes para el fitness del parásito, mejorando por ejemplo la capacidad de los amastigotes para sobrevivir dentro de los macrófagos (García-Hernández et al., 2015) o disminuyendo su capacidad de diferenciación de amastigotes a promastigotes (Serenio et al., 2001)

Se observó que los parásitos con susceptibilidad disminuida a KTZ y PMD se adaptaron satisfactoriamente a las máximas concentraciones de fármaco empleadas (20 μM de KTZ, 20 μM de PMD y 10: 1 μM de KTZ/PMD), mostrando cinéticas de crecimiento (en la fase exponencial y estacionaria) y tiempos de duplicación similares entre ellas y con la cepa WT.

Estudios realizados en varias especies del género *Leishmania* sometidas a presión de diferentes fármacos (o sus combinaciones) también mostraron que las tasas de crecimiento de los parásitos no se vieron afectadas, este es el caso de *L. (L.) mexicana* resistente a 30 μM de PMD, *L. (L.) amazonensis* resistente a 8,4 μM de PMD, *L. major* resistente a 40 μM de MTF y *L. donovani* resistente a AmB, MTF, PM y Sb^{III} solos y en combinación (Basselin et al., 2002; Coelho, Gentil, da Silveira, y Cotrim, 2008; García-Hernández et al., 2012; Turner et al., 2015).

A pesar de lo anterior, se encontraron diferencias al comparar la fase de decrecimiento de los promastigotes (donde estos mueren o se transforman a promastigotes metacíclicos) de las líneas R-K y R-K/P con la de los parásitos WT, ya que el número de los promastigotes en los cultivos resistentes fue menor en los días octavo y noveno. La hipótesis de que la resistencia podría ocasionar cambios en el proceso de diferenciación de promastigotes procíclicos a metacíclicos (afectando negativamente la infectividad) no se puede confirmar en este estudio pues para ello deberían realizarse metodologías que permitan evaluar aspectos diferentes al número de parásitos/día, como el tamaño y la forma del cuerpo y el flagelo de los parásitos, la posición del kinetoplasto, la presencia/ausencia de proteínas, la distribución de los lípidos de membrana y la expresión diferencial de ARN entre otros (Alcolea et al., 2019; Gossage, Rogers, y Bates, 2003; Mojtahedi, Clos, y Kamali-Sarvestani, 2008; Rogers, Chance, y Bates, 2002; Zhang y Beverley, 2010)

Los amastigotes son el estadio parasitario de *Leishmania* adaptado a vivir dentro del fagolisosoma de los macrófagos, sitio bastante inhóspito, de pH ácido, donde se generan especies reactivas de oxígeno y se activan enzimas hidrolíticas que favorecen la destrucción de otros microorganismos (Mukkada, Glaser, Anderson, y Wells, 1989). La generación *in vitro* de amastigotes de *Leishmania* sin emplear células requiere por tanto modificaciones en las

condiciones de cultivo ya que, a diferencia de los promastigotes que crecen en condiciones similares a las que tendrían dentro de los mosquitos (pH: 7,0, T: 27°C), estos requieren un medio con pH menor de 5,5, temperatura de entre 30 y 32 °C (dependiendo de la especie) y gasificación con 5% de CO₂ (Debrabant et al., 2004; Mukkada et al., 1989). Los parásitos requieren de la metacicloogénesis y amastigogénesis porque necesitan, entre otras cosas, expresar moléculas diferenciales, involucradas en los mecanismos de entrada al macrófago y/o en la supervivencia del amastigote en el fagosoma del macrófago (p.ej. el lipofosfoglicano [LPG], el proteofosfoglicano [PPG] y la metaloproteinasa gp63) (Cunningham, 2002).

Fue posible obtener amastigotes axénicos en cultivo empleando la metodología descrita en M&M, tanto en las líneas resistentes (R-K, R-P y R-K/P) como en la WT, mostrando similitudes entre todas ellas en cuanto al tiempo de duplicación y entre las WT, resistentes a PMD y resistentes KTZ/PMD en términos del porcentaje de transformación diario. Los promastigotes resistentes a 20 µM de KTZ mostraron, por otra parte, un incremento en la velocidad de transformación (un mayor porcentaje de amastigotes entre los días 3 al 6 que la WT) que podría traducirse en una ventaja de las cepas resistentes al momento de la infección. En resultados publicados previamente ha sido sugerido que la resistencia de cepas de *Leishmania* a los antimoniales pentavalentes en *L. donovani* y a MTF en *L. major* está relacionado con el incremento de su metacicloogénesis (Ouakad et al., 2011; Turner et al., 2015). Estudios moleculares y proteómicos en búsqueda de sobreexpresión de genes como HASP (por sus siglas en inglés *hydrophilic acylated surface protein*), SHERP (por sus siglas en inglés *small hydrophilic endoplasmic reticulum-associated protein*) y de proteínas como HSP70 expresadas en promastigotes metacíclicos y amastigotes son pertinentes para corroborar el aumento de la metacicloogénesis y/o amastigogénesis en los parásitos

de tipo R-K generados en este estudio (Brotherton et al., 2010; Knuepfer, Stierhof, McKean, y Smith, 2001).

Al comparar el tiempo de duplicación de los amastigotes axénicos con el de los promastigotes de las cuatro líneas (WT, R-K, R-P y R-K/P) se encontró que el tD de los amastigotes fue entre 1,5 y 3 veces mayor (se demoraron más en duplicarse), lo que puede deberse a la expresión diferencial de proteínas asociadas con el metabolismo parasitario en cada una de las formas de vida de *Leishmania*; reportes previos indican por ejemplo que en la fase de promastigotes se favorece el metabolismo glicolítico, mientras que en los amastigotes se expresan mayormente enzimas involucradas en la gluconeogénesis y la beta-oxidación de ácidos grasos (Brotherton et al., 2010). Además ha sido demostrado que cuando los amastigotes residen dentro de fagolisosomas (que contiene azúcares, aminoácidos y lípidos) pueden cambiar a un estado metabólicamente lento de crecimiento evitando que se agoten otros nutrientes menos abundantes para los que son auxotróficos (necesarios de obtener del medio), incluidos muchos aminoácidos, purinas, vitaminas y el grupo hemo (Kloehn et al., 2016). En experimentos realizados en *L. donovani* se encontró que no existían diferencias en los tiempos de crecimiento de promastigotes y amastigotes axénicos (Debrabant et al., 2004), mientras que en *L. (V) panamensis* se obtuvieron tiempos de duplicación menores en amastigotes axénicos que en promastigotes (Casadiego, 2018), lo que podría atribuirse a los diseños metodológicos empleados o a diferencias propias de las especies.

La capacidad infectiva *in vitro* de las cuatro líneas de parásitos en monocitos diferenciados fue similar. Otros autores también han demostrado que no hay diferencias entre la capacidad infectiva *in vitro* de parásitos de tipo salvaje y la de parásitos resistentes tanto a fármacos solos como combinados (García-Hernández et al., 2012; Sereno y Lemesre, 1997). La capacidad infectiva de

promastigotes y amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* (WT) fue demostrada hace más de 20 años, cuando Balanco et al (1998) encontraron que dichos parásitos eran capaces de infectar en diferente medida tanto macrófagos derivados de médula ósea de ratas Swiss como células J774; sería interesante evaluar la capacidad infectiva de promastigotes y amastigotes axénicos de las líneas resistentes generadas en este trabajo en una gama más amplia de macrófagos cultivados *in vitro*.

