

**Efectividad de un Tratamiento Combinado de Miltefosina Oral y una Formulación Tópica
Conteniendo un Fármaco Anti-*Leishmania* en Lesiones Cutáneas de Ratones BALB/c
Producidas por *Leishmania (Viannia) panamensis***

Omar Andrés Casadiego Manosalva

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

Director

Patricia Escobar Rivero

Ph.D em Nanobiotecnología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

A la Doctora Patricia Escobar por su infinita paciencia y gran capacidad de formación.

Al Doctor Julio Cesar Mantilla por su colaboración en los estudios histopatológicos del presente trabajo.

Al Instituto Colombiano Francisco José de Caldas “COLCIENCIAS” proyecto No. 687-2014, a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión y al programa de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas de la UIS por el apoyo financiero para la consecución de mi Maestría y la asistencia al “*6th World Congress on Leishmaniasis*” realizado en Toledo, España.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración tanto científica como personal.

A mi familia por su apoyo incondicional durante todo mi proceso de formación académica y personal.

A mi gran amigo Jordy Andrés Castillo por sus ilustraciones y su valiosa amistad de tantos años.

Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Marco Teórico.....	17
1.1 Leishmaniasis.....	17
1.1.1 Generalidades.....	17
1.1.2 Ciclo de vida y formas parasitarias	19
1.1.3 Metabolismo del parásito.....	20
1.1.4 Leishmaniasis en piel y mucosas	25
1.2 Tratamiento de la leishmaniasis (sistémicos y tópicos).....	27
1.3 Formulaciones tópicas y su aplicación en piel.....	34
1.3.1 Terapias combinadas en el tratamiento de la leishmaniasis.....	35
1.3.2 Interacciones farmacológicas.....	37
1.3.3 Fármacos sinérgicos en LC.....	38
2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivo general:.....	39
2.2 Objetivos específicos	40
3. Materiales y Métodos.....	40
3.1 Diseño experimental	41
3.2 Fármacos y reactivos.....	41

3.2.1 Formas farmacéuticas	43
3.3 Parásitos y células	44
3.4 Generación de amastigotes axénicos (AmA).....	44
3.4.1 Cinética de crecimiento.....	45
3.4.2 Infectividad de promastigotes y AmA en células THP-1	46
3.5 Ensayo de actividad anti- <i>Leishmania</i>	46
3.6 Ensayo de citotoxicidad en células THP-1	48
3.6 Interacción farmacológica de la MTF en AmA	49
3.7 Ensayos de toxicidad en células.....	50
3.8 Animales de experimentación.....	51
3.8.1 Ensayo de dosis respuesta en MTF oral.....	52
3.8.2 Tratamiento combinado de MTF oral y KTZ crema	53
3.8.3 Pruebas histológicas.....	55
3.8.4 Pruebas de irritación y corrosión	56
3.8.5 Pruebas bioquímicas	57
3.8.6 Análisis estadístico de los resultados.....	57
3.9 Ensayos adicionales	58
4. Resultados.....	58
4.1 Generación de AmA de <i>L. (V.) panamensis</i>	58
4.1.1 Cinética de crecimiento de los parásitos.....	62
4.1.2 Infectividad de parásitos en células THP-1 y en ratones BALB/c.....	63
4.2 Ensayo de actividad anti- <i>leishmania</i>	65
4.3 Ensayo de citotoxicidad en células THP-1	66

4.4 Interacción farmacológica en AmA	67
4.5 Interacción entre MTF y KTZ en células THP-1	68
4.6 Características de las formulaciones utilizadas.....	72
4.7 Eficacia del tratamiento con MTF oral en ratones BALB/c/c infectados con <i>L. (V.) panamensis</i>	73
4.8 Eficacia del tratamiento combinado de MTF oral y KTZ en crema al 3%.....	79
4.9 Efecto del tratamiento en el perfil de los parámetros bioquímicos en suero	83
4.10 Análisis de las lesiones en los diferentes grupos experimentales:	84
4.11 Ensayo de irritación-corrosión de la formulación tipo crema de KTZ al 3%.....	84
5. Ensayos adicionales	86
5.1 Eficacia del tratamiento oral con KTZ en suspensión	86
5.2 Eficacia del tratamiento tópico con KTZ en crema en diferentes concentraciones.....	87
6. Discusión.....	90
7. Conclusiones.....	101
Referencias Bibliográficas	103

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Principales estructuras de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania</i> spp.. Ilustración realizada por Jordy Castillo y Omar Casadiego.....	22
Figura 2. Anatomía del aparato digestivo del vector y proceso de metaciclologénesis. Ilustración realizada por Jordy Castillo y Omar Casadiego.....	23
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. Ilustración realizada por Jordy Castillo y Omar Casadiego.....	25
Figura 4. Diseño metodológico representando las cuatro fases del estudio.	41
Figura 5. Formas parasitarias teñidas con Giemsa.....	60
Figura 6. Caracterización de promastigotes y AmA	61
Figura 7. Infectividad de promastigotes y AmA en ratones BALB/c.....	64
Figura 8. Seguimiento fotográfico del desarrollo de las lesiones en ratones BALB/c generadas a partir de la infección de dos ratones con promastigotes en el primer grupo experimental y con AmA en el segundo grupo.	65
Figura 9. Índices de selectividad para KTZ y MTF para diferentes ratios de combinación.....	72
Figura 10. Ensayo de dosis respuesta de MTF oral en ratones BALB/c infectados.....	75
Figura 11. Seguimiento del área de lesión hasta el sacrificio (semana 7).	76
Figura 12. Estudio histopatológico de láminas de piel teñidas con hematoxilina-eosina.....	77
Figura 13. Cortes histológicos de hígado y bazo teñidos con hematoxilina eosina.....	78

Figura 14. Seguimiento fotográfico al inicio y al final del tratamiento en cuatro grupos experimentales	80
Figura 15. Seguimiento del área de lesión en 4 grupos experimentales durante 8 semanas.....	81
Figura 16. Carga parasitaria en las lesiones de ratones BALB/c determinada mediante dilución limite expresada en parásitos/mg de tejido procesado.....	81
Figura 17. Registro fotográfico del ensayo de irritación-corrosión de la formulación tipo crema al 3% de KTZ.....	85
Figura 18. Estudio histopatológico de irritación-corrosión en piel de formulación de KTZ al 3%. No se observan alteraciones del tejido. (a) 100x (b) 1000x.....	86
Figura 19. Ensayo de dosis respuesta de KTZ oral en ratones BALB/c infectados.	88
Figura 20. Ensayo de dosis respuesta de KTZ en ratones BALB/c infectados.....	89

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Estructuras y características fisicoquímicas de los fármacos empleados en el estudio ..	42
Tabla 2. Determinación del tipo de interacción a partir de la Σ FIC	50
Tabla 3. Grupos experimentales	54
Tabla 4. Características y condiciones de las pruebas bioquímicas en suero	57
Tabla 5. Tiempo de duplicación en promastigotes y amastigotes axénicos	62
Tabla 6. Actividad farmacológica in vitro en promastigotes y AmA	66
Tabla 7. Actividad farmacológica in vitro en células THP-1	66
Tabla 8. Actividad farmacológica combinada de MTF y KET en AmA	67
Tabla 9. Actividad farmacológica combinada de MTF y PM en AmA.....	68
Tabla 10. Actividad farmacológica combinada de MTF y PMD en AmA	69
Tabla 11. Actividad farmacológica combinada de MTF y KTZ en células THP-1	70
Tabla 12. Índices de selectividad en combinaciones de MTF y KTZ en células THP-1	71
Tabla 13. Estabilidad de formulación tipo crema a diferentes temperaturas durante 2 meses	74
Tabla 14. Reporte de lectura de improntas de lesión y estudio histopatológico de bazo e hígado.....	82
Tabla 15. Resultados pruebas bioquímicas realizadas en suero	83

Abreviaturas

ADN:	Acido desoxirribonucleico
ALT:	Alanino aminotransferasa
AmA:	Amastigotes axénicos
AmB:	Anfotericina B
BUN:	Nitrógeno ureico
CC ₅₀ :	Concentración citotóxica 50
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50
CMB:	Cloruro de metilbenzoilo
DE ₅₀ :	Dosis efectiva 50
DMSO:	Dimetilsulfóxido
FA:	Fosfatasa alcalina
<i>FIC</i> :	Concentración inhibitoria fraccional
Gp63:	Glicoproteina 63
IS:	Índice de selectividad
K/X:	Ketamina/Xilacina
LC:	Leishmaniasis cutánea
LCD:	Leishmaniasis cutánea difusa
LDS:	Leishmaniasis cutánea diseminada
LM:	Leishmaniasis mucosa

LPG:	Lipofosfoglicano
LV:	Leishmaniasis visceral
MIX:	Mezclas
MTF:	Miltefosina
MTT:	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OECD:	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PM:	Paromomicina
PMD:	Pentamidina
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
Sb ^V :	Antimoniales pentavalentes
EC:	Estrato córneo
SFB _{ic} :	Suero fetal bovino inactivado con calor
TD:	Tiempo de duplicación
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
ΣFIC:	Sumatoria de la concentración inhibitoria fraccional

Resumen

Título: Efectividad de un tratamiento combinado de miltefosina oral y una formulación tópica conteniendo un fármaco anti-*Leishmania* en lesiones cutáneas de ratones BALB/c producidas por *Leishmania (Viannia) panamensis**

Autor: Casadiego Manosalva Omar**

Palabras Clave: Leishmaniasis cutánea, amastigotes axénicos, ratones BALB/c, *Leishmania Viania panamensis*, tratamientos combinados, miltefosina, ketoconazol

Descripción

Los tratamientos disponibles en leishmaniasis son reducidos, con importantes contraindicaciones y efectos adversos. Los tratamientos utilizando dos medicamentos de aplicación tópica o sistémica constituyen una alternativa.

El objetivo de este trabajo fue determinar la interacción de la miltefosina (MTF) con el sulfato de paromomicina (PM), isetionato de pentamidina (PMD) y ketoconazol (KTZ) en parásitos de *L. (V.) panamensis* y células THP-1 y la eficacia del tratamiento combinado.

Se determinó la actividad de los fármacos por medio del cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en **AmA** y en promastigotes mediante determinación de la viabilidad celular con resazurina. La toxicidad en células fue determinada utilizando MTT como colorante vital. Las interacciones farmacológicas de las combinaciones MTF/KTZ, MTF/PM y MTF/PMD fue determinada mediante ensayo de radio fijo. Para determinar la eficacia de los dos tratamientos, se realizaron ensayos de dosis respuesta con el fin de encontrar la dosis sub-óptima de cada fármaco y después se estableció la eficacia del tratamiento oral y/o tópico de la MTF/KTZ en ratones con leishmaniasis cutánea (LC).

La actividad de los fármacos a nivel del CI₅₀ en **AmA** fue KTZ: 11,35±1,70, MTF:4,12±0,49, PM:152,63±12,98 y PMD: 0,24±0,07 µM y en promastigotes fue KTZ: 2,03±0,81, MTF: 6,33±0,21, PM: 95,57±24,72 y PMD: 0,70±0,29 µM. Los fármacos utilizados mostraron interacciones de tipo aditivo ($\square \sum FIC > 0,5$) en todas las combinaciones evaluadas tanto en **AmA** como en células THP-1. La combinación resultó ser selectiva *in vitro* en células THP-1 con índices de selectividad (IS) superiores a 3. El tratamiento oral con MTF en los ratones fue eficaz mostrando un efecto de dosis respuesta (dosis efectiva DE₅₀ 2,56 mg/kg de peso). El KTZ aplicado tópico u oral no fue efectivo. La terapia combinada de MTF oral en una dosis sub-óptima (2,5 mg/kg de peso) y KTZ tópico en crema al 3% fue igualmente inefectiva.

* Tesis de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de tesis: Patricia Escobar Bact, Ph.D.

Abstract

Titulo: Effectiveness of a combination treatment of oral miltefosine and a topical formulation containing an anti-*Leishmania* drug in skin lesions of BALB/c mice produced by *Leishmania (Viannia) panamensis**

Author: Casadiego Manosalva Omar**

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, axenic amastigotes, BALB/c mice, *Leishmania (Viannia) panamensis*, combination treatments, miltefosine, ketoconazole

Description

The treatments options on leishmaniasis are few, systemic and presented several contraindications and adverse effects. Treatments using two topical or systemic medications constitute an interesting alternative, reducing doses (number and concentration), decrease toxicity and increase effectiveness.

The main aim of this work was to determine miltefosine (MTF)-interactions with paromomycin sulfate (PM), pentamidine isethionate (PMD) and ketoconazole (KTZ) drugs against *Leishmania* and THP-1 cells and to determine the efficacy of oral MTF and topical or oral KTZ treatments in CL on *L. (V.) panamensis*-infected BALB/c mice.

Axenic amastigotes (**AmA**) were obtained and characterized from promastigotes. Drug activity against **AmA** and promastigotes or THP-1 mammalian cells were determined using resazurin and MTT colorimetric test. The inhibitory (or cytotoxic) concentration 50 (IC₅₀) was calculated. The MTF/KTZ, MTF/PM and MTF/PMD pharmacological interactions were determined in **AmA** parasites by fixed-radius assay. A dose response activity of MTF or KTZ treatment alone and the efficacy of both MTF (oral) and KTZ (topical or oral) used at the sub-optimal found dose were determined in CL-infected mice.

The activities of individual drugs at the IC₅₀ level were KTZ: 11.35±1.70, MTF: 4.12± 0.49, PM: 152.63±12.98 and PMD: 0.24±0.07 µM in **AmA** and KTZ: 2.03±0.81, MTF: 6.33±0.21, PM: 95.57±24,72 and PMD: 0.70±0.29 µM in promastigotes. Additive type of interactions ($\square\Sigma\text{FIC} > 0.5$) between two drugs in both **AmA** and THP-1 cells were observed. A selectivity indexes (IS) higher than 3 were calculated. Oral treatment with MTF was effective showing an effective dose DE₅₀ 2.56 mg/kg of weight. Ketoconazole used topical or oral was ineffective. The combined therapy using oral MTF (at the sub-optimal doses of 2.5 mg/kg/weight) and topical 3% KTZ cream was ineffective.

* Thesis of grade

** Faculty of Health. School of Medicine Master in Basic Biomedical Science. Thesis director: Patricia Escobar Bact, Ph.D.

Introducción

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades producida por diferentes protozoarios parásitos del género *Leishmania*, transmitida por la picadura de mosquitos flebótomos. Constituye un problema de Salud Pública en los países endémicos afectando especialmente las poblaciones más vulnerables (Neghina *et al.*, 2010). La forma más común en Colombia y el mundo es la leishmaniasis cutánea (LC), caracterizada por presentar 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).

Todavía no existe una vacuna y los tratamientos (tópicos o sistémicos) constituyen la única alternativa de cura para los pacientes enfermos especialmente los que presentan leishmaniasis visceral la cual es mortal si no se trata a tiempo y para algunos pacientes que se encuentran infectados con parásitos del subgénero *Viannia* dada su capacidad de diseminarse. Los tratamientos actuales son pocos (antimoniales pentavalentes, pentamidina, anfotericina B, miltefosina y paromomicina).

Ninguno tratamiento es totalmente efectivo contra todas las especies de *Leishmania* ni completamente seguro, presentando gran variedad de contraindicaciones y efectos adversos, así como falla terapéutica debido a la aparición de fármacorresistencia entre otras (Oliveira *et al.*, 2011). Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) apremia la búsqueda de nuevas terapias como remplazo de las existentes, así como el desarrollo de terapias combinadas como sustituto de las monoterapias que reduzcan los tiempos de tratamiento y las dosis empeladas,

permitiendo la reducción de los efectos adversos y la aparición de farmacorresistencia (De Morais-Teixeira, Aguiar, Soares de Souza Lima, Ferreira, y Rabello, 2015; OMS, 2012).

Siguiendo las orientaciones de la OMS y con el propósito de encontrar un tratamiento efectivo para la LC especialmente para la producida por una especie involucrada en LC en Colombia como la *L. (V.) panamensis*, nuestro trabajo tuvo como objetivo determinar la interacción de la miltefosina (MTF) con el sulfato de paromomicina (PM), isetionato de pentamidina (PMD) y ketoconazol (KTZ) en parásitos de *L. (V.) panamensis* y células THP-1 *in vitro* y la eficacia del tratamiento combinado de MTF aplicada oralmente y el KTZ utilizado tópicamente u oral utilizados en dosis sub-óptimas de MTF, en ratones infectados.

El presente manuscrito muestra en su primera parte una revisión bibliográfica donde se incluyen algunas generalidades sobre el agente causal de la leishmaniasis, su formas clínicas y aspectos epidemiológicos. Adicionalmente, se recopilan características metabólicas de los **AmA** y promastigotes. Posteriormente se describe en mayor detalle la LC haciéndose énfasis en los tratamientos, sus complicaciones y perspectivas presentándose las terapias de tipo combinada como una de ellas. Se explican algunas generalidades de estas y de las diferentes interacciones que pueden presentarse en las combinaciones farmacológicas.

En cuanto a la metodología, se presenta el diseño metodológico empleado, el cual contó con cuatro fases de desarrollo. Inicialmente se generaron los **AmA** de *L. (V.) panamensis* los cuales fueron caracterizados tanto en su morfología, como en su crecimiento, infectividad y susceptibilidad farmacológica (fase I). Posteriormente se evaluó la actividad antileishmania de la MTF (sola o combinada) en los parásitos y en células THP-1 (fase II). Se realizaron ensayos de dosis respuesta de la MTF en ratones con el fin de determinar la dosis sub-óptima (fase III) y se

determinó la efectividad y toxicidad del tratamiento combinado de MTF con otro fármaco en ratones con LC (fase IV).

Entre los fármacos candidatos para ser aplicados tópicamente se contaban con el KTZ, la PM y la PMD. Su selección dependió de los resultados obtenidos en los ensayos de interacción farmacología y toxicidad *in vitro*, de los resultados previos del laboratorio y de la disponibilidad de este. El KTZ fue elegido el fármaco a evaluar en los ensayos *in vivo*. Debido a los resultados obtenidos, se realizaron algunos experimentos adicionales orientados todos a mejorar la efectividad del KTZ. Estos experimentos y sus resultados se encuentran al final del documento.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo servirán de base para la evaluación de terapias combinadas en el modelo de una especie de *Leishmania* del género *Viannia* en condiciones experimentales.

1. Marco Teórico

1.1 Leishmaniasis

1.1.1 Generalidades: La leishmaniasis es un conjunto de patologías causadas por protozoarios del género *Leishmania* pertenecientes a la familia Tripanosomatidae, que afecta humanos y algunos reservorios mamíferos. Los reservorios principales incluyen mamíferos como la zarigüeya, osos perezosos, armadillos, perros, roedores, simios y murciélagos (Roque y Jansen, 2014). Es transmitida por insectos flebótomos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* en el Nuevo

y Viejo Mundo, respectivamente. La enfermedad es endémica en 98 países alrededor del mundo con más de 350 millones de personas en riesgo de padecerla. Se presentan aproximadamente 0,2 a 0,4 millones de casos de leishmaniasis visceral (LV) y 0,7 a 1,2 millones de casos de LC anualmente (Alvar *et al.*, 2012; Chatelain y Ioset, 2011). Las formas clínicas van desde lesiones cutáneas localizadas, infecciones de las mucosas asociada a destrucción de los tejidos infectados y formas graves que incluyen la disfunción de órganos internos como hígado, medula ósea y bazo (McGwire y Satoskar, 2014 Jha, Sah, Shah, y Sah, 2013; Neghina *et al.*, 2010). La LC se presenta en países como Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopia, Costa Rica y Perú y la LV en países como India, Bangladesh, Sudan, Etiopia y Brasil, y afecta varios órganos como bazo, e hígado (Alvar *et al.*, 2012). La leishmaniasis mucosa (LM) se presenta casi exclusivamente en el continente americano, asociada a infecciones producidas por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, que ocurre cuando el parásito se disemina desde el sitio inicial de infección hasta las mucosas del individuo ocasionando grave destrucción del tejido sino se recibe adecuado tratamiento (Scorza, Carvalho, y Wilson, 2017).

Con respecto a LC, en Colombia en el año 2016, se reportaron un total de 7777 casos (98,4%) siendo el departamento de Antioquia el que concentraba el mayor número de casos (1575 casos). El departamento de Santander presentó un total de 490 casos de LC (SIVIGILA, 2016). Las especies causantes de LC en el país, según lo reportado por Ramirez *et al* (2016), de 327 aislamientos de 22 departamentos de Colombia, 201 aislamientos (61,3%) corresponden a *L. (V.) panamensis*, 88 (27,1%) a *L. (V.) braziliensis*, 2 (0,6%) de *L. lainsoni*, 3 (0,9) a *L. (V.) guyanensis*, 12 (4%) de *L. (L.) infantum*, 2 (0,6%) de *L. equatorensis*, 8 (2,1%) de *L. (L.) mexicana*, 9 (2,8%) de *L.(L.) amazonensis* y 2 (0,6) de *L. (V.) colombiensis* (Ramírez *et al.*, 2016). Otro estudio realizado por Patino *et al* (2017) en casos de L.C en militares, 135 casos (61,1%) fueron causados

por *L. (V.) braziliensis*, 74 casos (33,5%) por *L. (V.) panamensis*, 8 (3,6%) casos por *L. (V.) guyanensis*, 3 (1,4%) por *L. (L.) mexicana* y 1 (0,4%) caso por *L. (V.) lainsoni* (Patino *et al.*, 2017).

1.1.2 Ciclo de vida y formas parasitarias: El parásito presenta dos estadios claramente diferenciados: Los promastigotes extracelulares encontrados en el intestino y las piezas bucales del vector invertebrado y los amastigotes intracelulares en las células fagocíticas del hospedero mamífero (Montalvo, Fraga, Maes, Dujardin, y Van der Auwera, 2012). A medida que los promastigotes ascienden por el tracto digestivo del vector, las formas procíclicas altamente replicativas, pero de baja infectividad, van modificando su morfología y metabolismo. Al llegar al aparato bucal, los promastigotes procíclicos se han transformado completamente a promastigotes metacíclicos, no replicativos, con un flagelo de mayor longitud y más infectivos (da Silva *et al.*, 2015).

Durante el proceso de metaciclogénesis, ocurren diferentes cambios en la expresión de moléculas tales como la glicoproteína 63 (gp63) y los lipofosfoglicanos (LPG), componiendo el glucocálix que rodea al parásito asociado este con la virulencia y supervivencia del parásito (Thiakaki, Kolli, Chang, y Soteriadou, 2006; Soares *et al.*, 2005).

El proceso de infección en el mamífero ocurre mediante la inoculación del parásito durante la alimentación del flebotomino. El parásito es fagocitado por macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, donde comienza su transformación a amastigote (forma replicativa intracelular) (Al-Kamel, 2017). La infección es favorecida por las moléculas de LPG y gp63, la inhibición de la proteína cinasa C y la inactivación celular de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) entre otros (Lodge, Diallo y Descoteaux, 2006).

La amastigogénesis ocurre con la transformación de los promastigotes en amastigotes intracelulares, inmóviles y de cuerpo celular redondeado, adaptando su metabolismo a la captación y procesamiento de los nutrientes disponibles en el fagolisosoma. Con el fin de infectar de manera crónica al hospedero, el parásito ha desarrollado mecanismos para prevenir la activación de una respuesta inmune efectiva, mediante el remodelamiento del fagolisosoma, interfiriendo en la señalización intracelular, alteración de las vías de respuesta de los receptores *Toll-like*, modulación de citoquinas y quimioquinas, modificación de la respuesta de células T y bloqueo de la generación de óxido nítrico y ROS (Gupta, Oghumu, y Satoskar, 2013; Olivier, Gregory, y Forget, 2005).

1.1.3 Metabolismo del parásito: Los análisis transcriptómicos (ARN mensajeros o transcriptos presentes en una célula, tejido u organismo), demuestran que la mayoría de genes están expresados constitutivamente en los amastigotes y promastigotes (Depledge *et al.*, 2009). Sin embargo, estos se encuentran regulados diferencialmente a la baja en los amastigotes (*down regulated*) en comparación con los promastigotes, sugiriendo que los primeros representan un estadio de crecimiento restringido (Alcolea *et al.*, 2010).

Mecanismos de síntesis de *novo* de algunas moléculas como las poliaminas, pirimidinas y ácidos grasos están presentes en los parásitos, sin embargo, son incapaces de sintetizar el anillo de purina a partir de precursores por lo que necesitan tomarlo de la célula hospedera mediante mecanismos de transporte (Lee, Stephens, y Englund, 2007).

El transporte e internalización de moléculas son mecanismos de gran importancia para la sobrevivencia del parásito en el ambiente intracelular; (Naderer y McConville, 2007; Lodge *et al.*, 2006; Naderer *et al.*, 2006). Los parásitos pueden captar poliaminas y aminoácidos mediante

transporte activo ligado al importe de protones debido al microambiente ácido del fagolisosoma (Geraldo, Silber, Pereira, y Uliana, 2005; Hasne y Ullman, 2005).

Una de las vías para la captura de nutrientes desde el medio extracelular es la endocitosis, mecanismo vital para el parásito ya que su bloqueo impide la transformación de promastigotes procíclicos en promastigotes metacíclicos, siendo dicha transformación esencial para la infectividad y sobrevivencia de los parásitos (Sébastien Besteiro, Williams, Morrison, Coombs, y Mottram, 2006). La inhibición de la expresión de proteínas homologas a las proteínas adaptoras de la clatrina, proteína clave en la endocitosis mediada por receptores en las células e importante en la formación del endosoma, resulta en la no generación de parásitos viables en el ambiente intracelular del macrófago en modelos experimentales (Gokool, 2003).

A pesar que los amastigotes muestran un repertorio enzimático similar a los promastigotes, estudios bioquímicos han demostrado marcadas diferencias en el uso de fuentes de carbono (Hart y Coombs, 1982). Estudios realizados por Burchmore *et al* (2003) y Feng *et al* (2009) demostraron que los amastigotes de *L. (L.) mexicana* deficientes en la expresión de transportadores de hexosas fueron incapaces de proliferar en macrófagos, sugiriendo la importancia de este monosacárido como fuente de carbono de los amastigotes intracelulares (Burchmore *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2009).

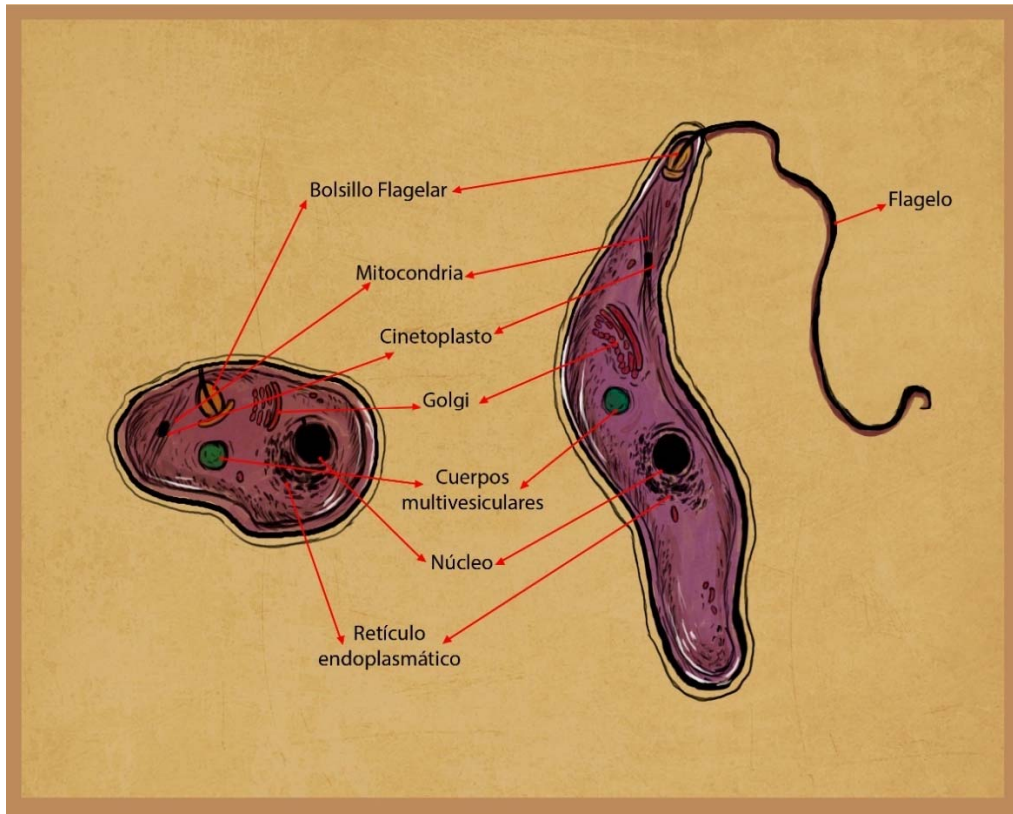


Figura 1. Principales estructuras de promastigotes y amastigotes de *Leishmania spp.*. Ilustración realizada por Jordy Castillo y Omar Casadiego

Aunque los amastigotes poseen la capacidad de utilizar vías gluconeogénicas, los parásitos son incapaces de crecer en ausencia de glucosa exógena, esto puede deberse a que la síntesis de *novo* es insuficiente para suplir las necesidades energéticas del parásito y por lo tanto es necesaria su captura mediante transportadores (McConville, de Souza, Saunders, Likic, y Naderer, 2007; Thomas Naderer y McConville, 2011). La ausencia de transportadores de glucosa en *L. (L.) mexicana* mostró un efecto negativo sobre la virulencia de la forma intracelular del parásito (Burchmore *et al.*, 2003). El transporte de azúcares resultaría ser necesaria para alimentar vías del metabolismo de carbohidratos, importantes en la termo-tolerancia y equilibrio *redox* (Thomas Naderer, Wee, & McConville, 2008; Sernee *et al.*, 2006).

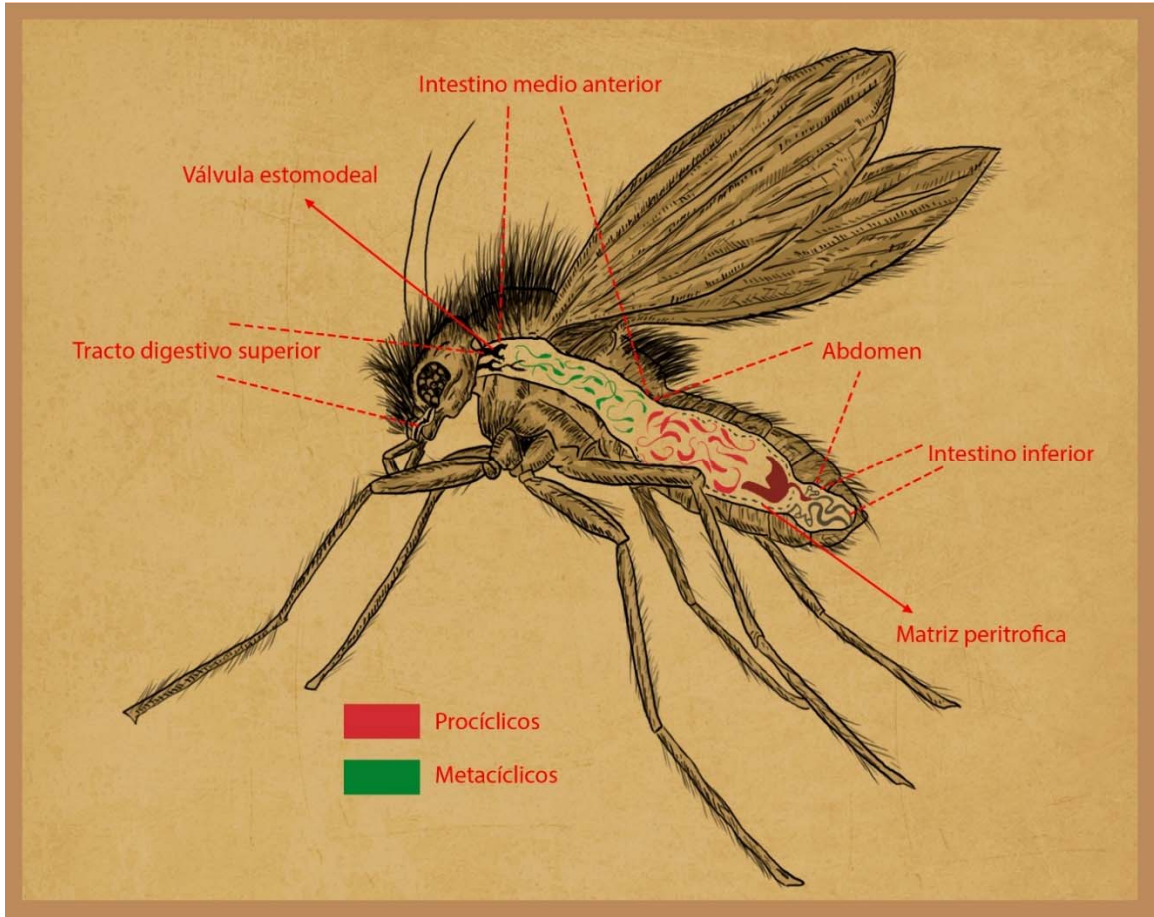


Figura 2. Anatomía del aparato digestivo del vector y proceso de metacicloogénesis. Ilustración realizada por Jordy Castillo y Omar Casadiego

En comparación con los promastigotes, los amastigotes muestran un menor nivel de captura de glucosa y un mayor nivel de captura de aminoácidos y ácidos grasos (Kloehn, Saunders, O'Callaghan, Dagley, & McConville, 2015a). Los amastigotes expresan todas las enzimas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos, sugiriendo que los lípidos productos de la degradación de las lipoproteínas de la membrana del fagolisosoma podrían ser utilizados como fuente carbono y energía (Hart & Coombs, 1982). A pesar de esto, estudios en el genoma de *L. major*, demuestran la carencia de dos enzimas claves en la vía del glicoxilato, la cual es requerida

para la conversión del acetil-CoA, en azúcares. Dicho hallazgo sugiere que los amastigotes son incapaces de utilizar ácidos grasos como fuente de carbono (Ivens et al., 2005).