La no diferencia en la infectividad entre las resistentes y la WT podría sugerir que las moléculas y mecanismos de interacción parásito- célula que propician el ingreso y el establecimiento de la infección por *Leishmania* en macrófagos como el LPG, la metaloproteína gp63, fosfolípidos de glicosil inositol (GIPLs) y proteínas de unión a manosa se mantienen en las resistentes, incluso cuando KTZ y PMD se emplean en combinación.(Cunningham, 2002; Green et al., 1994; Liu y Uzonna, 2012). La línea R-K (la que presento una mayor amastigogénesis *in vitro*) fue tan infectiva como las otras, mostrando porcentajes de infección y número de amastigotes por célula similares. Turner y colaboradores, en el 2015, demostraron en *L. major* que parásitos resistentes a MTF con procesos de metaciclogénesis aumentados presentaban una menor infectividad que los parásitos WT tanto en células como en ratones (Turner et al 2015), por lo que es posible que sean otras las variables que estén interfiriendo en la infección de los macrófagos con los parásitos resistentes, como la virulencia propia de la especie y la respuesta de la célula o el organismo a la presencia del patógeno (Liu y Uzonna, 2012). Aunque en este trabajo no se determinó el tiempo de replicación de los amastigotes intracelulares, a medida que aumentaban los tiempos de infección aumentaba el número de amastigotes intracelulares en todas las cepas estudiadas; esto concuerda con el hecho de que aunque los eventos tempranos de interacción parásito-célula podrían determinar en gran manera si la infección ocurre o no, los parásitos resistentes ya

transformados en amastigotes dentro de los macrófagos, pueden proliferar, hasta lisis de las células hospederas (Kima, 2007; Liu y Uzonna, 2012).

La susceptibilidad de *Leishmania* a KTZ y al PMD *in vitro* ha sido ampliamente evaluada en diferentes especies y formas de vida del parásito. Los valores de susceptibilidad para el KTZ o el PMD en *L. (L) mexicana*, *L. donovani* y *L. (L) amazonensis* son similares a los encontrados por nosotros en *L. (V.) braziliensis* (Andrade-Neto et al., 2012; Kulkarni, Reddy, Gude, y McGwire, 2013; Muñoz, Mantilla, y Escobar, 2019). Con respecto al PMD se observan en general valores de CI_{50} 's menores de 1 μ M, por ejemplo la actividad de PMD en *L. (L) mexicana* mostró una CI_{50} de $0,5 \pm 0,1 \mu$ M mientras en *L. (L) amazonensis* fue de $0,37 \pm 0,06 \mu$ M (Basselin et al., 2002; Coelho et al., 2008).

Se encontró que el KTZ y/o el PMD necesitaron una mayor concentración para inhibir el crecimiento (en un 50%) de las cepas cultivadas con presión de fármaco de la que requirieron para causar el mismo efecto en parásitos WT; esta disminución de la susceptibilidad sugiere que los parásitos mostraron un fenotipo resistente. El hecho de que se encontraran IR's mayores para los parásitos resistentes a un solo fármaco que para los resistentes a la combinación podría sugerir que la mezcla KTZ/PMD ($IR < 5$) podría retrasar la aparición de resistencia farmacológica, lo cual es un hallazgo importante dado que la falla terapéutica se ha relacionado previamente con la monoterapia. Según algunos autores, la resistencia se considera poco pronunciada cuando el IR calculado es menor que 5 (Berg et al., 2015; Seifert et al., 2003), sin embargo esta situación es común en cepas resistentes a varios medicamentos (solos y en combinación) generadas *in vitro* en otras cepas de *Leishmania* (Coelho, Trinconi, Senra, Yokoyama-Yasunaka, y Uliana, 2015; García-Hernández et al., 2012). Los mecanismos utilizados por los parásitos para adaptarse a una mayor concentración de fármaco no se determinaron en este estudio, sin embargo podrían incluir

para el PMD reducción de la captación y aumento en el eflujo del fármaco tanto en el citosol como en la mitocondria y para el KTZ mutaciones en la citocromo P450 esterol 14-desmetilasa y/o un aumento en la tasa de secreción del fármaco (Croft et al., 2006).

En este trabajo se encontró que la actividad del KTZ en parásitos WT, R-K y R-K/P en términos de IC_{50} fue de $22,1 \pm 10,8 \mu M$, $330 \pm 21,6 \mu M$ (IR= 14,9) y $105,4 \pm 66,9 \mu M$ (IR: 4,8) en amastigotes axénicos y de $6,7 \pm 1,0 \mu M$, $40,1 \pm 10,5 \mu M$ (IR=6) y $33,5 \pm 10,0 \mu M$ (IR=5) en amastigotes intracelulares. Por otra parte, las IC_{50} del PMD en las líneas WT, R-P y R-K/P fueron de $9,24 \pm 1,04 \mu M$, $99,8 \pm 8,4 \mu M$ (IR= 10,8) y $8,2 \pm 1,96 \mu M$ (IR= 0,89) en amastigotes axénicos y $11,3 \pm 1,0 \mu M$, $27,1 \pm 0,3 \mu M$ (IR= 2,4) y $25,8 \pm 0,5 \mu M$ (IR= 2,3) en intracelulares. Si se compara la actividad de los fármacos en amastigotes con la actividad en los promastigotes se encuentra que las CI_{50} son hasta siete veces mayores, pero que, los amastigotes provenientes de líneas resistentes permanecen menos susceptibles al (los) fármaco(s) origen que los de tipo WT. La actividad de los fármacos sobre amastigotes tanto axénicos como intracelulares sugiere, como lo han propuesto otros autores, que la resistencia adquirida se mantiene después del cambio entre estadios parasitarios; por ejemplo, Mondelaers, Hendrickx, Van Bockstal, Maes, y Caljon (2018) encontraron IC_{50} mayores de $40 \mu M$ de MTF en promastigotes (IR > 7,5) y mayores de $20 \mu M$ (IR > 8,7) en amastigotes intracelulares de *L. infantum* con resistencia a la MTF inducida en amastigotes axénicos.

Nuestros datos apuntan a que los índices de resistencia calculados para cada fármaco varían entre formas parasitaria, dado que el mantenimiento de la resistencia entre estadios del parásito no siempre se realiza de forma lineal, es decir los índices de resistencia de promastigotes y amastigotes no son idénticos; además se ha encontrado que la resistencia solo permanece en promastigotes y/o amastigotes transformados cuando se ha generado resistencia a altas

concentraciones de los compuestos (Mayers, Sobel, Ouellette, Kaye, y Marchaim, 2017). Es importante resaltar que al realizar la inducción de resistencia directamente en amastigotes axénicos o amastigotes intracelulares, el fenotipo resistente obtenido podría ser diferente del obtenido con la metodología empleada en nuestro caso; por ejemplo, la generación de resistencia a PM en cepas de *L. donovani* previamente resistente al antimonio mostró que, cuando la presión de fármacos se hizo en promastigotes, la resistencia se mantuvo en los amastigotes generados a partir de estos, mientras que cuando la resistencia se generó en amastigotes, esta fue la única forma parasitaria con susceptibilidad disminuida (Hendrickx et al., 2012).

Encontramos por otro lado, que los parásitos resistentes a PMD y KTZ solos y en combinación fueron susceptibles a la MTF, lo cual es un hallazgo positivo ya que no excluiría el tratamiento con este fármaco en caso de requerirse. Un resultado previo reportado por Turner et al, 2015, demostró que al hacerse lo contrario y evaluar la susceptibilidad a PMD de promastigotes de *L. major* resistentes a MTF, estos eran más sensibles al PMD que los parásitos WT, proponiendo incluso la teoría de un mecanismo sinérgico entre PMD y MTF. El no hallazgo de resultados similares en esta investigación podría deberse a que la resistencia a PMD/KTZ podría ser generada por mecanismos moleculares y celulares diferentes a los de la MTF, aspectos que deben ser profundizados. Por otro lado, los promastigotes de la línea R-20 μM de KTZ y R-10/1 μM de KTZ/PMD mostraron un leve aumento de susceptibilidad a PM. Los mecanismos de acción descritos en especies de *Leishmania* para PM y KTZ involucran en igual medida el transporte de electrones y la membrana mitocondrial (Andrade-Neto et al., 2012; Croft et al., 2006), por lo que se sugiere estudiar si alguno de los mecanismos de inducción de resistencia a KTZ también podría favorecer el transporte y acumulación de PM dentro del parásito.