Los aminoácidos pueden ser obtenidos mediante la proteólisis de las proteínas contenidas en el fagolisosoma y/o de las proteínas exógenas internalizadas mediante endocitosis y autofagia por este orgánulo (Antoine, Prina, Lang, & Courret, 1998; Schaible et al., 1999) Besteiro, Tonn, Tetley, Coombs, y Mottram, 2008).

La formas axénicas de amastigotes (**AmA**), mantenidas sin células hospederas han mostrado características similares a los amastigotes intracelulares en términos morfológicos (Eperon y McMahon-Pratt, 1989). La generación de los **AmA** se ha logrado en varias especies de *L. (L) mexicana*, *L. donovani*, *L. major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* (N. Gupta, Goyal, y Rastogi, 2001). Esto se ha realizado modificando algunas condiciones de cultivo como la temperatura, el pH del medio, porcentaje de CO₂ y el suplemento con nutrientes específicos como la hemina (Teixeira *et al.*; 2002; N. Gupta *et al.*, 2001). La caracterización de los **AmA** incluye la evaluación de su morfología, cinética de crecimiento, infectividad y metabolismo (Gupta *et al.*, 2001).

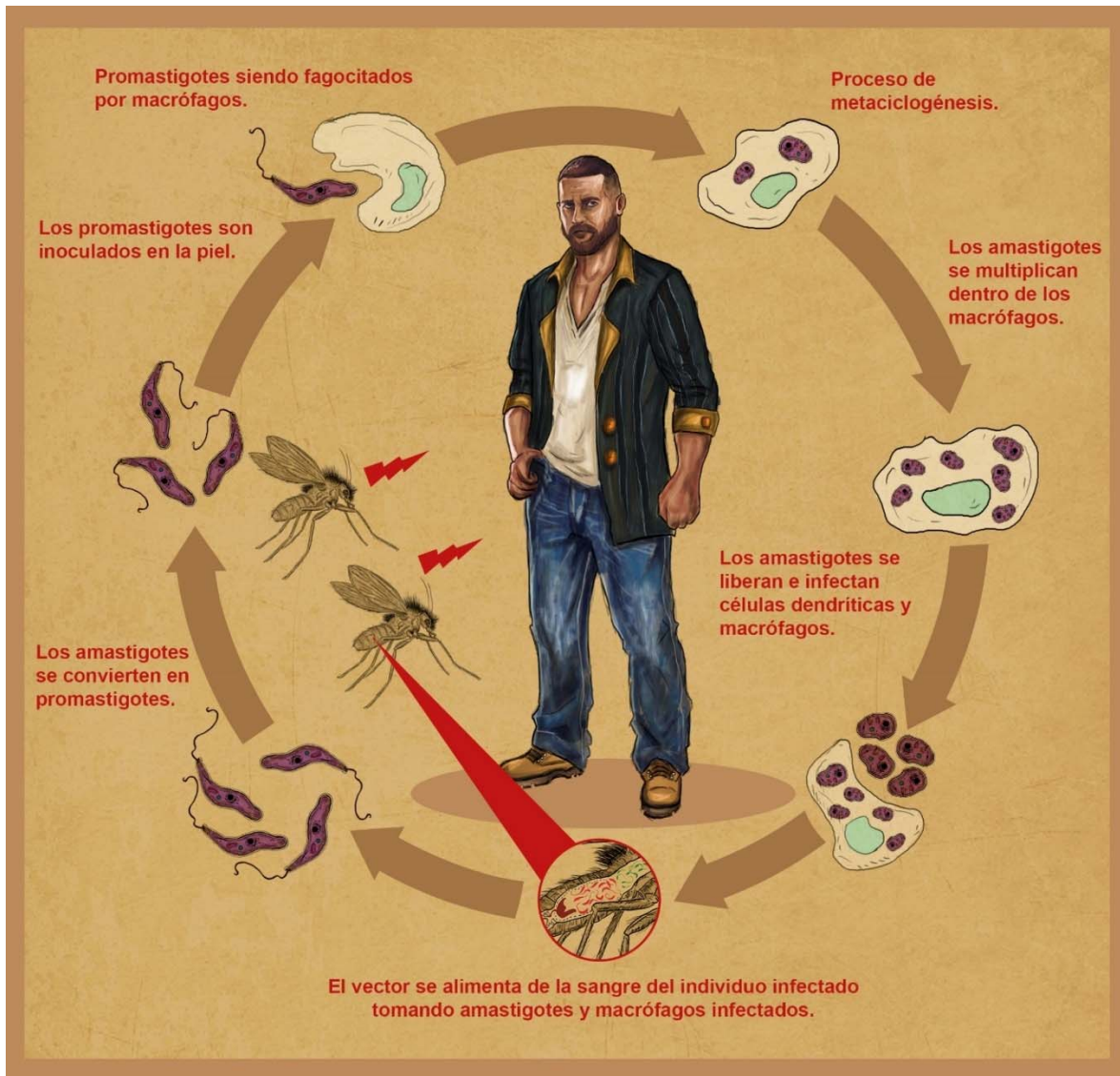


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Ilustración realizada por Jordy Castillo y Omar Casadiego

1.1.4 Leishmaniasis en piel y mucosas: Las manifestaciones clínicas en la LC dependen de la especie de *Leishmania* involucrada y del sistema inmune del hospedero. En general las lesiones comienzan con un pequeño enrojecimiento en el sitio de inoculación del parásito que aumenta paulatinamente de tamaño, evolucionando a placas, pápulas y nódulos, junto con engrosamiento de la piel (Pearson y Sousa, 1996). Las lesiones pueden ser únicas o múltiples, pudiéndose

desarrollar linfadenopatía como un signo temprano en infecciones ocasionadas por algunas especies, especialmente por *L. (V.) braziliensis* (Barral *et al.*, 1995).

El tiempo de evolución de la LC es variable, presentándose desde un par de semanas hasta varios meses después de la picadura, cambiando su tamaño y apariencia a través del tiempo (Hochedez y Caumes, 2008; Schwartz, Hatz, y Blum, 2006). Con el tiempo, pueden aparecer úlceras de fondo limpio, indoloras con bordes levantados, redondeados y definidos (Unger *et al.*, 2009). Pueden presentarse lesiones ulceradas, abiertas susceptibles a sobreinfección por biota normal de la piel o externa (Ziaei, Sadeghian y Hejazi, 2008). Después que el parásito es eliminado por el sistema inmunológico del individuo y/o el tratamiento, la lesión cicatriza siendo esta una marca que algunas veces estigmatiza a los pacientes (OMS, 2016;McGwire y Satoskar, 2014; Schubach, Marzochi, *et al.*, 1998).

Aunque la lesión de la LC es indolora, la malformación de la lesión puede generar inconformidad y estrés y ser dolorosa en caso de sobreinfección (Karimkhani *et al.*, 2016). La curación estética de la lesión no se relaciona necesariamente con la eliminación del parásito (cura parasitológica), siendo posible la detección de ADN parasitario después de un tratamiento efectivo y curación clínica (Schubach *et al.*, 1998).

Con la aparición de la epidemia del VIH, aumentaron la aparición de casos de formas atípicas de LC, como la leishmaniasis difusa (LD) la cual se caracteriza por el desarrollo de lesiones múltiples satélites que pueden fusionarse formando placas que cubren grandes áreas de la piel. Son lesiones con alta carga parasitaria y sin tendencia a ulcerarse (Goto y Lindoso, 2010). Otra forma poco común de LC es la leishmaniasis diseminada (LDS), caracterizada por un gran número de lesiones pleomorfas en dos o más regiones anatómicas no continuas (Goto y Lindoso, 2010).

Debido a la ausencia de parásitos en los nódulos linfáticos, se sospecha que la diseminación del parásito podría ocurrir por el torrente sanguíneo, pudiendo decantar en lesiones similares a la leishmaniasis mucosa (LM) en 44% de los casos de LDS (Machado *et al.*, 2011). En Colombia, Vélez *et al* (2015) recopilaron 27 casos de LDS entre el 1997 y 2015 con un número de lesiones por paciente que variaban entre 12 a 294. Del total de casos, 58% fueron ocasionados por *L. (V.) panamensis* (Vélez, Jiménez, Vásquez, y Robledo, 2015).

La LM se presenta como una complicación de la LC, ocasionada principalmente por especies del subgénero *Viannia* (Scorza, Carvalho, y Wilson, 2017). En la LC aparecen lesiones metastásicas en la superficie de las mucosas, aparato respiratorio superior y tracto digestivo (Pearson y Sousa, 1996). Con su progresión, la LM puede causar grave desfiguración y destrucción del tejido infectado. Debido a la respuesta contra los parásitos mediada por las células T y otras células inflamatorias, la carga parasitaria en el sitio de lesión es baja (Ridley, De Magalhaes, y Marsden, 1989). En Colombia, se reportaron un total de 122 casos de LM durante el año 2016 (SIVIGILA, 2016).

1.2 Tratamiento de la leishmaniasis (sistémicos y tópicos)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tratamiento debe ser administrado teniendo en cuenta la historia clínica del paciente (edad, sexo, número y tiempo de evolución de las lesiones, enfermedades base, cardiopatías, alteraciones renales o hepáticas entre otros), la especie de parásito infectante y la procedencia de los pacientes (OMS, 2010).

En Colombia, los tratamientos de primera elección para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis, incluyendo la LC son los antimoniales pentavalentes (Sb^V) como el antimonioato de

N-metil glucamina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®) (INS, 2010). Los mecanismos de acción de los Sb^V no son del todo claros. Se propone que actúan como profármacos, donde los Sb^V son reducidos mediante el glutatión, tripeptino no proteico, de la célula hospedera, o por el complejo tripanotona por parte del parásito a Sb^{III} . Este compuesto resultante tiene una mayor actividad anti-*Leishmania* (Haldar *et al.* 2011).

Amastigotes expuestos a Sb^{III} presentan una inducción a procesos similares a la apoptosis mediante estrés oxidativo, despolarización mitocondrial y aumento del Ca^{2+} a nivel intracelular (Sudhandiran y Shaha 2003; Mukherjee *et al.* 2002). Otro modelo sugiere un efecto intrínseco del Sb^V mediante la inhibición de la glicolisis y la beta oxidación de ácidos grasos en los amastigotes, así como en el bloqueo de la enzima tripanotión reductasa, esencial para el equilibrio *redox* del parásito (Haldar *et al.*, 2011; Herman, Gallalee, y Best 1987).

Se utiliza en dosis de 20 mg/kg de peso durante 20 días para LC y de 28 días para casos de LMC o LV, administrado parenteralmente. Los efectos adversos de los Sb^V incluyen: dolor de cabeza, dolor en el sitio de aplicación, vomito, náuseas, mialgias, artralgias y cételata; presentando adicionalmente toxicidad a nivel de riñón, hígado y corazón (INS, 2010).

Los medicamentos de segunda elección están indicados cuando existe falla terapéutica a los Sb^V o cuando el uso de estos está contraindicado, como en el caso de presentarse alteraciones base en el paciente como problemas cardiacos, hepáticos y/o renales, así como encontrarse en embarazo. Estos son: el isetionato de pentamidina (PMD), la miltefosina (MTF) la anfotericina B (AmB) y sus formas liposomales (AmB-L como el complejo lipídico de AmB, la suspensión coloidal de AmB y la AmB liposomal) y el sulfato de paromomicina (Botero, Puentes-Herrera, y Cortés, 2014; INS, 2010)

La PMD es un derivado de las diaminas aromáticas. Uno de sus posibles sitios de acción es la mitocondria del parásito causando alteraciones morfológicas y condensación y disrupción del kinetoplasto (Yang, Choi, y No 2016; Croft y Brazil, 1982). Su actividad ha estado asociada a su capacidad de inhibir el transporte de poliaminas tal y como fue observado en *Trypanosoma cruzi* y *L. major* (Díaz *et al.*, 2014). La PMD utilizada en dosis de 2mg/kg de peso aplicadas intramuscularmente por siete días, ha mostrado una efectividad del 96% en casos de LC ocasionada por *L.(V.) panamensis* y *L.(V.) braziliensis* (Soto, Mancipe, Grogl, y Berman 1993). Los principales efectos adversos de la PMD son dolores en músculo esquelético, anorexia, dolores abdominales, náuseas, vómito, dolores de cabeza, astenia, fatiga y daño a nivel de páncreas que puede decantar en una diabetes mellitus insulino-dependiente (Oliveira *et al.*, 2011; Liegl, Bogner, y Goebel, 1994).

La AmB, es un antibiótico poliénico utilizado en el tratamiento de micosis superficiales y profundas y en casos de falla terapéutica o contraindicaciones de los Sb^V por falla hepática, renal o cardíaca (INS, 2010; OMS, 1996). Es utilizada principalmente en el tratamiento de la LV demostrándose su efectividad en varios ensayos clínicos (Mishra, Singh, Choudhury, Singh, y Khan, 1991; Thakur *et al.*, 1991). La AmB liposomal puede aplicarse intrahospitalariamente por vía intravenosa en una sola dosis de 10 mg/kg de peso para el tratamiento de casos LV (Sundar y Chakravarty, 2010). La AmB tiene la capacidad de unirse con el ergosterol y formar poros en la membrana celular, además inducir la generación de ROS, causando muerte celular (Mohapatra, 2014).

Existen reportes en los la forma liposomal de la AmB es utilizada en el tratamiento de la LC, encontrándose buenos niveles de curación, pero presentándose efectos adversos como la toxicidad renal, limitando su uso de manera extendida (Wortmann *et al.*, 2010; Ramos y Segovia, 1997).

La necesidad de un tratamiento oral, seguro y efectivo en el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis, llevó a la aprobación e implementación de la MTF como un fármaco de segunda elección en su tratamiento. Este fármaco fue implementado inicialmente como un tratamiento localizado de la metástasis cutánea del cáncer de mama y en su forma oral en el tratamiento de otros tipos de cáncer (Sindermann y Engel, 2006). La susceptibilidad a la MTF en *Leishmania* es dependiente de la forma parasitaria y de la especie implicada. Esto se correlaciona con la variabilidad de la respuesta clínica (Dorlo, Balasegaram, Beijnen y de Vries, 2012).

La MTF, adicionalmente, presenta actividad antiviral (VIH-1) e inmunomoduladora; ocasionando, además, alteraciones en el metabolismo de los éteres de fosfolípidos y ácidos grasos, modificando la composición de la membrana parasitaria (Rakotomanga, Saint-Pierre-Chazalet, y Loiseau, 2005). También se ha identificado que induce mecanismos similares a la apoptosis, resultado en fragmentación del ADN y pérdida del volumen celular (Moreira, Leprohon, y Ouellette, 2011). A nivel mitocondrial, el fármaco ocasiona inhibición del citocromo C oxidasa y alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial (Santa-Rita, 2004). Sus principales limitaciones son su alto costo, necesidad de monitoreo debido a sus efectos adversos a nivel gastrointestinal, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogenicidad. Adicionalmente, su vida media larga puede ocasionar la generación de fármaco-resistencia (Dorlo et al. 2012).

La LC también puede ser tratada de manera localizada, utilizando tratamientos físicos como la crioterapia, termoterapia, fototerapia e irradiación laser. La termoterapia, por ejemplo, consiste en la aplicación local de calor con un dispositivo electromagnético generador de ondas de alta frecuencia (OMS, 2016). El inconveniente con los tratamientos localizados radica en su efectividad variable, la dificultad de disponer de los equipos en zonas rurales, lo doloroso de la intervención, teniendo en cuenta que se requiere de varias sesiones de tratamiento (OMS, 2010).

Existen tratamientos tópicos que contienen fármacos con actividad anti-*Leishmania* (cremas, ungüentos, geles), que permiten la liberación del fármaco directamente en el sitio de lesión, evitando así las complicaciones de la administración sistémica, requiriendo menores dosis, aumentando la relación costo efectividad y reduciendo los efectos adversos (Garnier y Croft 2002). Fármacos como el Imiquinod®, una amina imidazoquinolina con efecto inmunomodulador, puede ser encontrado de manera comercial en forma de crema al 5% (Aldara®). Se han realizado estudios en el que se utiliza dicha formulación en el tratamiento de la LC. En un ensayo clínico realizado en Perú en el año 2004, el tratamiento combinado de Glucantime con la crema, demostró ser efectivo en el tratamiento de las lesiones cutáneas, al obtenerse porcentajes de curación del 72% después de tres meses de tratamiento en comparación con el 35% obtenido para el grupo control (Glucantime+ la crema conteniendo el vehículo sin el fármaco). Algunos de los efectos adversos encontrados fueron: edema y eritema (Miranda, Llanos, Arevalo, Ward y Matlashewski, 2005).