La resistencia cruzada entre los fármacos anti-*Leishmania* disponibles ha sido estudiada, un trabajo con aislados de *L. donovani* (de la India) con varios niveles de resistencia al antimonio mostraron reacción cruzada entre Sb^V, AmB y MTF (Kumar, Kulshrestha, Singh, y Salotra, 2009); sin embargo, la reacción cruzada entre MTF y AmB en cepas resistentes a la MTF, no pudo ser comprobada *in vitro* en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. infantum* (Mondelaers et al., 2018).

La alta variabilidad obtenida entre los ensayos de sinergismos dificulta el análisis de los resultados obtenidos para las cepas resistentes, si bien las concentraciones de los medicamentos en las *masters mix* (mezclas del fármaco 1 con el fármaco 2) hubieran podido ser un problema, en la cepa WT siempre se encontró sinergismo en el mismo radio; siendo este el caso, la variabilidad podría atribuirse a que dentro de un mismo cultivo de promastigotes puedan llegar a existir varias líneas clónales, que han desarrollado resistencia al mismo fármaco empleando diferentes adaptaciones que alteran o no la interacción KTZ: PMD; esto puede ser posible teniendo en cuenta que “los genomas de parásitos -de *Leishmania*- evolucionan por cambios en genes, regiones y número de cromosomas, no por mutación en los genes” (Sanger Institute, 2011) y que la existencia de variantes fármaco-resistentes en cultivos de *Leishmania* fue reportada anteriormente para *L. donovani* resistentes a análogos citotóxicos de las purinas (Iovannisci y Ullman, 1984).

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio por Carreño y Escobar en el 2019 (artículo sometido) se demostró una relación sinérgica en la actividad de KTZ y PMD en parásitos de *L. (V) braziliensis* en el radio 1:4 (concentraciones iniciales: 20 µM de KTZ Y 1 µM de PMD); además también fue reportado sinergismo para estos medicamentos en un estudio realizado en once cepas de *Candida albicans* (St-Germain, 1990), por lo que se sugiere el estudio de esta combinación como potencial terapia anti-*Leishmania*.

La resistencia generada a las máximas concentración de KTZ, PMD y KTZ/PMD no fue estable luego de retirar la presión del o los fármacos origen, por lo que esta resistencia se considera transitoria. La inestabilidad del fenotipo resistente podría deberse a que las adaptaciones generados por el parásito para vivir en presencia de los fármacos sean inducibles y/o reversibles, o estén relacionadas con amplificación cromosómica, un fenómeno que tiende a desaparecer en cepas resistentes clínicamente luego de su aislamiento y cultivo *in vitro* (Ponte-Sucre et al., 2017). Lo anterior no excluye que una permanencia de más tiempo (mayor que la utilizada en el presente estudio) de los promastigotes en cultivos con fármacos pudiera producir adaptaciones definitivas en el parásito que le otorguen resistencia permanente (Berg et al, 2015). Un caso conocido es la experiencia en el estado de Bihar, India, donde se tiene la hipótesis de que la exposición continua al arsénico (metal con similitudes al Sb^V) en el agua potable ha resultado en parásitos de *Leishmania* resistentes, que han causado que en la región la eficacia de los antimoniales frente a la LV sea menor al 50% (Perry et al., 2015). No se encuentran reporte sobre la estabilidad de la resistencia al KTZ inducida *in vitro* en *Leishmania*, pero en lo que respecta a la estabilidad de la resistencia individual a PMD, se ha indicado que esta se mantiene hasta por 7 meses en promastigotes de *L. (L) mexicana* resistentes a 20 μM de PMD (Sereny y Lemesre, 1997); nuestros resultados son algo diferentes, ya que encontramos la pérdida de la resistencia a PMD a partir del tercer mes sin presión de fármaco. Las diferencias en los resultados podrían ser atribuibles a las especies de parásito empleadas, pues ya se ha demostrado que la respuesta de los parásitos a los fármacos anti-*Leishmania* varían entre especies aún en parásitos con susceptibilidad natural a los medicamentos (Arevalo et al., 2007; Escobar, Matu, Marques, y Croft, 2002; Franco-Muñoz, Manjarrés-Estremor, y Ovalle-Bracho, 2018).

Sobre la estabilidad de la resistencia en las cepas a dos fármacos, los ensayos realizados por García y colaboradores (2012) mostraron, al igual que nosotros, que la resistencia inducida a combinaciones de fármacos fue inestable; después de un mes sin presión de fármacos, los parásitos con resistencia individual y combinada a MLF+PM y Sb^{III}+PM presentaban la misma susceptibilidad a esos fármacos que la cepa WT (García-Hernández et al., 2012). En nuestros experimentos la línea resistente KTZ/PMD pasó de tener índices de resistencia cercanos a 4 a tener índices de resistencia menores de 1.5. Sin embargo otras cepas como las resistente a AmB+MTF, AmB+PM, AmB+Sb^{III} fueron estables hasta por 4 meses (García-Hernández et al., 2012).

En lo que respecta a la infectividad *in vivo* se encontró variabilidad (entre individuos del mismo grupo y entre los grupos experimentales) tanto en los tiempos de infección (de 38 a 208 días) como en la presentación macroscópica de las lesiones generadas (de 5,3 a 71,5 mm² cuatro semanas después de su aparición). Sin embargo, se puede concluir que: i. Todas las cepas fueron infectivas; ii. Todas las cepas formaron lesiones típicas de LC, iii. En todas las improntas de lesión hubo cantidad abundante de amastigotes extra e intracelulares ii. La infección se limitó al sitio de inoculación, no se encontraron amastigotes de *Leishmania* en los órganos estudiados diferentes de la piel lesionada.

Uno de los factores que podrían estar influyendo en la variabilidad de la infección es que los parásitos permanecieron en cultivo *in vitro* por lo menos trece meses antes de ser inoculados en los ratones BALB/c. Reportes previos han demostrado que el mantenimiento de promastigotes de *Leishmania* en cultivos *in vitro* prolongados afectan su virulencia (Moreira et al., 2012; Segovia, Artero, Mellado, y Chance, 1992); Segovia y colaboradores (1992) encontraron que luego de seleccionar líneas de promastigotes provenientes de la misma cepa de *L. major* y mantenerlas en cultivo axénico *in vitro* durante doce meses se producían dos tipos de clonas, unas con capacidad

infectiva normal y otras con virulencia disminuida respecto a la de la cepa de parásitos parental. En ensayos con *L. infantum*, cultivados en el laboratorio por 4, 21 y 31 meses, se observó que la virulencia *in vivo* se vio afectada por el mantenimiento de los promastigotes en cultivo y que esta pérdida no se relacionaba con cambios en la metaciclologénesis sino con la capacidad de transformación promastigote-amastigote y la inmunomodulación de los parásitos en el huésped mamífero (Moreira et al., 2012). Se requieren estudios inmunológicos y de proteómica que diluciden con mayor precisión los cambios que indujo el cultivo *in vitro* por tiempos prolongados en presencia y ausencia de medicamentos.

Otros modelos animales de LC ocasionada por parásitos de *Leishmania* pasados periódicamente por ratones han tenido menor variabilidad interna en su presentación (Baldwin, Elso, Curtis, Buckingham, y Handman, 2003; Nabors y Farrell, 1994; Neira et al., 2019). En el modelo murino empleado en nuestro laboratorio se ha observado que la infección por *L. (V) braziliensis* (no resistente) en ratones BALB/c comienza a manifestarse como pápulas pequeñas que aparecen 50 a 60 días después de la inoculación del parásito y que evolucionan hasta alcanzar áreas de aproximadamente 90 mm² 150 días pos-inoculación, ulcerándose en más de la mitad de los individuos infectados (Neira et al., 2019).

A pesar de todo lo anterior es posible inferir a partir de nuestros resultados que, los parásitos de las cepas R-P y R-K/P tuvieron menor virulencia que los de las líneas WT y R-K, pues el tiempo mínimo entre la inoculación de los parásitos y la aparición de lesiones fue casi el doble en los ratones infectados con promastigotes R-P y R-K/P. Hallazgos similares fueron encontrados en otros estudios, en los que *L. (V.) guayanensis*, *L. (L) mexicana* y *L. major* menos susceptibles a Glucantime, AmB y MTF respectivamente, tuvieron menor capacidad infectiva que las cepas WT (Al-Mohammed, Chance, y Bates, 2005; Gazola et al., 2001; Turner et al., 2015). Los cambios en

la capacidad infectiva de parásitos resistentes podrían deberse a modificaciones en la composición de carbohidratos (Gazola et al., 2001) y lípidos de la superficie del parásito por lo que estudios de glicómica y lipidómica son requeridos.

La cantidad estimada de amastigotes extra e intracelulares luego de la visualización de improntas de lesiones y cortes histológicos de la dermis fue similar (abundante) para todos los individuos que desarrollaron lesión, a pesar de que, como ya se mencionó, el tamaño de las lesiones fue extremadamente variable; esto coincide con lo reportado previamente por Saldanha et al., (2017) quienes encontraron que no hubo relación entre el número de parásitos y la magnitud del área de inflamación o el tamaño de la lesión en pacientes brasileiros con LC. Determinar la carga parasitaria por dilución límite o PCR en tiempo real aportaría valiosa información en futuros estudios con parásitos resistentes.

El patrón de ulceración de las lesiones ocasionadas por los parásitos WT y resistentes mostró diferencias; el 100% de los ratones infectados con parásitos WT que desarrollaron lesiones en el sitio de inoculación mostraron ulceración en algún punto del seguimiento, mientras que solo se presentaron úlceras en el 37,5, 75% y 66% de los individuos con lesiones ocasionadas por parásitos R-K, R-P y R-K/P respectivamente; lo anterior puede indicar que la respuesta inmune inducida por parásitos WT y resistentes tiene algunas variantes. Existe evidencia que asocia el aumento de la producción de IFN- γ , TNF- α y la ausencia de IL-10 con el desarrollo de úlceras cutáneas y mucosas en la leishmaniasis causada por *L. (V) braziliensis* (Faria et al., 2005) y se ha asociado la ulceración de lesiones cutáneas ocasionadas por *Leishmania* con la presencia de abundante neutrófilos y linfocitos B activados (Gaafar et al., 1995; Zandbergen et al., 2004). Se propone que este aspecto sea estudiado a profundidad en futuros estudios, dado que el infiltrado inflamatorio encontrado en los cortes histológicos de lesiones provenientes de ratones de las tres

distintas líneas resistentes tuvieron variaciones en cuanto al tipo de células de la respuesta inmune predominantes y la presencia/ausencia de necrosis.

La presentación histológica de la leishmaniasis cutánea causada por *L. (V) braziliensis* en modelos murinos ha sido previamente estudiada (Donnelly, Lima, y Titus, 1998; Neira et al., 2019; Pereira et al., 2009). En el modelo de infección estandarizado en nuestro laboratorio se observa que aparte de la presencia de abundantes amastigotes, en la histología de los ratones BALB/c infectados con *L. (V) braziliensis* hay moderada paraqueratosis e hiperqueratosis, infiltrado inflamatorio difuso con predominio de linfocitos y células plasmáticas y focos de necrosis (Neira et al., 2019), patrón que presenta diferencias con los reportados en este trabajo tanto para la cepa WT como para las resistentes (Sección 2.3.3.2). Lo anterior podría deberse a que, como ya se comentó, la virulencia de los parásitos fue alterada por el cultivo *in vitro* y/o porque el patrón de citocinas inducido por cada línea de parásitos (WT y resistente) fue diferente (Teixeira et al., 2005); esto ya se había sido sugerido por Pereira y colaboradores en el 2009 luego de ver el resultado de las infecciones realizadas en ratones BALB/c y C57BL/6 con cepas de *L. (V) braziliensis* aisladas de pacientes.

A pesar de que no se encontraron amastigotes en los cortes histológicos de bazo, hígado y riñones observados y que esto sugiere que las cuatro líneas de parásitos empleados no podrían generar LV, esto no puede asegurarse, pues ya se ha documentado migración de *L. (V) braziliensis* a órganos tanto en ensayos de laboratorio (Donnelly et al., 1998; Pereira et al., 2009) como en pacientes humanos coinfectados con VIH (Hernández, Rodríguez, Martínez, García, y Convit, 1993; Silva, Pacheco, Gontijo, Carvalho, y Brazil, 2002).

La ME de KTZ y PMD evaluada no fue eficaz como tratamiento de las lesiones de LC causadas por los parásitos resistentes, pero tampoco en las producidas por parásitos WT, por lo que la falla del tratamiento no puede atribuirse a la disminución de la susceptibilidad de los mismos. La actividad insuficiente de la micro-emulsión podría deberse a su baja concentración de fármacos (se aplicó una dilución 1:10 de la ME original), sin embargo la ME original tampoco tuvo efectividad aplicada tópicamente (sin diluir) en lesiones caudas por *L. (V) braziliensis* en un trabajo anterior (Carreño y Escobar, 2019). Se sugiere mejorar la formulación, no solo en términos de actividad y concentración de fármaco, sino también en lo que respecta a su toxicidad, pues se observaron alteraciones tanto macroscópica (irritación y ulceración), como microscópicamente (exocitosis y necrosis), causadas probablemente por la alta concentración de los surfactantes. Características físicas, químicas y biológicas de la ME como la capacidad de carga, liberación del fármaco, captación celular y permeación en piel podrían influir en el desenlace del tratamiento y deben ser estudiadas (Carreño y Escobar, 2019).

La susceptibilidad a KTZ y PMD de todos los promastigotes provenientes de aislados de lesiones fue similar a la de los parásitos WT mantenidos en cultivo *in vitro* ($IR < 3$), corroborando que la resistencia inducida en las líneas R-K, R-P y R-K/P fue transitoria, esto constituiría una ventaja en el tratamiento de la leishmaniasis, pues aún en casos de infección antroponótica, la resistencia no se “transmitiría” junto con el patógeno. Sin embargo, para los parásitos aislados de ratones infectados con la cepa R-K y tratados con la ME de KTZ y PMD se obtuvieron índices de resistencia de 4,1 y 5 para el KTZ y de 4,9 y 11,9 para el PMD, sugiriendo una reactivación de la resistencia debida al tratamiento y la generación de resistencia cruzada a el PMD. Lo anterior podría deberse a que los mecanismos de resistencia generados por los parásitos de la línea R-K serían inducibles, es decir se expresarían solo cuando existiera presión de fármaco. La resistencia

farmacológica inducible ha sido demostrado en bacterias (Chancey, Zähler, y Stephens, 2012; Prabhu, Rao, y Rao, 2011) pero no en *Leishmania*, por lo que se hacen necesarios estudios que evalúen este tipo de resistencia, involucrando moléculas que ya se sabe son inducibles en este género, por ejemplo la proteína HSP70 (Miller et al., 2000).

Nuestros resultados sugieren que la adquisición de resistencia a KTZ y PMD podría afectar positiva o negativamente características biológicas de los parásitos, involucradas en el *fitness* y la virulencia de los mismos, estas variaciones deben ser estudiadas a otros niveles. Además, los resultados aquí reportados indican que el tratamiento combinado con KTZ y PMD podría retrasar la aparición de resistencia farmacológica. Todo lo anterior contribuye a la evaluación del posible impacto de la resistencia a los medicamentos en la leishmaniasis y podrían ser útiles al momento de formular programas de control y tratamiento que busquen el uso de terapias combinadas como alternativa a la monoterapia.