La PM es utilizada de manera parenteral y en formulaciones tópicas. La aplicación sistémica (intramuscular) de la PM, antibiótico oligosacárido del grupo de los aminoglucósidos, ha mostrado efectividad en el tratamiento de LV en la India (Reithinger *et al.*, 2007). Se ha comprobado *in vitro* que la PM inhibe la síntesis mitocondrial y citoplasmática de proteínas además de aumentar la rigidez de la membrana mediante la estimulación del reciclado y la síntesis de lípidos polares (M Maarouf, de Kouchkovsky, Brown, Petit, y Robert-Gero, 1997; Mohammad Maarouf, Lawrence, Croft, y Robert-Gero, 1995). Para el tratamiento de la LC, se utilizan las formas tópicas de la PM. Los primeros en realizar estudios con este tipo de formulaciones fue El-On, Jacobs, Witztum, y Greenblatt (1984), quienes utilizaron una combinación de PM al 15 % en combinación con 12 % de Cloruro de metilbenzoilo (CMB) en estudios experimentales, curando lesiones producidas por L. major en ratones BALB/c (El-On, Jacobs, Witztum, y Greenblatt, 1984).

La formulación PM-MBC también fue ensayada en Ecuador en el año 1994, encontrando porcentajes de curación del 85% después de 20 días de tratamiento (Krause y Kroeger 2016). Otro ensayo clínico realizado en Guatemala, encontró curación en 31 de los 35 pacientes con lesiones cutáneas tratados (85,7%) (Arana, Mendoza, Rizzo, & Kroeger, 2001). En Colombia se utilizó un esquema combinado de tratamiento con Glucantime durante 7 días, encontrándose niveles mayores de curación (84%) en los pacientes tratados solamente con Glucantime y 20% en los pacientes tratados con la terapia combinada (Soto et al., 1998). La formulación es manufacturada comercialmente por TEVA *Pharmaceuticals* (Sosa et al., 2013). Algunos efectos adversos de su uso a nivel tópico incluyen irritación, prurito y formación de vesículas en el sitio de aplicación. Esto puede ser debido al vehículo utilizado en la formulación (Garnier y Croft 2002).

Formulaciones conteniendo otros vehículos han sido ensayadas: Una combinación de PM al 15 % junto con urea al 10% embebido en parafina fue evaluada en diferentes países. En Honduras lesiones no ulcerativas fueron tratadas con esta formulación tópica, resultando ser inefectivo en el tratamiento de dichas lesiones (Neva et al., 1997). En Irán, en el año 1995, lesiones cutáneas son tratadas con la misma formulación, encontrándose nuevamente la baja efectividad del tratamiento (Asilian et al., 1995). El tratamiento de lesiones cutáneas en el modelo murino no demostró ser satisfactoria debido a la reaparición de las lesiones en el 30 % de los individuos catalogados como curados después de 20 días de tratamiento (Soto, Hernandez, Mejia, Grogl y Berman, 1995). La combinación de PM-MBC demostró ser más efectiva cuando fue combinada con gentamicina en el tratamiento de ratones BALB/c infectados con *L. major* (Carter, Alexander y Baillie, 1989). Posteriormente se generaría una patente de un vehículo conteniendo 15% PM y 0,5 % de gentamicina (Garnier y Croft, 2002). En modelos de infección *in vivo* el tratamiento tópico

combinado con gentamicina fue más efectivo que las formulaciones tópicas de PM-MBC o PM-urea; curando el 100% de las lesiones después de 20 días de tratamiento causadas por diferentes especies de *Leishmania*, sin presentar reaparición de las úlceras después de 70 días de observación (Grogl, Schuster, Ellis, y Berman, 1999). Ensayos clínicos de fase 2 utilizando la formulación fueron realizados en Panamá en el tratamiento de la LC por *L. (V.) panamensis* en el año 2013 encontrándose un índice de curación del 87% para los individuos tratados con la formulación de PM-gentamicina, en comparación con el 60% para el grupo tratado solo con PM tópica (Sosa et al., 2013).

En Colombia se realizó un estudio piloto de fase dos donde se realizó la aplicación tópica de PM-gentamicina, obteniéndose un 61% de curación para el tratamiento en comparación con el 55% de los individuos con placebo. El tiempo de curación fue menor para el grupo tratado que para el no tratado (Soto et al., 2002). De las tres formulaciones tópicas conteniendo PM, formulación PM-gentamicina es la que menores efectos adversos produce, presumiblemente debido al vehículo que utiliza (Ben Salah et al., 2013; Sosa et al., 2013).

El KTZ es un antimicótico de la familia de los azoles utilizado de manera oral en el tratamiento de la LC (López y Barco, 2016). Sus blancos farmacológicos a nivel celular son la síntesis de ergosterol inhibiendo la conversión del lanosterol y alteraciones en la membrana celular (Mohapatra, 2014). Comercialmente existe cremas de KTZ conteniendo el fármaco en una concentración de 2% utilizado en el tratamiento de las micosis superficiales. Un ensayo clínico realizado en Irán en el cual se trataban lesiones cutáneas producidas por *Leishmania* spp. con KTZ en crema al 2% durante 20 días se encontró un porcentaje de curación del 15,7% en comparación con el 14,3% obtenido para el grupo tratado con una crema placebo (Momeni, Aminjavaheri y Omidghaemi, 2003). En Colombia, un total de 16 pacientes fueron divididos en dos grupos: unos

recibieron una combinación de 800 mg de KTZ diariamente más una aplicación simultánea de KTZ en crema al 2% durante un mes; el segundo grupo recibió 400 mg de KTZ oral durante dos meses. El primer grupo logró una curación completa mientras que el segundo grupo, 4 pacientes de 16, llegaron a una curación clínica en el tiempo de tratamiento. Los autores concluyen que el tratamiento con KTZ no constituye una alternativa adecuada en el tratamiento de la LC (Restrepo, Gomez y Restrepo, 1997).

1.3 Formulaciones tópicas y su aplicación en piel

La efectividad de un tratamiento tópico depende en parte del sistema farmacéutico utilizado el cual debe permitir la absorción y distribución del fármaco en el sitio donde se encuentra el parásito. La piel representa aproximadamente el 10% de la masa corporal, siendo el órgano con mayor extensión del cuerpo humano. La piel provee una protección entre el cuerpo y el medio ambiente, controlando la pérdida de agua y previniendo la entrada de sustancias y microorganismos dañinos (Fyhrquist, Salava, Auvinen y Lauerma, 2016). Está compuesta por tres capas: la epidermis (50-100 μm), dermis (1-2 mm) y la hipodermis (1-2 mm). La capa más superficial de la epidermis es el estrato córneo (EC) el cual constituye la principal barrera biológica que protege al cuerpo de agresiones externas (físicas, químicas, mecánicas y biológicas). Tiene un grosor de 10-20 μm y está compuesto de múltiples capas (de 15 a 20) de células aplanadas y no nucleadas llamadas corneocitos los cuales están compuestos principalmente de filamentos de queratina.

Algunas alteraciones del EC generan un aumento en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos como mecanismo de defensa para restaurar el tejido lo cual influye en la absorción normal de los fármacos.

La absorción de los compuestos depende, entre otros, de las características estructurales de la piel. Diferencias entre la piel de animales de laboratorio y humanos en cuanto al contenido de lípidos, la estructura y grosor del EC y al número de faneras, afectan el grado de absorción de un mismo compuesto (Veccihia y Bunge 2006; Gopferich y Lee 1991). Alteraciones en la matriz externa del EC (por detergentes, productos cosméticos o patologías como algunas infecciones por hongos y la LC) llevan a cambios en la composición lipídica de la membrana externa, comprometiendo su función barrera (Lee, Lim, Kim, An, y Lee, 2012; Elias y Menon, 1991).

Los sistemas farmacéuticos de aplicación tópica presentan una atractiva alternativa de entrega de fármacos en LC. Estas pueden ser divididas en: cremas, geles, emulsiones, lociones, soluciones, pastas, polvos y parches transdérmicos. Las cremas son emulsiones semisólidas de aceite en agua compuestas de pequeñas gotas de aceite dispersas en una fase continua acuosa o de gotas de agua dispersas en una fase continua de aceite. La elección del tipo de crema a utilizar depende de la naturaleza fisicoquímica del fármaco. También se encuentran las microemulsiones, compuestas usualmente de agua, aceite y surfactantes, la cuales son sistemas coloidales en donde gotas o cristales están dispersas en un líquido. El surfactante forma una monocapa que interactúa entre el agua y el aceite. Los geles también son sistemas coloidales compuestos de una base sólida dispersa en una fase líquida. Los geles pasan de un estado sólido (en reposo) a un estado fluido cuando son agitados (Niazi, 2004).

1.3.1 Terapias combinadas en el tratamiento de la leishmaniasis : El uso combinado de dos o más tipos de tratamiento de manera simultánea han demostrado ser una estrategia útil y válida en el tratamiento de las distintas formas de la leishmaniasis al permitir reducir dosis, tiempos de tratamiento y efectos adversos de los fármacos (Trinconi, Reimão, Yasunaka, Miguel, y Uliana,

2014). Una terapia combinada, también permitiría una reducción en el número de las dosis y disminución del riesgo de aparición de resistencia y falla terapéutica en los individuos tratados (Bryceson, 2001). Una estrategia ideal en el tratamiento combinado comprende el uso de un fármaco potente, de vida media corta, con gran capacidad de disminución de la carga parasitaria en el sitio de lesión junto con un fármaco de vida media más prolongada que impida la recuperación de los niveles de carga parasitaria (Singh, Singh, Chakravarty, y Sundar, 2016). En la práctica, la eficacia del tratamiento se ve afectada por factores propios de la farmacocinética y farmacodinamia del fármaco, así como por su capacidad de ser internalizado por el macrófago y ejercer su actividad anti-*Leishmania* (Zulfiqar, Shelper, y Avery, 2017).

El uso de Sb^V (20 mg/kg de peso) en combinación con PM (15 mg/kg) durante 17 días, administrados intramuscularmente, mostró una eficacia y seguridad similar al tratamiento con Sb^V por 30 días en un estudio realizado con pacientes del África Oriental (Musa *et al.*, 2012). La combinación de una sola dosis de AmB (5mg/kg) con MTF a 100 mg/kg de peso por 14 días no resultó ser más efectiva que su uso individual (Sundar *et al.*, 2008). Sin embargo la combinación de MTF junto con PM y AmB logró niveles de efectividad superiores al 97% (Sundar *et al.*, 2011).

La combinación de alopurinol con Sb^V durante 15 días en pacientes infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* resultó estadísticamente más efectiva que el uso del Sb^V individual (Martinez y Marr, 1992). Contradictoriamente, González *et al* (2009) reportó mayor efectividad del tratamiento con alopurinol en LC por *L. (V.) panamensis* (González *et al.*, 2009). El tratamiento de Pentoxifilina® oral combinada con Sb^V fue más efectivo que el tratamiento individual en lesiones por *L. (V.) braziliensis* (Machado *et al.*, 2007).

El uso tópico de inmunomoduladores como el Imiquinod® o el factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos en combinación con Sb^V en pacientes infectados con LC aceleraron

el tiempo de curación de las lesiones disminuyendo las secuelas de la enfermedad (Miranda *et al.*, 2015) . En dos estudios clínico independiente realizados por Soto *et al* (1998 y 1995), el tratamiento tópico de PM con Sb^V inyectable por 7 días mostró curación en el 90% de pacientes (similar al tratamiento individual con Sb^V) en el primer estudio y del 58% (no superior al tratamiento individual con Sb^V) en el segundo (Soto *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1995). Ensayos experimentales han demostrado la efectividad de la PM tópica combinada con dosis subóptimas de Sb^V y MTF en hámster infectados con *L. (V.) braziliensis* (De Moraes-Teixeira *et al.*, 2015). Combinaciones entre tratamientos físicos y farmacológicos como el uso de termoterapia junto con Sb^V por 28 días mostró bajos porcentajes de curación (5,9%) para el grupo de tratamiento combinado y 10% para el grupo tratado solamente con el Sb^V (Lobo *et al.*, 2006).

1.3.2 Interacciones farmacológicas: Los fármacos pueden generar diferentes tipos de interacciones al ser combinados en un sistema biológico; estas interacciones pueden ser sinérgicas, aditivas o antagónicas. Una combinación es sinérgica cuando produce un efecto mayor, aditiva cuando es similar o igual y antagónico cuando es menor a la sumatoria de los efectos de los fármacos de manera individual (Chou, 2006). En general, las combinaciones farmacológicas que presentan fenómenos de potenciación y/o sinergismo presentan ventajas como aumento de la eficacia en comparación con el tratamiento individual, disminución de las dosis del tratamiento y, consecuentemente, disminución de los efectos adversos ocasionados por el mismo (Kitano 2007; Zimmermann, Lehár, y Keith 2007).

Existen varios métodos analíticos para la determinación la naturaleza de la interacción entre dos fármacos, incluyendo el índice de combinación, análisis de efecto fraccional, análisis de isobogramas, índice de interacción y análisis del efecto medio del fármaco, entre otros (Jia *et al.*,

2009). En el estudio de las interacciones de fármacos con actividad anti-*Leishmania* ha sido utilizado con éxito el análisis de isobogramas, el cual es un procedimiento gráfico en el que se usan proporciones fijas (*Fixed ratio*) de cada uno de los agonistas, combinando proporciones de ambos fármacos (LOEWE, 1953). Los niveles de efecto comúnmente utilizados en la construcción del isobograma son la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), la concentración inhibitoria 90 (IC₉₀), la dosis efectiva 50 (ED₅₀) y la dosis efectiva 90 (ED₉₀).

El efecto producido por las dosis individuales de cada fármaco es graficado como intercepto en un plano Cartesiano en cada uno de los ejes. La línea trazada entre los dos interceptos representa al isobolo (línea de equivalencia o no interacción), que consiste en las dosis que dan un determinado efecto cuando no existe interacción entre ambos fármacos (Gessner y Cabana, 1970). Al demandar evaluar múltiples radios fijos de una combinación, se requiere la determinación del tipo de interacción para cada punto, estando el isobograma limitado debido a que no se puede aplicar un análisis por regresión de mínimos cuadrados (R J Tallarida y Raffa, 1996). Por tal razón, el mejor modelo para analizar cada una de los radios es trabajar con las concentraciones inhibitorias fraccionales (FIC, por sus siglas en inglés), calculado al dividir el nivel de efecto evaluado (IC₅₀, IC₉₀, EC₅₀, EC₉₀) del fármaco en combinación con el efecto para el fármaco solo. Para dos fármacos que interactúan, la sumatoria de sus FICs ($\sum FIC$) expresa el nivel de interacción entre dichos fármacos (Hall, Middleton, y Westmacott, 1983). Se considera sinergismo cuando la $\sum FIC$ es $\leq 0,5$, antagonismo cuando es $> 4,0$ y que no existe interacción entre los fármacos evaluados cuando presenta valores superiores a 0,5 hasta 4,0 (Odds, 2003).

1.3.3 Fármacos sinérgicos en LC : Investigadores han identificaron cierto nivel de sinergismo entre la MTF-Sb^V *in vitro* y entre MTF-PM y la MTF-AmB en ratones infectados con *L. donovani*

(Seifert y Croft, 2006). Otro medicamento que actúa sinérgicamente con la MTF es la amiodarona, un inhibidor de los canales de potasio y sodio que afecta la síntesis del ergosterol en la membrana de *Leishmania*. Esta interacción fue observada en amastigotes intracelulares y en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* presentando una cura del 90% (Serrano et al., 2009). Andrade *et al* (2016), evaluaron la actividad combinada del Ezetimibe® con KTZ y miconazol. La combinación mostró un efecto sinérgico en promastigotes y un efecto aditivo en amastigotes intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

Haughan *et al* (1992) demostraron que la combinación de lovastatina, un inhibidor de la HMGCoA reductasa y miconazole, es sinérgica en promastigotes de *L. (L.) amazonensis* (Haughan *et al.*, 1992).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Determinar la efectividad de un tratamiento combinado de MTF oral con un tratamiento tópico conteniendo PM, PMD o KTZ en lesiones cutáneas de ratones BALB/c producidas por *L. (V.) panamensis*

2.2 Objetivos específicos

- Establecer el tipo de interacción farmacológica in vitro de la MTF con PM, PMD y KTZ en amastigotes y promastigotes de *L. (V.) panamensis*
- Evaluar la citotoxicidad de diferentes proporciones de combinación de MTF con PM, PMD y KTZ en células derivadas de leucemia monocítica aguda (THP-1)
- Establecer la dosis sub-óptima del tratamiento con MTF oral en ratones con LC.
- Examinar la actividad individual y combinada de un tratamiento oral con MTF y un tratamiento tópico conteniendo un fármaco anti-*Leishmania* (KTZ, PMD O PM) en la evolución de lesiones cutáneas de ratones BALB/c causadas por *L. (V.) panamensis*
- Determinar la irritación y/o corrosión de los tratamientos en ratones BALB/c

3. Materiales y Métodos

En este estudio tipo experimental se evaluó la actividad individual y combinada de medicamentos de referencia en leishmaniasis.