3. Conclusiones

Es posible inducir resistencia a KTZ y PMD solos y en combinación en promastigotes de *L. (V) braziliensis*.

La combinación de KTZ y PMD retrasa la aparición de resistencia *in vitro*.

La resistencia a KTZ solo y en combinación con PMD disminuye la cantidad de promastigotes en la fase de decrecimiento.

Los promastigotes R-K tuvieron un proceso de amastigogénesis más veloz.

Las moléculas y mecanismos que propician el ingreso del parásito a la célula y el establecimiento de la infección se mantienen en las cepas resistentes a KTZ y/o PMD (*in vitro* e *in vivo*).

La virulencia de *L. (V) braziliensis* se ve afectada por el cultivo *in vitro* por tiempos prolongados

La presión selectiva de KTZ y PMD solos y en combinación generaron fenotipos resistentes en promastigotes de *L. (V) braziliensis*.

La resistencia se mantiene aún entre cambios de forma parasitaria cuando dicha resistencia es a altas concentraciones.

La generación de resistencia a KTZ y PMD no causa resistencia cruzada con MTF o PM.

En el proceso de generación de resistencia se producen variantes fármaco-resistentes.

La ME de KTZ y PMD evaluada no es efectiva en el tratamiento de lesiones de LC.

Las características de la ME deben ser mejoradas, no solo para mejorar su efectividad sino para disminuir su toxicidad.

Referencias Bibliográficas

- Adams FG, Stroeher UH, Hassan KA, Marri S, Brown MH (2018). Resistance to pentamidine is mediated by AdeAB, regulated by AdeRS, and influenced by growth conditions in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *PLoS One*. 13(5):e0197412. doi:10.1371/journal.pone.0197412. eCollection 2018. PubMed PMID: 29750823.
- Aden Abdi, Y., Gustafsson, L., Ericsson, O., y Hellgren, U. (1995). *Handbook of drugs for tropical parasitic infections*. Grupo Taylor y Francis.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Molina, R., Jiménez, M., Myler, P. J., y Larraga, V. (2019). Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007288>
- Al-Mohammed, H. I., Chance, M. L., y Bates, P. A. (2005). Production and Characterization of Stable Amphotericin-Resistant Amastigotes and Promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3274-3280. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3274-3280.2005>
- Andrade-Neto, V. V., Matos-Guedes, H. L. de, Gomes, D. C. de O., Canto-Cavaleiro, M. M. do, Rossi-Bergmann, B., y Torres-Santos, E. C. (2012). The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(3), 416-419. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000300018>
- Arendrup, M. C., y Patterson, T. F. (2017). Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_3), S445-S451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>

- Arevalo, J., Ramirez, L., Adaui, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., ... Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of *Leishmania* (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 195, 1846-1851. <https://doi.org/10.1086/518041>
- Ashutosh, Sundar, S., y Goyal, N. (2007). Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(2), 143-153. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46841-0>
- Baker, N., Glover, L., Munday, J. C., Aguinaga Andrés, D., Barrett, M. P., de Koning, H. P., y Horn, D. (2012). Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(27), 10996-11001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202885109>
- Balanco, J. M., Pral, E. M., da Silva, S., Bijovsky, A. T., Mortara, R. A., y Alfieri, S. C. (1998). Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. *Parasitology*, 116 (Pt 2), 103-113. <https://doi.org/10.1017/s003118209700214x>
- Baldwin, T. M., Elso, C., Curtis, J., Buckingham, L., y Handman, E. (2003). The Site of *Leishmania* major Infection Determines Disease Severity and Immune Responses. *Infection and Immunity*, 71(12), 6830-6834. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6830-6834.2003>
- Basselin, M., Badet-Denisot, M. A., Lawrence, F., y Robert-Gero, M. (1997). Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 85(3), 274-282.

- Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H., y Barrett, M. P. (2002). Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), 3731-3738. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3731-3738.2002>
- Ben Salah, A., Ben Messaoud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Ben Alaya, N., Bettaieb, J., ... Grogl, M. (2013). Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 368(6), 524-532. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202657>
- Berg, M., García-Hernández, R., Cuypers, B., Vanaerschot, M., Manzano, J. I., Poveda, J. A., ... Gamarro, F. (2015). Experimental Resistance to Drug Combinations in *Leishmania donovani*: Metabolic and Phenotypic Adaptations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2242-2255. <https://doi.org/10.1128/AAC.04231-14>
- Boslaugh, S. (2017). *Drug resistance*. ABC-CLIO.
- Bourreau, E., Ginouves, M., Prévot, G., Hartley, M., Gangneux, J., Robert-Gangneux, F., Dufour, J., Sainte-Marie, D., Bertolotti, A., Pratlong, F., Martin, R., Schütz, F., Couppié, P., Fasel, N., Ronet, C. (2016). Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. *J Infect Dis*, 213(1), 105-111.
- Bray, P., Barrett, M., Ward, S., y de Koning, H. (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, 19(5), 232-239. doi: 10.1016/s1471-4922(03)00069-2
- Brochu, C., Wang, J., Roy, G., Messier, N., Wang, X.-Y., Saravia, N. G., y Ouellette, M. (2003). Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation

- differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3073-3079. <https://doi.org/10.1128/aac.47.10.3073-3079.2003>
- Brotherton, M.-C., Racine, G., Foucher, A. L., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., y Ouellette, M. (2010). Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 3842-3853. <https://doi.org/10.1021/pr100048m>
- Buckner FS, Wilson AJ, White TC y Van Voorhis WC. (1998). Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3245-3250
- Burri, C., y Keiser, J. (2001). Pharmacokinetic investigations in patients from northern Angola refractory to melarsoprol treatment. *Tropical Medicine and International Health*, 6(5), 412-420. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00725.x>
- Campos, M. C., Phelan, J., Francisco, A. F., Taylor, M. C., Lewis, M. D., Pain, A., ... Kelly, J. M. (2017). Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. *Scientific Reports*, 7(1), 14407. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14986-6>
- Cardona-Arias, J. A., Vélez, I. D., y López-Carvajal, L. (2015). Efficacy of Thermotherapy to Treat Cutaneous Leishmaniasis: A Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. *PLOS ONE*, 10(5), e0122569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122569>
- Carreño, H., y Escobar, P. (2019). Evaluation of interactions between antileishmanial drugs as a base for a co-formulated topical system treatment for New World cutaneous leishmaniasis. *Manuscrito sometido, en revisión para publicación.*
- Casadiego, O. A. (2018). *Efectividad de un tratamiento combinado de Miltefosina oral y una formulación tópica conteniendo un fármaco anti-leishmania en lesiones cutaneas de*

- ratones BALB/c producidas por Leishmania (Viannia) panamensis*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- CaymanChemical. (2019). Miltefosine. Recuperado 10 de septiembre de 2019, de CaymanChemical website: <https://www.caymanchem.com/product/63280>
- Center for Disease Control and Prevention. (2019, febrero 27). CDC - Leishmaniasis—Resources for Health Professionals. Recuperado 16 de octubre de 2019, de https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html
- Center for Drug Evaluation. (2018). Comunicado de la FDA sobre la seguridad de los medicamentos: FDA limita el uso de tabletas orales de Nizoral (ketoconazol) debido a lesiones potencialmente fatales al hígado y riesgo de interacción con medicamentos y problemas de las glándulas suprarrenales. *FDA*. Recuperado de <http://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/comunicado-de-la-fda-sobre-la-seguridad-de-los-medicamentos-fda-limita-el-uso-de-tabletas-orales-de>
- Chakravarty, J., y Sundar, S. (2010). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 167-176. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62887>
- Chancey, S. T., Zähler, D., y Stephens, D. S. (2012). Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future microbiology*, 7, 959-978. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.63>
- Charlton, R. L., Rossi-Bergmann, B., Denny, P. W., y Steel, P. G. (2018). Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: The-state-of-the-art. *Parasitology*, 145(2), 219-236. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000993>
- Coelho, A. C., Beverley, S. M., y Cotrim, P. C. (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania*

- major. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2), 83-90.
[https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00162-2)
- Coelho, A. C., Gentil, L. G., da Silveira, J. F., y Cotrim, P. C. (2008). Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Experimental Parasitology*, 120(1), 98-102.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.018>
- Coelho, A. C., Trinconi, C. T., Senra, L., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., y Uliana, S. R. B. (2015). *Leishmania* is not prone to develop resistance to tamoxifen. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), 77-83.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.006>
- Coles, G. C., Hunt, K. R., y Roos, M. H. (1994). *Problems in the detection of anthelmintic resistant nematodes of ruminants*. 27.
- Croft, S. L., Sundar, S., y Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 111-126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- Croft, S. L., y Yardley, V. (2002). *Chemotherapy of leishmaniasis*. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 319-342. <https://doi.org/doi:10.2174/1381612023396258>
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, 72(2), 132-141.
<https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>
- de Menezes, J. P. B., Guedes, C. E. S., Petersen, A. L. de O. A., Fraga, D. B. M., y Veras, P. S. T. (2015). Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *BioMed Research International*, 2015, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2015/815023>

- Debrabant, A., Joshi, M. B., Pimenta, P. F. P., y Dwyer, D. M. (2004). Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: Their growth and biological characteristics. *International Journal for Parasitology*, 34(2), 205-217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.011>
- De Koning, H. P. y Jarvis, S. M. (2001). Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Trop.* 80, 245–250. doi: 10.1016/S0001-706X(01)00177-2
- Delobel, P., Pradinaud, R. (2003). Rhabdomyolysis associated with pentamidine isethionate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*, 51(5), pp.1319-1320.
- Donnelly, K. B., Lima, H. C., y Titus, R. G. (1998). Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *The Journal of Parasitology*, 84(1), 97-103.
- Drugs for Neglected Diseases initiative. (2018). *Towards a new generation of treatments for leishmaniasis*. 20.
- Echeverry, M., Gaona Narváez, J., Gualtero Trujillo, S., Agudelo Calderón, C., Pardo, R., Gaitán, H., y Pineda, F. (2007). *Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública (Guía 21)*. Scripto.
- El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., ... Ouellette, M. (2005). Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1988-1993. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1988-1993.2005>

- El-Taweel, H. A. (2015). Understanding drug resistance in human intestinal protozoa. *Parasitology Research*, 114(5), 1647-1659. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4423-1>
- Esch, K. J., y Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C., y Croft, S. L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, 81(2), 151-157. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(01\)00197-8](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(01)00197-8)
- Faria, D. R., Gollob, K. J., Barbosa, J., Schriefer, A., Machado, P. R. L., Lessa, H., ... Dutra, W. O. (2005). Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 73(12), 7853-7859. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7853-7859.2005>
- Fernández, O. L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodríguez, I., ... Saravia, N. G. (2014). Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871>
- Franco-Muñoz, C., Manjarrés-Estremor, M., y Ovalle-Bracho, C. (2018). Intraspecies differences in natural susceptibility to amphotericine B of clinical isolates of *Leishmania* subgenus *Viannia*. *PLoS ONE*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196247>
- Gaafar, A., Kadar, A. Y. el, Theander, T. G., Permin, H., Ismail, A., Kharazmi, A., y Hassan, A. M. el. (1995). The Pathology of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania Major* in

- Sudan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(5), 438-442.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.438>
- Gamarro, F., Chiquero, M. J., Amador, M. V., Légaré, D., Ouellette, M., y Castanys, S. (1994). P-glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochemical Pharmacology*, 47(11), 1939-1947. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90067-1)
- García-Hernández, R., Gómez-Pérez, V., Castanys, S., y Gamarro, F. (2015). Fitness of *Leishmania donovani* Parasites Resistant to Drug Combinations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(4), e0003704. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003704>
- García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S., y Gamarro, F. (2012). *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1974. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001974>
- Gazola, K. C., Ferreira, A. V., Anacleto, C., Michalick, M. S., Andrade, A. F., y Moreira, E. S. (2001). Cell surface carbohydrates and in vivo infectivity of glucantime-sensitive and resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell lines. *Parasitology Research*, 87(11), 935-940. <https://doi.org/10.1007/s004360100475>
- Geerts, S., Holmes, P. H., Diall, O., y Eisler, M. C. (2001). *African bovine trypanosomiasis: The problem of drug resistance*. 4.
- Ginouès, M., Simon, S., Nacher, M., Demar, M., Carme, B., Couppié, P., y Prévot, G. (2017). In Vitro Sensitivity of Cutaneous *Leishmania* Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 1143-1150. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0373>

- Gossage, S. M., Rogers, M. E., y Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*, 33(10), 1027-1034.
- Green, P. J., Feizi, T., Stoll, M. S., Thiel, S., Prescott, A., y McConville, M. J. (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66(2), 319-328. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90158-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90158-9)
- Gullberg, E. (2014). *Selection of Resistance at very low Antibiotic Concentrations*.
- Gülat, S. y Doluca Dereli, M. (2014). Investigation of the expression levels of efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 48(2), 325-334. doi:10.5578/mb.7213
- Hatfield C, Kasarskis A, Staben C (1991). Pentamidine sensitivity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for pentamidine effects on *Pneumocystis carinii*. *J Protozool*. 1991 Nov-Dec;38(6):70S-71S. PubMed PMID: 1818214.
- Hefnawy, A., Berg, M., Dujardin, J.-C., y De Muylder, G. (2017). Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends in Parasitology*, 33(3), 162-174. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>
- Hendrickx, S., Inocência da Luz, R. A., Bhandari, V., Kuypers, K., Shaw, C. D., Lonchamp, J., ... Maes, L. (2012). Experimental Induction of Paromomycin Resistance in Antimony-Resistant Strains of *L. donovani*: Outcome Dependent on In Vitro Selection Protocol. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1664. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001664>
- Hernández, D., Rodríguez, N., Martínez, C., García, L., y Convit, J. (1993). *Leishmania braziliensis* causing visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency

- virus infection, identified with the aid of the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6), 627-628.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90264-q](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90264-q)
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., y Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714-726.
<https://doi.org/10.1038/nrc3599>
- Instituto Nacional de Salud. (2019). *Boletín Epidemiológico semanal- 41-*. Recuperado de https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_41.pdf
- Iovannisci, D. M., y Ullman, B. (1984). Single cell cloning of Leishmania parasites in purine-defined medium: Isolation of drug-resistant variants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 165 Pt A, 239-243. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4553-4_46
- Jha, S., Singh, N., y Jha, T. (1991). Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J Assoc Physicians India*, 39(4), 314-316.
- Jha, T. (1983). Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(2), 167-170. doi: 10.1016/0035-9203(83)90058-5
- Kayembe, D., y Wery, M. (1972). *Observations on the diamidine sensitivity of strains of Trypanosoma gambiense recently isolated in the Republic of Zaire*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5060391>

- Kima, P. E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International journal for parasitology*, 37(10), 1087-1096. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007>
- Kloehn, J., Blume, M., Cobbold, S. A., Saunders, E. C., Dagley, M. J., y McConville, M. J. (2016). Using metabolomics to dissect host-parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.019>
- Knuepfer, E., Stierhof, Y. D., McKean, P. G., y Smith, D. F. (2001). Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *The Biochemical Journal*, 356(Pt 2), 335-344. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560335>
- Kulkarni, M. M., Reddy, N., Gude, T., y McGwire, B. S. (2013). Voriconazole suppresses the growth of *Leishmania* species in vitro. *Parasitology Research*, 112(5), 2095-2099. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3274-x>
- Kumar, D., Kulshrestha, A., Singh, R., y Salotra, P. (2009). In vitro susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to Miltefosine and amphotericin B: Correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 835-838. <https://doi.org/10.1128/AAC.01233-08>
- Lachaud, L., Bourgeois, N., Plourde, M., Leprohon, P., Bastien, P., y Ouellette, M. (2009). Parasite Susceptibility to Amphotericin B in Failures of Treatment for Visceral Leishmaniasis in Patients Coinfected with HIV Type 1 and *Leishmania infantum*. *Clinical Infectious Diseases*, 48(2), e16-e22. <https://doi.org/10.1086/595710>