3.1 Diseño experimental

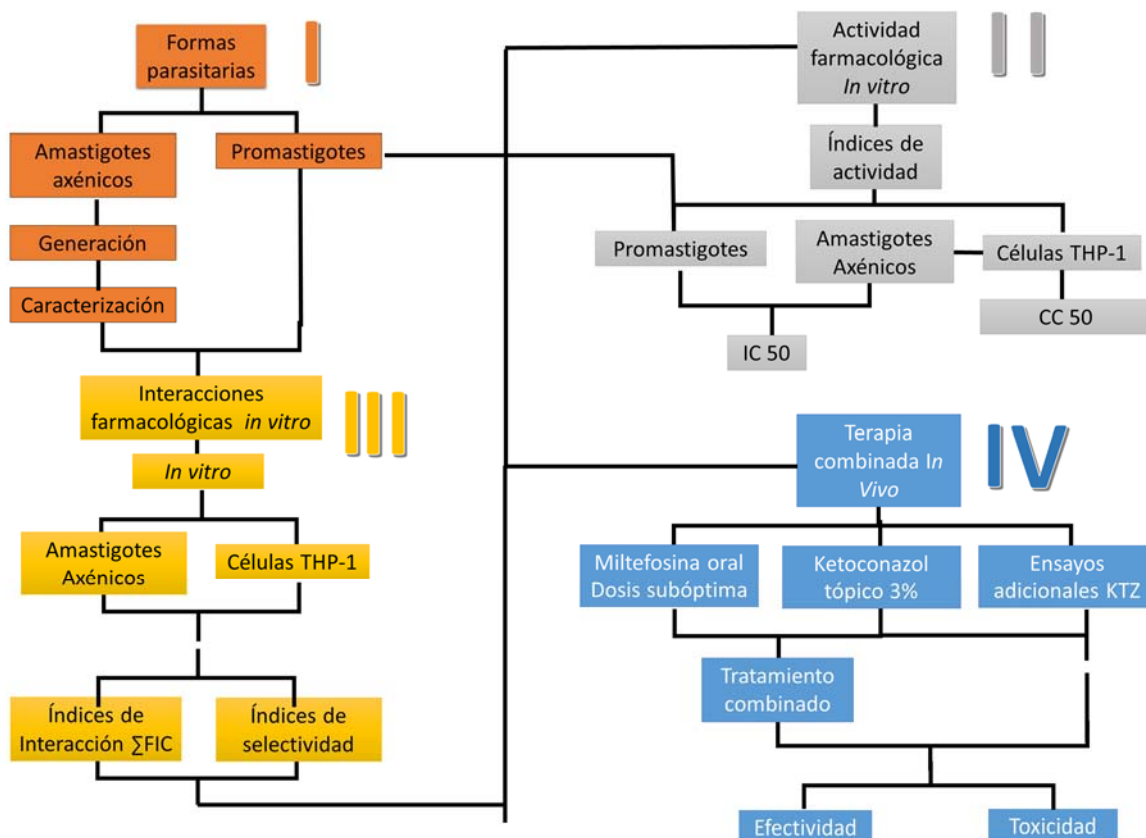


Figura 4. Diseño metodológico representando las cuatro fases del estudio.

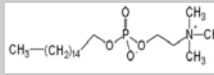
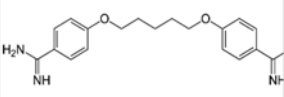
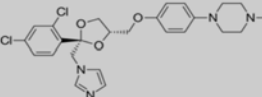
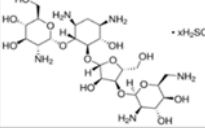
3.2 Fármacos y reactivos

Los fármacos evaluados en este trabajo son: MTF, PMD, KTZ y PM, todos obtenidos de Sigma-Aldrich, St Louis, USA. Para la determinación de la viabilidad celular mediante métodos colorimétricos se utilizaron: el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Sigma) eosina amarilla (Merck, Darmstadt, Alemania) y *Alamar Blue*® (Sigma-Aldrich). Para el cultivo y mantenimiento de las formas parasitarias y las células THP-1 se emplearon los medios de cultivo

Schneider's *Insect* (Sigma-Aldrich) y RPMI 1640 (Gibco, New York, USA); suplementados con suero fetal bovino inactivado al calor (SFB_{ic}; Gibco,). Para la preparación de la base para las cremas se utilizó ácido esteárico triple, monoesterado de glicerilo y trietanolamina, adquiridos de Suquín Ltda, Bucaramanga, Colombia y ácido oleico y *trans*- β -cariofileno. Los ratones fueron sedados con xilacina (Virbac, México) y ketamina (Holliday-Scott S.A, Buenos Aires, Argentina), K/X. Las soluciones *stock* fueron preparadas disolviendo el KET y la PMD en dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, España) y la MTF y la PM en medio de cultivo. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio de cultivo un día antes de los ensayos. En la tabla 1 se muestran las estructuras químicas y características fisicoquímicas de los fármacos empleados.

Tabla 1.

Estructuras y características fisicoquímicas de los fármacos empleados en el estudio

Nombre	MTF	PMD	KTZ	PM
Estructura				
PML (g/mol)	407,576	592,679	531,434	713,706
Formula	C ₂₁ H ₄₆ NO ₄ P	C ₂₃ H ₃₆ N ₄ O ₁₀ S ₂	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	C ₂₃ H ₄₇ N ₅ O ₁₈ S
pKa	1,88	12,13	6,75	12,23
Carga	0	2	0	5
Solubilidad				
en agua	0,00022	0,0236	0,0866	79,7
(mg/mL)				

Nota: MTF: miltefosina. PMD: pentamidina. KTZ: ketoconazol. PM: paromomicina. PML: peso molecular.

3.2.1 Formas farmacéuticas: Se prepararon diferentes formas farmacéuticas (solución oral, suspensión oral y crema) de MTF y KTZ. Las soluciones de MTF fueron preparadas en tapón fosfato salino (PBS, pH 7,1), la suspensión de KTZ en PBS (pH 7,1) y agar noble al 3% y la crema de KTZ fue preparada fundiendo el ácido esteárico triple (4,4% p/p), ácido oleico (1,7% p/p) y monoesterado de glicerilo (1,4% p/p) a 65°C y posteriormente adicionando la trietanolamina (0,6% p/p) y agua tipo I (78,4% p/p). El KTZ fue disuelto en DMSO y agregado a la base. Como potenciadores de la permeación se utilizó el *trans*- β -cariofileno (0,5% p/p) y como antioxidante la vitamina E (0,1% p/p). Todos los componentes de la crema fueron mezclados por agitación magnética (Velp Sicientifica, Usmate, Italy) hasta homogenizar. Las formulaciones de uso oral fueron almacenadas a -20°C y la crema fue almacenada a temperatura ambiente en frascos ámbar hasta el momento de su uso. Se prepararon vehículos de las formulaciones sin KTZ.

Para la caracterización fisicoquímica de la crema se determinó el color, aspecto, homogeneidad de la formulación una hora después de preparada. El pH fue determinado utilizando un pHmetro digital (Starter3100/Ohaus®, Parsippany, USA). La estabilidad de las fases de la formulación se determinó utilizando capilares de micro hematocrito los cuales se llenaron con las formulaciones y se dejaron en posición vertical durante 24 horas. La separación de fases se evaluó visualmente y se realizaron registros fotográficos. La estabilidad de la formulación fue evaluada después de 30 días a diferentes temperaturas (37, 28 y 4°C), registrándose modificaciones en el color, textura, pH y homogeneidad (separación de las fases) (Guo, Shalaev, y Smith, 2013).

3.3 Parásitos y células

Se utilizó una cepa de *L. (V.) panamensis* (ATCC, MHOM/PA/71/LS94) y la línea celular humana derivada de leucemia monocítica aguda (THP-1, ATCC TIB 202). Los promastigotes fueron mantenidos en medio de cultivo Schneider complementado con 10% de (SFBic) a una temperatura de 28°C en incubadora ambiental. Los amastigotes axénicos (**AmA**) fueron generados a partir de promastigotes sub-cultivados en alta densidad (20×10^6 promastigotes/ml) y con aumento gradual de la temperatura (1°C por minuto) de 28°C a 32°C durante 7 días en medio Schneider suplementado al 20% de SFBic en incubadora sin CO₂. Los parásitos fueron sub-cultivados cada 7 días en las condiciones descritas previamente. La línea celular THP-1 se mantuvo en medio de cultivo RPMI 1640 al 10% de SFBi con unas condiciones de cultivo de 37°C, 5% de CO₂, 95% de humedad.

3.4 Generación de amastigotes axénicos (AmA)

Los promastigotes en fase estacionaria (7 días de cultivo) a una concentración de 20×10^6 promastigotes/ml fueron colocados en placa de 12 pozos. Se realizó aumento gradual de la temperatura (1°C por hora) de 28°C a 32°C durante 7 días en medio Schneider suplementado al 20% de SFBic. Durante la generación, se realizaron extendidos diarios en láminas de vidrio de los parásitos los cuales fueron fijados con metanol y coloreados con Giemsa. Las características morfológicas fueron analizadas microscópicamente teniendo en cuenta: la agrupación (individual, duplas, cadenas); la forma del cuerpo celular (elongada, circular, ovoide); el flagelo (presente, ausente, restringido al bolsillo flagelar). Las características morfológicas de los **AmA** fueron

comparadas con la de los promastigotes (N. Gupta *et al.*, 2001; Hodgkinson, Soong, Duboise, y McMahon-Pratt, 1996). Las formas de **AmA** obtenidas fueron comparadas con las formas intracelulares obtenidas después de infectar células THP-1 con promastigotes (Ver adelante, prueba de infectividad)

3.4.1 Cinética de crecimiento: Los promastigotes y **AmA** a una densidad celular de 1×10^6 parásitos/ml fueron colocados en una placa de cultivo celular de 12 pozos a 28°C y 32°C respectivamente. El número de parásitos fue determinado por recuento microscópico en hemocitómetro utilizando eosina amarilla al 0,25% para distinguir las células vivas (no toman el colorante) de las muertas (citoplasma teñido) durante 10 días. Los recuentos diarios fueron expresados en número de parásitos/ml y representados gráficamente con la concentración de parásitos en el eje de las ordenadas y los días de cultivo en el de las abscisas. Adicionalmente, se determinó el tiempo requerido por los promastigotes y **AmA** para doblar su número. Esto se definió como tiempo de duplicación (TD) y fue calculado como sigue:

$$TD = (\Delta + t) / [3,39(\log N - \log N_0)]$$

Dónde,

$\Delta + t$: Delta positivo de dos tiempos durante la fase exponencial de crecimiento

$\log N - \log N_0$: Logaritmo base 10 de la concentración final menos el logaritmo base 10 de la concentración inicial de parásitos, ambas durante la fase exponencial de crecimiento.

Las características morfológicas de los **AmA** fueron comparadas con la de los promastigotes mediante tinción con Giemsa, cada día por los 10 días de transformación. Las características morfológicas evaluadas incluyen la presencia de flagelo y forma celular.

3.4.2 Infectividad de promastigotes y AmA en células THP-1: Las células THP-1 en su fenotipo adherente (transformadas con forbol miristato acetato, PMA) fueron infectadas con promastigotes y **AmA** de *Leishmania* con 7 días de sub-cultivo (fase estacionaria de crecimiento) empleando una concentración de 6×10^6 parásitos/ml con un ratio de célula: parásito de 1:10. Después de 24, 48 y 72 horas a 32°C, 5% de CO₂, las células fueron lavadas, fijadas con metanol y coloradas con Giemsa. Una célula infectada era considerada cuando presentaba al menos un amastigote intracelular. El porcentaje de infección se determinó mediante el recuento de células infectadas en un total de 300 células contadas.

Para determinar la infectividad de promastigotes y **AmA** en ratones BALB/c se tuvo en cuenta la reglamentación y disposiciones éticas para el manejo de animales se encuentran más adelante en el ítem “Animales de experimentación”.

Ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron infectados en la región lumbosacra mediante la inoculación sub-cutánea de promastigotes o **AmA** de *L. (V.) panamensis* ($2,5 \times 10^6$ parásitos/ml) con dos ratones/grupo. Se realizó seguimiento semanal por registro fotográfico de las lesiones y medición de sus ejes mayor y menor utilizando un medidor digital (Tracedable®, VWR, Radnor, USA). El área de la lesión fue calculada como sigue:

$$\text{Área de lesión} = (\text{Eje Mayor})(\text{Eje Menor}) (\pi)$$

3.5 Ensayo de actividad anti-*Leishmania*

Con el fin de determinar la actividad *in vitro* de la MTF, KTZ, PM y PMD en promastigotes y **AmA**, parásitos de cuarto día de sub-cultivo a una concentración de 2×10^6 parásitos/ml fueron tratados con diferentes concentraciones de cada uno de los fármacos mencionados. Se dejaron

pozos sin fármaco ni parásito como controles. Las placas fueron incubadas en las condiciones descritas anteriormente durante tres días. Con el fin de determinar la acción de los fármacos sobre la viabilidad de los parásitos, se utilizó la técnica colorimétrica con *AlamarBlue* donde el compuesto (rezasurina) es reducido por las células vivas. El cambio de color fue cuantificado utilizando un lector de placas Multiskan™ Go (Thermo Fisher, Waltham, USA) a las longitudes de onda de 570 y 600 nm. A partir de las absorbancias resultantes, se determinaron los porcentajes de reducción del compuesto para cada uno de los pozos como sigue (Biorad, 2017.):

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

Donde,

O1: Coeficiente de extinción molar (E) del *AlamarBlue* oxidado (Azul) a 570 nm

O2: E del *AlamarBlue* oxidado a 600 nm

R1: E del *AlamarBlue* reducido (rojo) a 570 nm

R2: E del *AlamarBlue* reducido 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

Posterior a la obtención de los porcentajes de reducción, los porcentajes de inhibición se calcularon como sigue:

$$\% \text{Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{\% \text{Reducción células tratadas}}{\% \text{Reducción Control Positivo}} \right) \right] * 100$$

Finalmente, la actividad de los fármacos en promastigotes y **AmA** de *L. (V.) panamensis* fue representada en términos de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) definida como aquella capaz de

inhibir el crecimiento celular en un 50% y calculada mediante regresión no lineal (sigmoidea) empleando el *software* Mxlfít™ (ID Bussiness Solution, UK®)(Neira, Stashenko, y Escobar, 2014).

3.6 Ensayo de citotoxicidad en células THP-1

Diferentes diluciones de MTF, KTZ, PM y PMD fueron evaluados en células THP-1 con el fin de obtener la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), aquella capaz de reducir la viabilidad de las células en un 50%. Inicialmente, las células son diferenciadas a su fenotipo adherente utilizando PMA en placas de cultivo celular de 96 pozos con fondo plano. Se cultivaron a 37°C durante tres días en medio de cultivo RPMI 1640. Una vez diferenciadas, las células se expusieron a diluciones seriadas para cada fármaco durante tres días. La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante método colorimétrico utilizando MTT, compuesto cuya reducción mitocondrial fue cuantificada por lectura de absorbancia a 580 nm. El cálculo del porcentaje de inhibición fue calculado aplicando la siguiente fórmula según lo descrito en (Neira *et al.*, 2014):

$$\%Inhibicion = 100 * \left(\frac{Absorbancia (Controles) - Absorbancia (celulas tratadas)}{Absorbancia (Controles)} \right)$$

Las CC₅₀ fueron calculadas mediante regresión no lineal (sigmoidea) empleando el software Mxlfít™. El índice de selectividad (IS) fue hallado dividiendo la CC₅₀ en células/ CC₅₀ en parásitos; IS de tres o superior fueron consideradas selectivas (mayor actividad en parásitos que en células de mamífero) (Neira *et al.*, 2014).

3.6 Interacción farmacológica de la MTF en AmA

Una vez obtenidos los resultados de actividad individual para cada uno de los fármacos se procedió a evaluar la actividad de las siguientes combinaciones: MTF-PMD, MTF-KTZ y MTF-PM en **AmA**. Las combinaciones fueron preparadas utilizando los siguientes radios: 5:0; 4:1; 3:2; 2:3; 1:4 y 0:5. De cada radio se realizaron diluciones seriadas con un factor (1:2) de cada radio en placa de cultivo celular de 96 pozos, tomando como concentración inicial la IC50 del fármaco, multiplicada por un factor de 3. La adición del parásito, las condiciones y tiempos del cultivo y la determinación de la actividad (CI₅₀) se realizó como se describió previamente en los ensayos de actividad individual.

Para determinar el tipo de interacción farmacológica presentada en las diferentes combinaciones se calculó la sumatoria de la concentración inhibitoria fraccional (Σ FIC) de ambos fármacos por radio de combinación (Hall *et al.*, 1983)

$$\Sigma\text{FIC}(\text{radio}) = \left[\left(\frac{\text{CI50 (A)}}{\text{CI50}'(\text{A})} \right) + \left(\frac{\text{CI50 (B)}}{\text{CI50}'(\text{B})} \right) \right]$$

Dónde,

CI₅₀: Actividad de uno de los fármacos en combinación (4:1, 3:2, 2:3 o 1:4)

CI₅₀': Actividad individual (5:0 o 0:5)

A: Primer fármaco de la combinación

B: Segundo fármaco de la combinación

El tipo de interacción presente en la combinación se calculó a partir del promedio de Σ FIC de todos los radios, interpretándose como se muestra en la tabla 2 (Odds, 2003).