- Lavi, O., Gottesman, M. M., y Levy, D. (2012). The dynamics of drug resistance: A mathematical perspective. *Drug Resistance Updates*, 15(1-2), 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.003>
- Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y. D., Rosen, B. P., Haimeur, A., ... Ouellette, M. (2001). The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26301-26307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102351200>
- Lemke, T. L., y Williams, D. A. (2012). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Leprohon, P., Légaré, D., Raymond, F., Madore, E., Hardiman, G., Corbeil, J., y Ouellette, M. (2009). Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. Recuperado 21 de octubre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2655676/>
- Liarte, D. B., y Murta, S. M. F. (2010). Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitology Research*, 107(1), 205-212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1852-8>
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., y Sacks, D. (1999). Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania donovani*. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(2), 564-567. <https://doi.org/10.1086/314896>

- Liu, D., y Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>
- López-Carvajal, L., Palacio- Barco, M., y Cardona-Arias, J. (2016). Eficacia de los azoles en el tratamiento de la leishmaniasis cutanea. *Archivos de Medicina. Imedpub*.
- Machado, P. R. L., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L. H., Bang, H., Ho, J. L., y Carvalho, E. M. (2007). Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 44(6), 788-793. <https://doi.org/10.1086/511643>
- Magill, A. J. (1995). Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatologic Clinics*, 13(3), 505-523.
- Mans, D. R. A., Kent, A. D., Hu, R. V., Lai A Fat, E. J., Schoone, G. J., Adams, E. R., ... Schallig, H. D. F. H. (2016). Monitoring the response of patients with cutaneous leishmaniasis to treatment with pentamidine isethionate by quantitative real-time PCR, and identification of *Leishmania* parasites not responding to therapy. *Clinical and Experimental Dermatology*, 41(6), 610-615. <https://doi.org/10.1111/ced.12786>
- Marquis, N., Gourbal, B., Rosen, B. P., Mukhopadhyay, R., y Ouellette, M. (2005). Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Molecular Microbiology*, 57(6), 1690-1699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04782.x>
- Martínez, S., y Marr, J. (1992). *Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis*. 326(11), 741-4.
- Mayers, D. L., Sobel, J. D., Ouellette, M., Kaye, K. S., y Marchaim, D. (2017). *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*, |. Springer.

- Mbongo, N., Loiseau, P., Billion, M., y Robert-Gero, M. (1998). Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*, 42(2), 352–357.
- Miller, M. A., McGowan, S. E., Gantt, K. R., Champion, M., Novick, S. L., Andersen, K. A., ... Wilson, M. E. (2000). Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33883-33889. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003671200>
- Ministerio de la protección social. (2010). *Guía para la atención clínica integral del paciente con leishmaniasis*. Bogotá, Colombia.
- Miranda-Verastegui, C., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, I., Ward, B. J., y Matlashewski, G. (2005). Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Topical Imiquimod 5% with Parenteral Meglumine Antimoniate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 40(10), 1395-1403. <https://doi.org/10.1086/429238>
- Mohapatra, S. (2014). Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical Parasitology*, 4(1), 4-9. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.129142>
- Mojtahedi, Z., Clos, J., y Kamali-Sarvestani, E. (2008). *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental Parasitology*, 119(3), 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.008>
- Mondelaers, A., Hendrickx, S., Van Bockstal, L., Maes, L., y Caljon, G. (2018). Miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strains with an impaired MT/ROS3 transporter complex retain amphotericin B susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 392-394. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx407>

- Moreira, D., Santarém, N., Loureiro, I., Tavares, J., Silva, A. M., Amorim, A. M., ... Silvestre, R. (2012). Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001469>
- Mowbray, C. E., Braillard, S., Speed, W., Glossop, P. A., Whitlock, G. A., Gibson, K. R., ... Maes, L. J. (2015). Novel Amino-pyrazole Ureas with Potent In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(24), 9615-9624. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01456>
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P., y Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.016>
- Mukherjee, B., Mukhopadhyay, R., Bannerjee, B., Chowdhury, S., Mukherjee, S., Naskar, K., ... Roy, S. (2013). Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), E575-582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213839110>
- Mukkada, A. J., Glaser, T. A., Anderson, S. A., y Wells, S. K. (1989). *Leishmania* Amastigotes: Adaptations for Growth in an Acidic in vivo Environment. En D. T. Hart (Ed.), *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control* (pp. 667-676). https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1575-9_82
- Müller, J., Ley, S., Felger, I., Hemphill, A., y Müller, N. (2008). Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and

- metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(1), 72-82.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkn142>
- Munday JC, Settimo L y de Koning HP (2015). Transport proteins determine drug sensitivity and resistance in a protozoan parasite, *Trypanosoma brucei*. *Front Pharmacol*. 6:32. doi: 10.3389/fphar.2015.00032. eCollection 2015.Review. PubMed PMID: 25814953; PubMed Central PMCID: PMC4356943.
- Munita, J. M., y Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Muñoz, B. Y., Mantilla, J. C., y Escobar, P. (2019). Therapeutic response and safety of the topical, sequential use of antiseptic, keratolytic, and pentamidine creams (3-PACK) on *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*-infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180535>
- Nabors, G. S., y Farrell, J. P. (1994). Site-specific immunity to *Leishmania major* in SWR mice: The site of infection influences susceptibility and expression of the antileishmanial immune response. *Infection and Immunity*, 62(9), 3655-3662.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2011). Causes of Antimicrobial (Drug) Resistance. Recuperado 21 de octubre de 2019, de <https://www.niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes>
- Neira, L. F., Stashenko, E., y Escobar, P. (2014). *Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae*. 8.
- Neira, Peña, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C., y Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de *Leishmania Viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista Salud UIS*, 51(1), 33-42.

- Obonaga, R., Fernández, O. L., Valderrama, L., Rubiano, L. C., Castro, M. del M., Barrera, M. C., ... Gore Saravia, N. (2014). Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* Subgenus *Viannia* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 144-152. <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Leishmaniasis. Recuperado 16 de octubre de 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Ostyn, B., Hasker, E., Dorlo, T. P. C., Rijal, S., Sundar, S., Dujardin, J.-C., y Boelaert, M. (2014). Failure of Miltefosine Treatment for Visceral Leishmaniasis in Children and Men in South-East Asia. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100220>
- Ouakad, M., Vanaerschot, M., Rijal, S., Sundar, S., Speybroeck, N., Kestens, L., ... Dujardin, J.-C. (2011). Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology*, 138(11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001120>
- Örs ŞT, Akdoğan E, Dunn CD (2014). Mutation of the mitochondrial large ribosomal RNA can provide pentamidine resistance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion*.18:7-11. doi: 10.1016/j.mito.2014.08.004. Epub 2014 Aug 21. PubMed PMID: 25151477.
- Papadopoulou, B., Roy, G., y Ouellette, M. (1993). Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. Recuperado 21 de octubre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310065/>

- Pereira, C. G., Silva, A. L. N., de Castilhos, P., Mastrantonio, E. C., Souza, R. A., Romão, R. P., ... Souza, M. A. (2009). Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology*, 165(3), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.019>
- Perez-Victoria, F., Gamarro, F., Ouellette, M., y Castanys, S. (2003). Functional cloning of the miltefosine transporter: A novel p-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49965-49971. doi: 10.1074/jbc.m308352200
- Perry, M., Wyllie, S., Prajapati, V., Menten, J., Raab, A., Feldmann, J., ... Fairlamb, A. (2015). Arsenic, antimony, and *Leishmania*: Has arsenic contamination of drinking water in India led to treatment- resistant kala-azar? *Lancet (London, England)*, 385 Suppl 1, S80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60395-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60395-6)
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., ... Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Prabhu, K., Rao, S., y Rao, V. (2011). Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples. *Journal of Laboratory Physicians*, 3(1), 25. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.78558>
- PubChem. (2018). Pentamidine isethionate. Recuperado 10 de septiembre de 2019, de PubChem website: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8813>

- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A., Das, S., y Kumar, S. et al. (2012). Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1031-1041. doi: 10.1128/aac.00030-11
- Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M., y Loiseau, P. (2005). Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2677-2686. doi: 10.1128/aac.49.7.2677-2686.2005
- Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., y González, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 6, 28266. <https://doi.org/10.1038/srep28266>
- Rautemaa R, Richardson M, Pfaller M, Perheentupa J, Saxen H (2008). Reduction of fluconazole susceptibility of *Candida albicans* in APECED patients due to long-term use of ketoconazole and miconazole. *Scand J Infect Dis* 40: 904-907.
- Regli, I. B., Fernández, O. L., Martínez-Salazar, B., Gómez, M. A., Saravia, N. G., y Tacchini-Cottier, F. (2018). Resistance of *Leishmania* (Viannia) *Panamensis* to Meglumine Antimoniate or Miltefosine Modulates Neutrophil Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03040>
- Rivas, L., y Gil, C. (Eds.). (2017). Front Matter. En *Drug Discovery for leishmaniasis* (pp. P001-P006). <https://doi.org/10.1039/9781788010177-FP001>
- Rivera-Tapia, J. A. (2003). *Antibiotic resistance, public health problem*. 7.

- Rogers, M. E., Chance, M. L., y Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(Pt 5), 495-507. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001439>
- Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M. X., Ouellette, M., y Saravia, N. G. (2006). Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(10), 1375-1383. <https://doi.org/10.1086/503371>
- Saldanha, M. G., Queiroz, A., Machado, P. R. L., de Carvalho, L. P., Scott, P., de Carvalho Filho, E. M., y Arruda, S. (2017). Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(3), 645-652. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0539>
- Sanger Institute. (2011). Different paths to drug resistance in *Leishmania*. Recuperado 14 de octubre de 2019, de <https://www.sanger.ac.uk/news/view/2011-10-27-different-paths-to-drug-resistance-in-em-leishmania-em->
- Santa-Rita, R., Henriques-Pons, A., Barbosa, H., y de Castro, S. (2004). Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 704-710. doi: 10.1093/jac/dkh380
- Segovia, M., Artero, J. M., Mellado, E., y Chance, M. L. (1992). Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86(4), 347-354. <https://doi.org/10.1080/00034983.1992.11812677>

- Seifert, K., Matu, S., Javier Pérez-Victoria, F., Castanys, S., Gamarro, F., y Croft, S. L. (2003). Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(4), 380-387. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00125-0](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00125-0)
- Seifert, K, Matus, S, Javier Pérez-Victoria F, Castanys, S, Gamarro, F, y Croft, SL. (2003). *Characterisation of Leishmania donovani promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine)*. - *PubMed—NCBI*. 22(4), 380-387.
- Sereno, D., Guilvard, E., Maquaire, S., Cavaleyra, M., Holzmuller, P., Ouaiissi, A., y Lemesre, J. L. (2001). Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: Implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Tropica*, 80(3), 195-205. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(01\)00154-1](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(01)00154-1)
- Sereno, D., y Lemesre, J. L. (1997). In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: Stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9), 1898-1903. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.9.1898>
- Sibley, C. H., y Hunt, S. Y. (2003). Drug resistance in parasites: Can we stay ahead of the evolutionary curve? *Trends in Parasitology*, 19(11), 532-537. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.009>
- Silva, E. S. da, Pacheco, R. S., Gontijo, C. M. F., Carvalho, I. R., y Brazil, R. P. (2002). Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(3), 145-149. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000300006>

- Sosa, N., Capitán, Z., Nieto, J., Nieto, M., Calzada, J., Paz, H., ... Grogl, M. (2013). Randomized, Double-Blinded, Phase 2 Trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(3), 557-563. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0736>
- Soto, J., Fuya, P., Herrera, R., y Berman, J. (1998). Topical Paromomycin/Methylbenzethonium Chloride Plus Parenteral Meglumine Antimonate as Treatment for American Cutaneous Leishmaniasis: Controlled Study. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 56-58. <https://doi.org/10.1086/516267>
- Soto, J., Hernandez, N., Mejia, H., Grogl, M., y Berman, J. (1995). Successful Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis with a Combination of Topical Paromomycin/Methylbenzethonium Chloride and Injectable Meglumine Antimonate. *Clinical Infectious Diseases*, 20(1), 47-51. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.1.47>
- Soto, J. M., Padilla, J. R., Gutierrez, P., Grogl, M., Berman, J. D., Arboleda, M., ... Nicholls, R. S. (2002). Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): Phase 2 pilot study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), 147-151. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.147>
- Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., y Singh, S. (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & Vectors*, 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>
- Stead AM, Bray PG, Edwards IG, DeKoning HP, Elford BC, Stocks PA y Ward SA. (2001). Diamidine compounds: selective uptake and targeting in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*. 59(5):1298-306. PubMed PMID: 11306715.

- St-Germain, G. (1990). Effects of pentamidine alone and in combination with ketoconazole or itraconazole on the growth of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(12), 2304-2306. <https://doi.org/10.1128/aac.34.12.2304>
- Stokes, J. M., MacNair, C. R., Ilyas, B., French, S., Côté, J.-P., Bouwman, C., ... Brown, E. D. (2017). Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nature Microbiology*, 2, 17028. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.28>
- Sun, T., y Zhang, Y. (2008). Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. *Nucleic Acids Research*, 36(5), 1654-1664. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1180>
- Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., ... Murray, H. W. (2000). Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 1104-1107. <https://doi.org/10.1086/318121>
- Sunter, J., y Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Teixeira, M. J., Fernandes, J. D., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Pompeu, M. L., Santana da Silva, J., ... Barral, A. (2005). Distinct *Leishmania braziliensis* Isolates Induce Different Paces of Chemokine Expression Patterns. *Infection and Immunity*, 73(2), 1191-1195. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1191-1195.2005>

- Tsao S, Rahkhoodaee F, Raymond M (2009). Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1p and CDR2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1344-1352.
- Turner, K. G., Vacchina, P., Robles-Murguia, M., Wadsworth, M., McDowell, M. A., y Morales, M. A. (2015). Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine-Resistant *Leishmania major*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003948. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003948>
- Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., Ponte-Sucré, A., Arevalo, J., y Dujardin, J.-C. (2014). Treatment failure in leishmaniasis: Drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(8), 937-946. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.916614>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074-D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>
- World Health Organization (Ed.). (2012). *Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Wu, Z., Mirza, H., y Tan, K. S. W. (2014). Intra-Subtype Variation in Enteroadhesion Accounts for Differences in Epithelial Barrier Disruption and Is Associated with Metronidazole Resistance in Blastocystis Subtype-7. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2885. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002885>

- Wyllie, S., Vickers, T. J., y Fairlamb, A. H. (2008). Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1359-1365. <https://doi.org/10.1128/AAC.01563-07>
- Zandbergen, G. van, Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., y Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521-6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
- Zhang, K., y Beverley, S. M. (2010). Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(2), 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.12.004>
- Zołek, T., y Maciejewska, D. (2010). Theoretical models of pentamidine analogs activity based on their DNA minor groove complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5), 1991-1999. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.047>