Tabla 2.

Determinación del tipo de interacción a partir de la ΣFIC

Valor ΣFIC	Tipo de interacción	Interpretación
$\leq 0,5$	Sinérgica	Efecto de potenciación (mayor a la sumatoria de los efectos individuales)
$0,5-4,0$	Aditiva	Efecto resultante de la combinación igual a la sumatoria de los efectos individuales
$> 4,0$	Antagónica	Efecto resultante de la combinación menor los efectos individuales

Los resultados fueron expresados gráficamente por medio de un isoblograma, el cual se construyó a partir de la actividad (CI_{50}) de los fármacos individuales y en combinación. El isobolo, o línea de función aditiva teórica es el resultante de la unión lineal entre las CI_{50} de la acción individual de los fármacos, ubicándose las CI_{50} para los diferentes radios de combinación como puntos en el gráfico, permitiendo analizar su posición con respecto al isobolo (Ronald J Tallarida, 2006).

3.7 Ensayos de toxicidad en células

La combinación MTF-KTZ en cada uno de sus radios de combinación (5:0; 4:1; 3:2; 2:3; 1:4 y 0:5) fueron evaluados en células THP-1 con el fin de obtener la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), aquella capaz de reducir la viabilidad de las células en un 50%. Inicialmente, las células son diferenciadas a su fenotipo adherente utilizando PMA en placas de cultivo celular de 96 pozos con fondo plano. Se cultivaron a 37 °C durante tres días en medio de cultivo RPMI 1640. Una vez diferenciadas, las células se expusieron a diluciones seriadas de cada radio de combinación por

tres días. La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante método colorimétrico utilizando MTT, compuesto cuya reducción mitocondrial fue cuantificada por lectura de absorbancia a 580 nm. El cálculo del porcentaje de inhibición fue calculado aplicando la siguiente formula según lo descrito en (Neira *et al.*, 2014):

$$\%Inhibicion = 100 * \left(\frac{Absorbancia (Controles) - Absorbancia (celulas tratadas)}{Absorbancia (Controles)} \right)$$

Las CC₅₀ fueron calculadas mediante regresión no lineal (sigmoidea) empleando el software MxIifit™. Se obtuvieron las ΣFIC e isobogramas. El índice de selectividad (IS) fue hallado dividiendo la CC₅₀ en células/ CC₅₀ en parásitos; IS de tres o superior fueron consideradas selectivas (mayor actividad en parásitos que en células de mamífero) (Neira *et al.*, 2014).

3.8 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones BALB/c adquiridos del bioterio del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS). El estudio contó con el aval del Comité de Ética en la Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CENCI). Para garantizar la inocuidad de los ensayos y el bienestar de los roedores, el alojamiento de los animales se realizó en jaulas con presión negativa en jaulas ventiladas individualmente y con encamado esterilizado. Se les suministro comida y agua potable *ad libitum*. El área de mantenimiento contaba con controles de temperatura (20°C), humedad relativa ambiental (59%) y luminosidad (ciclo día-noche de 12 horas).

La aleatorización se realizó utilizando el recurso Web *Research Randomizer* (<https://www.randomizer.org>). El número de grupos generados fue uno (1), con un rango igual al número de ratones disponibles para infectar. El número de ratones asignado al grupo fue igual a N+1, siendo N el tamaño de muestra obtenido a partir de la prueba piloto (dosis-respuesta MTF).

Cada número asignado al grupo se mantuvo como único. Se realizó una asignación numérica a cada ratón con un método mínimamente invasivo (marcaje en la cola). La aleatorización fue efectuada eligiendo los ratones con los números arrojados por la herramienta Web, los cuales fueron apartados e infectados.

3.8.1 Ensayo de dosis respuesta en MTF oral: Estos experimentos fueron realizados con el fin de determinar la actividad y la dosis sub-óptima de la MTF administrada oralmente. Los ratones infectados fueron tratados oralmente (mediante sonda) con diferentes dosis del fármaco en concentraciones de 30, 15, 7,5, 2,5, 0,83 y 0,27 mg/kg de peso por 15 días, una dosis diariamente. Los ratones tratados presentaban de 7 a 8 semanas de infección.

La dosis efectiva 50 (DE_{50}) definida como aquella dosis que reduce un 50% el área de la lesión, fue determinada mediante regresión no lineal (sigmoidea) aplicada a los porcentajes de reducción del área de lesión obtenidos para cada dosis. La dosis sub-óptima fue definida como la máxima dosis dada que no produce curación estética (desaparición de la lesión) (De Moraes-Teixeira *et al.*, 2015).

El registro fotográfico de las lesiones y la medición del área se realizó semanalmente. Después del periodo de tratamiento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical previa sedación con X/K. La lesión fue extraída en su totalidad mediante corte con bisturí. Se realizaron improntas en láminas portaobjetos realizando un extendido de la parte inferior de la lesión, aquella en contacto con el tejido muscular del ratón, mediante el uso de pinzas metálicas. Posteriormente, se tomaron biopsias de la lesión, bazo e hígado las cuales fueron conservadas en formalina taponada al 10% para estudios histopatológicos.

Los datos del área de las lesiones fueron normalizados mediante el cálculo del porcentaje de reducción del área de lesión como sigue:

$$\% \text{ de reducción del Área de Lesión} = \frac{(A_i - A_f) * 100}{A_i}$$

Donde,

A_i : Área de la lesión al inicio del tratamiento

A_f : Área de la lesión finalizado el seguimiento

Al presentarse curación estética de las lesiones, se efectuó seguimiento 15 días adicionales una vez finalizado el tratamiento con el fin de establecer si se presentaba re aparición de las lesiones.

3.8.2 Tratamiento combinado de MTF oral y KTZ crema: La actividad individual y combinada de un tratamiento oral de MTF y un tratamiento tópico (en lesiones cutáneas) con una crema de KTZ al 3% fue determinada.

Inicialmente se determinó el número de muestras por grupo experimental. Para esto se tuvieron en cuenta los datos obtenidos en el ensayo de dosis-respuesta con MTF oral, considerando una probabilidad de error tipo I (falso positivo) de 0,05 y un poder de prueba del 80% como sigue (Motulsky, 2010),

$$\text{Tamaño de muestra por grupo} = \frac{2 (Z_{\alpha/2}^{\alpha} + Z^{\beta})^2 \times P (1 - P)}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde,

$Z_{\alpha/2}$: $Z_{0.05/2} = Z_{0.025} = 1.96$ para una probabilidad de error tipo I del 5%

Z^{β} : $Z_{0.20} = 0.842$ para un poder de prueba del 80%

$p_1 - p_2$: Diferencia entre los porcentajes de reducción de área de lesión entre grupos

P: Prevalencia agrupada= (porcentaje de reducción de área de lesión en un grupo tratado + porcentaje de reducción de área de lesión en el grupo control] /2

Los ratones infectados fueron tratados según lo descrito en la tabla 3:

Tabla 3.

Grupos experimentales

Código	Grupo experimental	N	Duración del tratamiento
KTZ 3%	KTZ tópico al 3%	2	8 semanas
KTZ 3% +MTF 2,5 mg/kg peso	KTZ tópico al 3% + MTF oral 2,5 mg/kg peso	2	8 semanas
Control negativo	Sin tratamiento oral ni tópico	2	8 semanas

Nota: KTZ: ketoconazol, MTF: miltefosina.

Para determinar la eficacia del tratamiento se consideró la curación estética y parasitológica. La curación estética fue considerada cuando se presentaba un aplanamiento y reepitelización de la lesión, con reducción total del área de lesión. La cura parasitológica fue definida como la ausencia total de parásitos en improntas, carga parasitaria y cortes histológicos de piel.

Después del sacrificio se realizaron las improntas y se recolectaron las biopsias según lo descrito anteriormente. Adicionalmente, se determinó la carga parasitaria mediante dilución límite. Para esto, un fragmento de la lesión fue pesado, colocado en medio Schneider y homogenizado con el embolo de una jeringa de un mililitro. Después de 10 minutos se tomó el sobrenadante. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 las cuales se dejaron en placas de cultivo celular de 96 pozos (mínimo 16 pozos por dilución) por 8 días a 28°C. La presencia de parásitos fue establecida bajo

criterios de turbidez y motilidad, en microscopio invertido. El cálculo del número de parásitos por mg de tejido procesado se realizó como sigue (Titus, Marchand, Boon, y Louis, 1985),

$$m = \frac{(-\ln F0)(fd)}{mgt}$$

Donde,

m: Carga parasitaria (número de parásitos/mg de tejido)

F0: Porcentaje de pozos negativos

fd: Factor de dilución

mgt: Peso del tejido procesado (mg)

3.8.3 Pruebas histológicas: Los tejidos almacenados en formalina al 10% fueron procesados en el laboratorio del Departamento de Patología en la Facultad de Salud de la UIS. Inicialmente, tanto lesiones como órganos (bazo e hígado) fueron cortados por su eje mayor y almacenados en casetes para biopsia. Los tejidos fueron parafinados y posteriormente se realizaron cortes de tres micras utilizando un micrótopo de sistema manual rotativo recuperándose éste en baño de flotación a una temperatura de 56,7°C en láminas de vidrio. Un primer paso de eliminación de la parafina se llevó a cabo durante 30 minutos a una temperatura de 70°C, seguido por tres baños de xilol (70, 80 y 90% v/v) durante 4 minutos en cada baño. El xilol fue eliminado mediante paso de la lámina por alcoholes (98% v/v). Finalmente, las láminas fueron coloreadas con hematoxilina y eosina durante 30 segundos (Rodríguez, Conde, Mantilla, y Escobar, 2013).

Para las láminas de lesión cutánea, se estudiaron algunas variables como: 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); infiltrado granulomatoso (inflamación productiva compuesta por células gigantes, epiteloides rodeada de linfocitos); fibrosis (formación o desarrollo del tejido conectivo fibroso como bandas vacuoladas o débilmente teñidas); presencia de amastigotes intra y/o extracelulares.

Para el estudio de las láminas de hígado y bazo se estudiaron las alteraciones en los hepatocitos, la presencia o ausencia de granulación y/o incremento del número de polimorfonucleares y/o mononucleares, las alteraciones del tejido conectivo y de los vasos sanguíneos (Baratta *et al.*, 2009; Cesta, 2006).

3.8.4 Pruebas de irritación y corrosión: Ratones BALB/c sanos fueron tricotomizados 24 horas antes de realizar el ensayo. Aproximadamente un área de 2 cm² de la piel dorsal del animal fue puesta en contacto con la crema de KTZ al 3%. La observación y registro fotográfico de la piel se realizó 1, 24, 48 y 72 horas después del contacto.

Para definir irritación o corrosión se siguieron los lineamientos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD); siendo la irritación dérmica aquel daño (eritema o edema) de la piel seguida de la aplicación de la sustancia evaluada por un máximo de 4 horas y la corrosión aquel daño irreversible hasta el final de la observación (OECD, 2012). Para la clasificación del eritema y edema se asignaron puntajes de 1 a 4 a partir de la severidad presentada (ligero, leve, moderado y grave) (OECD, 2012):

3.8.5 Pruebas bioquímicas: Fueron determinadas utilizando pruebas comerciales (BioSystems, Barcelona-España). Una vez sacrificados los animales, se extrajo sangre por punción intracardiaca utilizando jeringas de insulina de un mililitro. La sangre fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos para obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta el momento de realizar las pruebas. Se determinaron fosfatasa alcalina (FA), alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y nitrógeno ureico (BUN). Las características de las pruebas se describen en la tabla 4. La comparación se realizó con valores de referencia del laboratorio en ratones control sanos.

Tabla 4.

Características y condiciones de las pruebas bioquímicas en suero

Prueba	Tipo	Volumen de suero	Longitud de onda	Unidades	Valores de referencia
BUM	Colorimétrica	10 µl	600 nm	mg/dl	40,60-72,39
ALT	Cinética	50 µl	340 nm	U/l	21,0-31,0
FA	Cinética	20 µl	405 nm	U/l	33,13-77,41

Nota: BUM: nitrógeno ureico. ALT: alanina transaminasa. FA: fosfatasa alcalina

3.8.6 Análisis estadístico de los resultados: Las pruebas estadísticas se efectuaron utilizando el software SigmaStat en su versión 3,5 para Windows O.S. La distribución de todas las variables cuantitativas se determinó mediante prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparación de los TD, cinéticas de crecimiento e infectividad en células THP-1 se utilizó prueba t no pareada. Las diferencias entre los resultados de actividad para promastigotes y AmA y de aparición de lesión en ratones BALB/c fue efectuada mediante prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La comparación estadística del área de lesión en los ensayos de dosis respuesta y en la terapia

combinada, se utilizó análisis de varianza de una vía para medidas repetidas con comparación múltiple mediante prueba de Tukey. Para todas las pruebas estadísticas se consideraron los siguientes niveles de significancia estadística: $*=p < 0,05$; $** = p < 0,01$; $*** = p < 0,001$ (Motulsky, 2010).

3.9 Ensayos adicionales

Con el fin de determinar la efectividad del KTZ en lesiones cutáneas ocasionadas por *L. (V.) panamensis*, ensayos de dosis respuesta fueron llevados a cabo mediante la administración de diferentes dosis orales y tópicas de KTZ. Para el primer ensayo se asignaron tres ratones infectados y se evaluaron las siguientes dosis: 100, 150 y 500 mg/kg de peso (un ratón por dosis) durante 40 días. Para el KTZ tópico en crema se evaluaron formulaciones conteniendo diferentes porcentajes del fármaco: 6, 10 y 15 % (dos ratones infectados por dosis). El seguimiento y sacrificio se realizó según lo descrito anteriormente.

4. Resultados

4.1 Generación de AmA de *L. (V.) panamensis*

Mediante cultivo de promastigotes a 32°C y 20% de SFBic se lograron obtener **AmA** después de 9 días. Las características morfológicas se observan en la figura 5c. Al tercer día de cultivo se

observaron dos poblaciones parasitarias de morfología mixta compuestas por células ovaladas sin flagelo y una segunda población de cuerpo células elongado y flageladas (Figura 5a). Para el día sexto toda la población parasitaria se caracterizaba por la ausencia de flagelo (Figura 5b). Las formas parasitarias obtenidas para el noveno día se observaron de menor tamaño que los promastigotes, aflageladas y con el citoplasma débilmente teñido. Estas formas fueron similares a los amastigotes intracelulares observados en improntas de lesiones (figura 5e) y células THP-1 infectadas experimentalmente (figura 5f). El porcentaje de transformación de promastigotes en **AmA** alcanzó un 100% al cuarto día de cultivo el cual se mantuvo hasta el décimo día de observación (figura 5b).

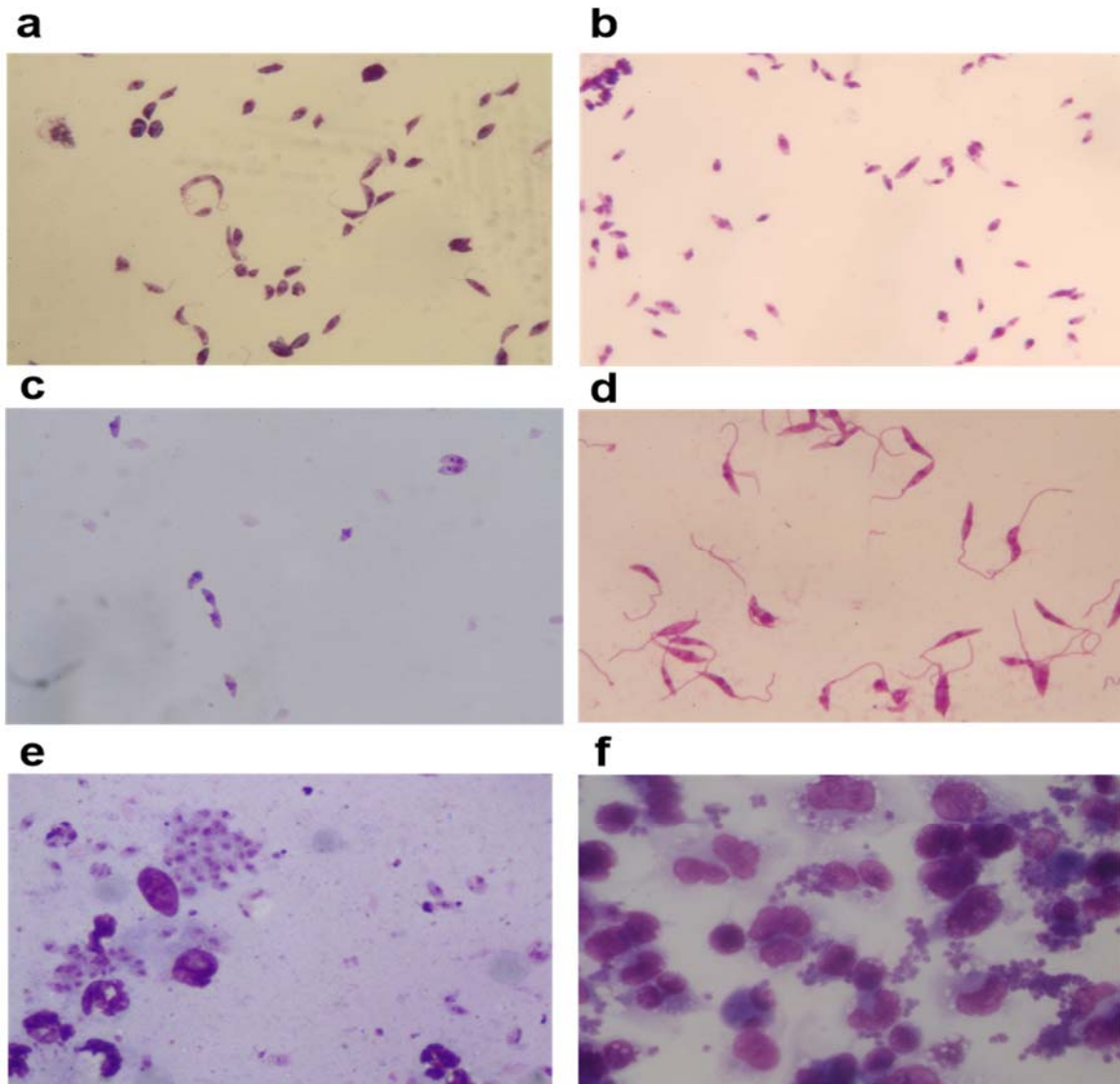


Figura 5. Formas parasitarias teñidas con Giemsa.

(a) Transformación de promastigotes en **AmA** (3 días). Se observa una población celular mixta con parásitos de morfología ovalada, sin flagelo y otra de morfología elongada y flagelada. (b) Transformación de promastigotes en **AmA** (6 días). La mayoría de los parásitos han perdido el flagelo y cambiado su forma celular por una más pequeña y ovalada. (c) Amastigotes axénicos de 9 días de transformación. Son pequeños y ovalados. (d) Promastigotes re transformados a partir de **AmA** mediante modificación de la temperatura de cultivo de 32 °C a 28 °C. (e) Impronta de una lesión cutánea de un ratón BALB/c infectado. Se observa destrucción celular ocasionada por la replicación intracelular de los amastigotes. (f) Células THP-1 infectadas en las que se observa destrucción celular ocasionada por los parásitos.

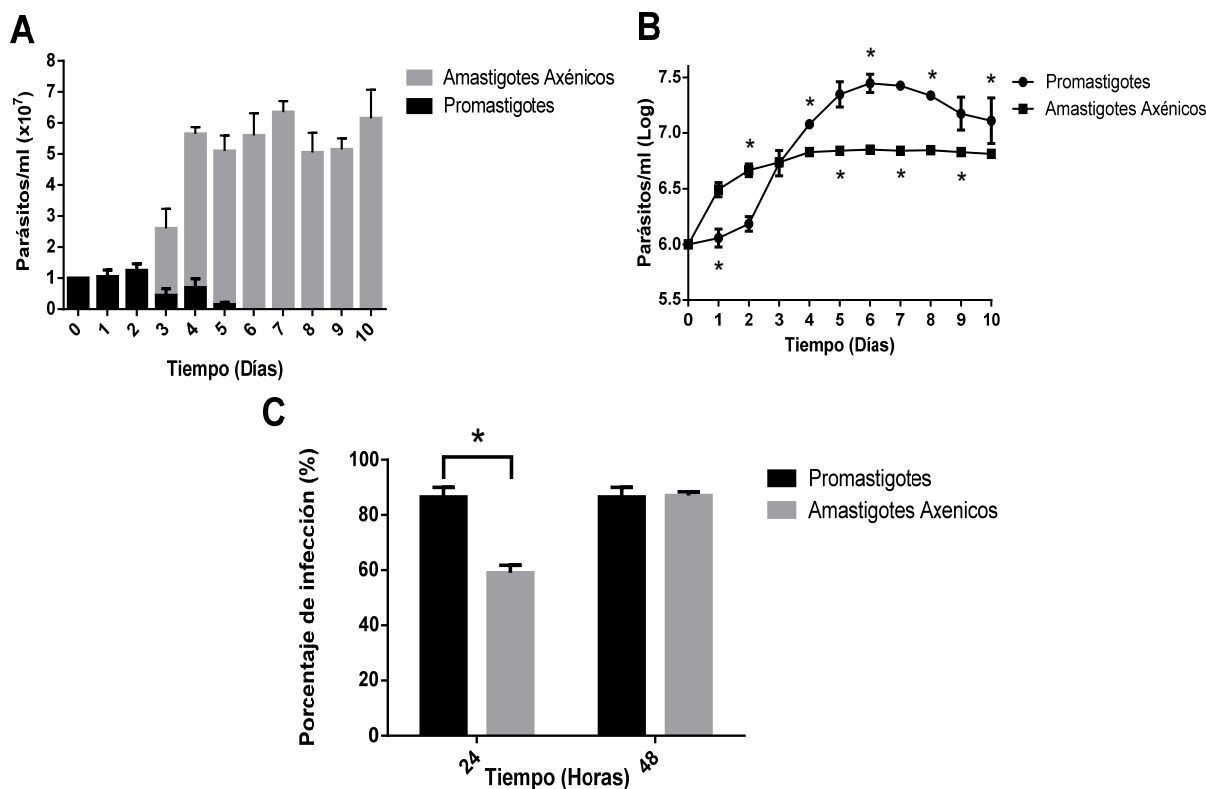


Figura 6. Caracterización de promastigotes y AmA.

(a) Conteo de AmA durante 10 días de transformación. (b) Porcentaje de infección de células THP-1 obtenidos a las 24 y 48 horas para ambas formas parasitarias (c) Cinéticas de crecimiento para ambas formas parasitarias obtenidas mediante recuento durante 10 días.

Durante la generación de los AmA (Figura 6a), al segundo día, el número de promastigotes aumenta levemente a $0,95 \times 10^7$ parásitos/ml. Luego estos comienzan a disminuir hasta desaparecer por completo del recuento en el sexto día. Los AmA aparecen a partir del tercer día aumentando rápidamente su número hasta alcanzar una concentración máxima de $6,35 \times 10^7$ parásitos/ml en promedio para el séptimo día (Figura 6a). Similar a lo encontrado en la observación microscópica, el tercer día se encontró una población mixta compuesta por promastigotes y AmA.

4.1.1 Cinética de crecimiento de los parásitos: Con respecto a la cinética de crecimiento de los promastigotes y **AmA** se observaron diferencias en las concentraciones máximas que alcanzan los parásitos, con valores de 21×10^7 promastigotes/ml (el sexto día) y $6,3 \times 10^6$ AmA/ml (el séptimo día). En la figura 7b se muestran los logaritmos decimales (log) de la concentración de parásitos contra el tiempo de cultivo de promastigotes y AmA.

Con respecto a las fases de crecimiento, los **AmA** comienzan su crecimiento desde el inicio hasta el cuarto día de cultivo, continuando con una fase estacionaria que se extiende hasta el décimo día. Los promastigotes, por su lado, presentan una fase inicial de adaptación hasta el segundo día de cultivo, para posteriormente comenzar una fase de crecimiento hasta el sexto día de cultivo. Desde el séptimo hasta el décimo día de cultivo se evidencia una disminución en el recuento de los parásitos al entrar en una fase de muerte.

Entre ambas formas parasitarias se encontraron diferencias en el tiempo de duplicación (tabla 5; $p < 0,05$), siendo los **AmA** los que menos tiempo requieren para doblar su población durante la fase de crecimiento.

Tabla 5.

Tiempo de duplicación en promastigotes y amastigotes axénicos

	Exp	TD	TD	Prueba t no pareada
PrO	1	13,20	12,83 \pm 0,37	0,02
	2	12,46		
AmA	1	8,19	7,36 \pm 0,83	
	2	6,53		

Nota: Exp: experimento. TD: tiempo de duplicación. PrO: promastigotes. **AmA**: amastigotes axénicos.

4.1.2 Infectividad de parásitos en células THP-1 y en ratones BALB/c: La infectividad *in vitro* de células THP-1 fue mayor en promastigotes en comparación con los AmA (86,5% vs 59,0% de células infectadas), 24 horas después de la infección. Posteriormente, tanto promastigotes como AmA presentaron porcentajes similares de células infectadas 86,5% vs 87,0%, respectivamente. El recuento de células a las 72 horas no fue posible debido al nivel de destrucción celular. Estos experimentos fueron repetidos dos veces.

En los ratones BALB/c, las lesiones cutáneas empezaron aparecer primero en los ratones infectados con las formas de promastigotes. Se observó la aparición de una pequeña pápula el día $20 \pm 0,1$ para los infectados con promastigotes y el día $29,5 \pm 0,70$ días para los ratones infectados con **AmA** (figura 7a; $p < 0,05$). Después de la pápula las lesiones de ambos grupos evolucionaron hasta formar un nódulo. El día del sacrificio (día 28 de seguimiento *post* aparición de la lesión), ninguno de los nódulos presentó ulceración (ver figura 8). El tamaño promedio de los nódulos de los ratones infectados con promastigotes fue de $27,18 \pm 4,2$ mm² y para los ratones infectados con **AmA** fue de $23,45 \pm 6,29$ mm². La evolución general de las lesiones en ambos grupos experimentales fue similar (figura 7b; $p=0,059$), aunque se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el área de lesión entre promastigotes y **AmA** al día 21 ($p < 0,05$).

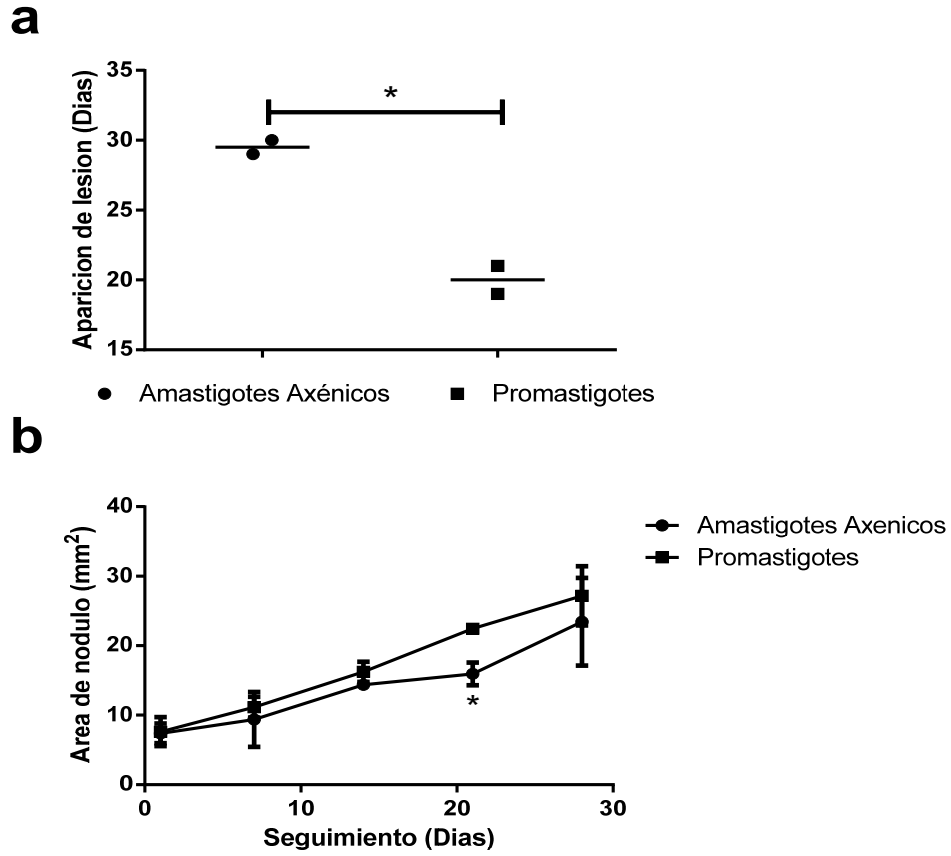


Figura 7. Infectividad de promastigotes y AmA en ratones BALB/c

(a) Tiempo (días) requerido para la aparición de la lesión. (b) Seguimiento del área de lesión (mm²) durante 28 días. (c) Seguimiento fotográfico de ambos grupos experimentales

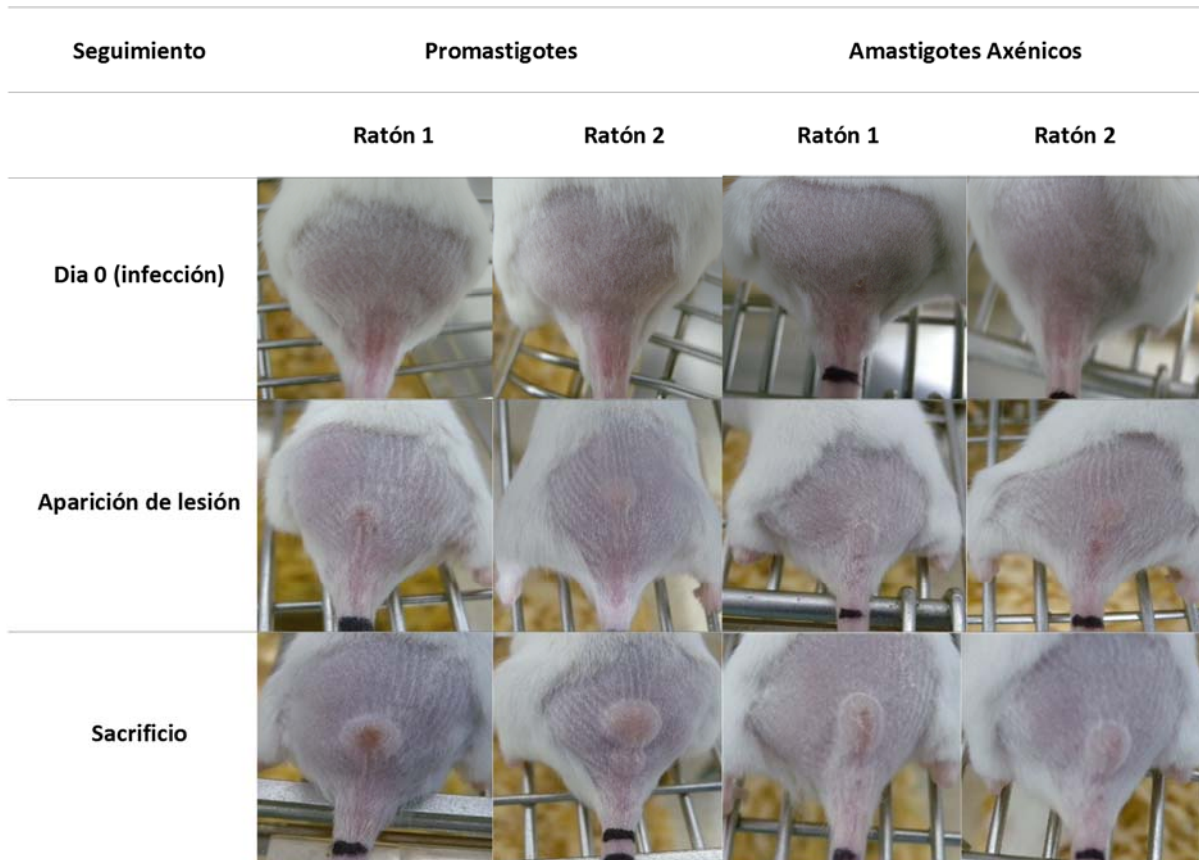


Figura 8. Seguimiento fotográfico del desarrollo de las lesiones en ratones BALB/c generadas a partir de la infección de dos ratones con promastigotes en el primer grupo experimental y con AmA en el segundo grupo.

4.2 Ensayo de actividad anti-*leishmania*

Según lo mostrado en la tabla 6, los parásitos de *L. (V.) panamensis* presentaron diferentes niveles de susceptibilidad a los fármacos en un rango de susceptibilidad de mayor a menor como sigue: PMD>KTZ>MTF>PM para los promastigotes y PMD>MTF>KTZ>PM para los AmA. Se encontraron diferencias significativas entre la susceptibilidad a un mismo fármaco entre ambas formas parasitarias: siendo los promastigotes más susceptibles al KTZ y PM ($p < 0,05$) y los AmA más susceptibles a la MTF ($p < 0,01$). Los experimentos fueron repetidos dos veces (tabla 6)

Tabla 6.

Actividad farmacológica in vitro en promastigotes y AmA

Fármaco	Forma parasitaria							
	Promastigotes				AmA			
	CI ₅₀ ^a	CI _{50R}	℞CI ₅₀	DS	CI ₅₀	CI _{50R}	℞ CI ₅₀	DS
KTZ*	2,61	1,46	2,03	0,81	8,32	14,39	11,35	1,70
MTF**	6,48	6,18	6,33	0,21	2,41	1,71	4,12	0,49
PM*	65,27	30,30	95,57	24,72	161,81	143,45	152,63	12,98
PMD	0,50	0,91	0,70	0,29	0,19	0,29	0,24	0,07

Nota: CI₅₀: Concentración inhibitoria 50 ensayo 1. CI_{50R}: Concentración inhibitoria 50 replica,

DS: Desviación estándar, AmA: amastigotes axénicos. *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

4.3 Ensayo de citotoxicidad en células THP-1

La evaluación de la actividad farmacológica *in vitro* de la MTF, KTZ, PM y PMD mostró índices de selectividad superiores a 3 cada uno de los fármacos, indicando una mayor actividad anti-*Leishmania* que citotóxica en las condiciones evaluadas.

Tabla 7.

Actividad farmacológica in vitro en células THP-1

Fármaco	Células THP-1				
	CC ₅₀ ^a	CC _{50R}	□CC ₅₀	DS	IS
	KTZ*	32,5	38,3	35,4	4,10
MTF**	24,1	20,5	22,3	2,54	5,41
PM*	500	580	540	56,56	3,53
PMD	19,2	20,52	19,2	13,57	80

Nota: CC₅₀: Concentración citotóxica 50 ensayo 1. CC_{50R}: Concentración citotóxica 50 replica,

DS: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad.

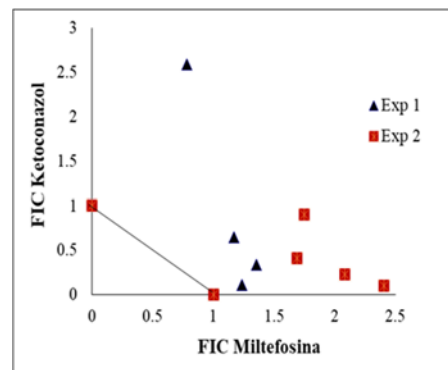
4.4 Interacción farmacológica en AmA

La interacción de la MTF con KTZ, PM y PMD en cada uno de las mezclas (*Mix*) utilizadas se muestra en las tablas 7,8 y 9. Para todos los radios de combinación de MTF con el KTZ (tabla 7) y PMD (tabla 9) la interacción farmacológica determinada a partir de la \sum FIC o del $\square\sum$ FIC fue indiferente o aditiva. La interacción de la MTF con PM también fue indiferente o aditiva a nivel global ($\square\sum$ FIC), pero sinérgica para el radio de combinación 2:3 con una \sum FIC de 0,48 en el ensayo inicial y de 0,47 en la réplica. La interacción farmacológica encontrada en la combinación MTF con PMD fue de tipo indiferente o aditivo, encontrándose el mismo resultado para cada uno de los radios de combinación en ambos ensayos.

Tabla 8.

Actividad farmacológica combinada de MTF y KET en AmA

<i>Mix</i>	CI ₅₀ (μM)		FIC		\sum FIC-	$\square\sum$ FIC
	MTF	KTZ	MTF	KTZ		
5:0	1,42	0	1	0	1	
4:1	1,76	0,73	1,22	0,11	1,34	
3:2	1,92	2,18	1,35	0,33	1,68	1,70±0,88
2:3	1,66	4,27	1,16	0,65	1,82	
1:4	1,11	17,05	0,77	2,59	3,37	
0:5	0	6,57	0	1	1	
R						
5:0	1,48	0	1	0	1	
4:1	3,55	1,48	2,40	0,09	2,49	
3:2	3,07	3,47	2,07	0,22	2,30	1,92±0,73
2:3	2,49	6,17	1,68	0,40	2,09	
1:4	2,58	13,71	1,74	0,90	2,64	
0:5	0	15,23	0	1	1	

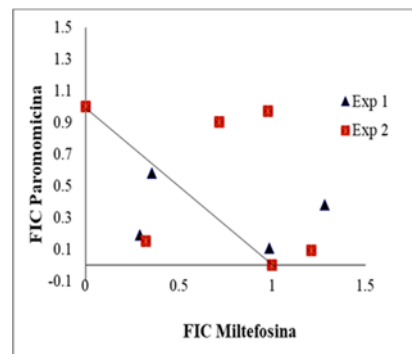


Nota: CI₅₀: Concentración inhibitoria 50. *Mix*: combinación. FIC: Concentración inhibitoria fraccional. DS: desviación estándar. INT: interacción. MTF: Miltefosina. KTZ: ketoconazol. R: replica

Tabla 9.

Actividad farmacológica combinada de MTF y PM en AmA

Mix	CI ₅₀ (μM)		FIC		Σ FIC-	□ Σ FIC
	MTF	PM	MTF	PM		
5:0	2,58	0	1	0	1	
4:1	2,54	15,25	0,98	0,10	1,09	
3:2	3,31	53,11	1,28	0,38	1,66	1,02±0,37
2:3	0,75	26,88	0,29	0,19	0,48	
1:4	0,91	80,79	0,35	0,57	0,93	
0:5	0	139,42	0	1	1	
R						
5:0	1,78	0	1	0	1	
4:1	2,16	13,02	1,20	0,09	1,30	
3:2	1,74	28,20	0,97	0,97	1,95	1,22± 0,52
2:3	0,57	20,45	0,32	0,15	0,47	
1:4	1,27	122,82	0,71	0,90	1,61	
0:5	0	135,75	0	1	1	



CI₅₀: Concentración inhibitoria 50. Mix: combinación. FIC: Concentración inhibitoria fraccional. DS: desviación estándar. INT: interacción. MTF: Miltefosina. PM: paromomicina. S: sinérgico. R: replica.

4.5 Interacción entre MTF y KTZ en células THP-1

La interacción entre ambos fármacos fue indiferente o aditivo en las células THP-1 diferenciadas presentando un □Σ FIC de 1,21 en el experimento 1 y de 1,42 en experimento 2.

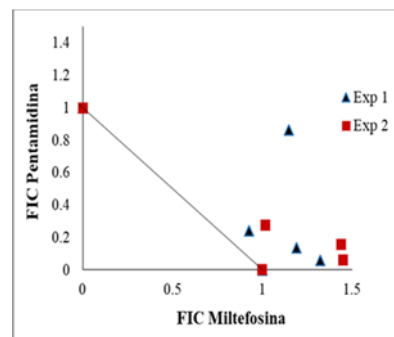
A partir de los valores las CI₅₀ obtenidas para la combinación MTF con KTZ tanto en AmA y de las CC₅₀ obtenidas en células THP-1 se determinaron los IS según lo descrito en materiales y métodos. Como se puede ver en la tabla 11 y en la figura 9, ambos fármacos actuando de manera

individual como en combinación fueron selectivos excepto para el ratio 4:1. La combinación KTZ-MTF presentó índices de selectividad inferiores a 3 en ambos ensayos. La combinación MTF-KTZ solo presentó IS inferiores a 3 en la réplica (figura 9b).

Tabla 10.

Actividad farmacológica combinada de MTF y PMD en *AmA*

Mix	CI ₅₀ (μM)		FIC		Σ FIC	□ Σ FIC
	MTF	PMD	MTF	PMD		
5:0	2,03	0	1	0	1	
4:1	2,93	0,03	1,45	0,05	1,50	
3:2	2,92	0,08	1,43	0,15	1,59	1,49± 0,58
2:3	2,06	0,13	1,01	0,27	1,29	
1:4	3,14	0,49	1,54	1,03	2,58	
0:5	0	0,48	0	1	1	
R						
5:0	2,22	0	1	0	1	
4:1	2,95	0,03	1,32	0,05	1,38	
3:2	2,65	0,07	1,19	0,13	1,32	1,31± 0,37
2:3	2,06	0,12	0,92	0,24	1,16	
1:4	2,55	0,43	1,14	0,86	2,00	
0:5	0	0,50	0	1	1	

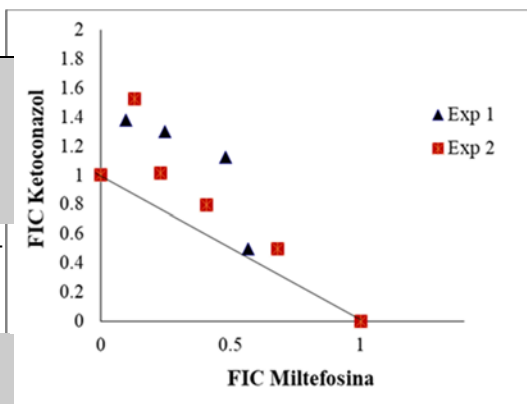


Nota: CI₅₀: Concentración inhibitoria 50. FIC: Concentración inhibitoria fraccional. **Mix**: combinación. DS: desviación estándar. INT: interacción. MTF: Miltefosina. PMD: pentamidina. I: Indiferente.

Tabla 11.

Actividad farmacológica combinada de MTF y KTZ en células THP-1

	CI ₅₀ (μM)	FIC	Σ FIC	□ Σ FIC	DS
Mix	MTF	KTZ	MTF	KTZ	
5:0	55,60	0	1	0	1
4:1	7,20	57,64	0,12	1,52	1,65
3:2	12,73	38,20	0,22	1,01	1,24
					1,21± 0,24
2:3	22,54	30,06	0,40	0,79	1,20
1:4	37,76	18,88	0,67	0,5	1,17
0:5	0	37,76	0	1	1
R					
5:0	61,06	0	1	0	1
4:1	5,97	47,78	0,09	1,37	1,47
3:2	15,04	45,13	0,24	1,30	1,54
					1,42± 0,24
2:3	29,22	38,96	0,47	1,12	1,60
1:4	34,68	17,34	0,56	0,5	1,06
0:5	0	34,68	0	0	1



Nota: CI₅₀: Concentración inhibitoria 50. **Mix**: combinación, FIC: Concentración inhibitoria fraccional, DS: desviación estándar, INT: interacción, MTF: miltefosina, KTZ: ketaconazol, I: Indiferente

Tabla 12.

Índices de selectividad en combinaciones de MTF y KTZ en células THP-1

<i>Mix</i>	IS	IS
	MTF	KTZ
5:0	39,15	0
4:1	4,09	78,95
3:2	6,63	17,52
2:3	13,57	7,03
1:4	34,01	1,10
0:5	0	5,74
R		
5:0	41,25	0
4:1	1,68	32,28
3:2	4,89	13,00
2:3	11,73	6,31
1:4	13,44	1,26
0:5	0	5,27

Mix: Combinación, IS: índice de selectividad, MTF: miltefosina, KTZ: ketoconazol

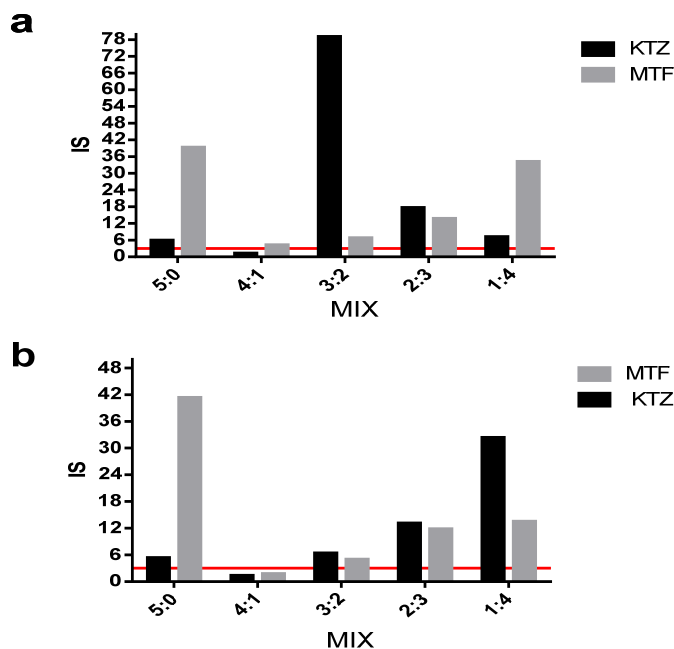


Figura 9. Índices de selectividad para KTZ y MTF para diferentes radios de combinación. La línea roja representa IS: índices de selectividad, *Mix*: radio de combinación, MTF: miltefosina, KTZ: ketoconazol.

4.6 Características de las formulaciones utilizadas

En los experimentos *in vivo* se evaluaron tres tipos diferentes de formulaciones: solución oral de MTF (30;15; 7,5; 2,5; 0,8; 0,27; 0,09 mg/kg de peso), suspensión oral de KTZ (500,150 y 100 mg/kg de peso) y crema de KTZ (3, 6, 10 y 15 %). Las soluciones y suspensiones orales fueron preparadas 24 horas antes de ser utilizadas. Se preparó un volumen máximo de 1 ml para evitar la degradación del fármaco.

Las características fisicoquímicas de la crema de KTZ al 3% antes y después de incubación a diferentes temperaturas durante 2 meses se presentan en la Tabla 12. A las temperaturas evaluadas la formulación mantuvo su apariencia homogénea y su pH estable. Se presentaron cambios en la







coloración a temperatura ambiente y a 37°C, pasando de una tonalidad blanca a un color rosado. La crema fue estable a -6 °C. No se observó separación de fases después de 24 horas de incubación a 28°C en tubos de micro hematocrito (dato no mostrado).

4.7 Eficacia del tratamiento con MTF oral en ratones BALB/c/c infectados con *L. (V.) panamensis*

La solución oral de MTF mostró un efecto de dosis respuesta en la reducción del tamaño de las lesiones cutáneas, presentándose tanto curación estética como curación parasitológica para las dosis 30, 15 y 7,5 mg/kg de peso (Figura 10a). La curación de las lesiones se observó una vez finalizado el periodo de tratamiento. La dosis de 2,5 mg/kg de peso fue considerada como sub-óptima al reducir en un 35,91% el tamaño de la lesión, pero sin llegar a generar ni cura estética ni parasitológica en el periodo de tratamiento evaluado (Figura 10a). La DE₅₀, calculada fue de 2,56 mg/kg de peso.

Tabla 13.

Estabilidad de formulación tipo crema a diferentes temperaturas durante 2 meses

T	Caracterización fisicoquímica						Fotografía	
	Antes			Después			Antes	Después
	Color	Aspecto	pH	Color	Aspecto	pH		
4 °C	Blanco	Opaco	6,0	Blanco	Opaco	6,0		
28 °C	Blanco	Opaco	6,0	Rosado	Opaco	6,0		
37 °C	Blanco	Opaco	6,0	Rosado	Opaco	6,0		

Para las tres dosis inferiores a 2.5 mg/kg de peso, las lesiones se mantuvieron hasta el día del sacrificio (figura 11). Tanto las biopsias como las improntas obtenidas después del tratamiento oral con MTF a 30, 15 y 7,5 mg/kg de peso fueron negativas para las formas de amastigotes intracelulares o libres. El tratamiento con dosis menores registró la presencia de amastigotes intracelulares.

Histopatológicamente tanto en las lesiones positivas como en las negativas para la presencia del parásito, se reportó la presencia de infiltrado inflamatorio difuso. En algunos cortes se identificó acantosis como alteración de la epidermis y la presencia de macrófagos vacuolados en la parte media y baja de la dermis. Los cortes histológicos de bazo e hígado no presentaron alteraciones, considerándose los tejidos como normales.

El peso de los ratones se mantuvo estable durante el tratamiento y seguimiento (datos no mostrados)

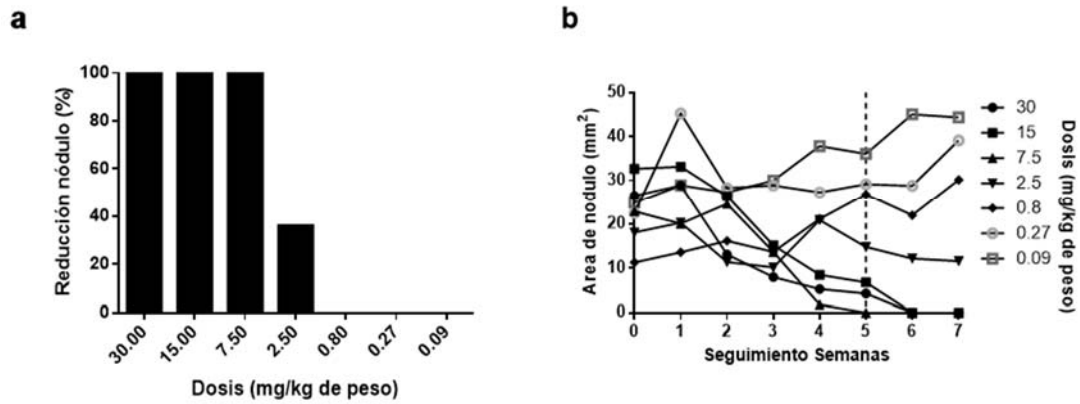


Figura 10. Ensayo de dosis respuesta de MTF oral en ratones BALB/c infectados.

(a) Porcentajes de reducción del área de lesión para cada una de las dosis evaluadas (b) Seguimiento del área de lesión durante 7 semanas. La línea punteada representa la finalización del tratamiento.

Tratamiento (mg/kg de peso)	Inicio de tratamiento	Fin de tratamiento	Fin de seguimiento
30			
15			
7,5			
2,5			
0,8			
0,27			
0,09			

Figura 11. Seguimiento del área de lesión hasta el sacrificio (semana 7).

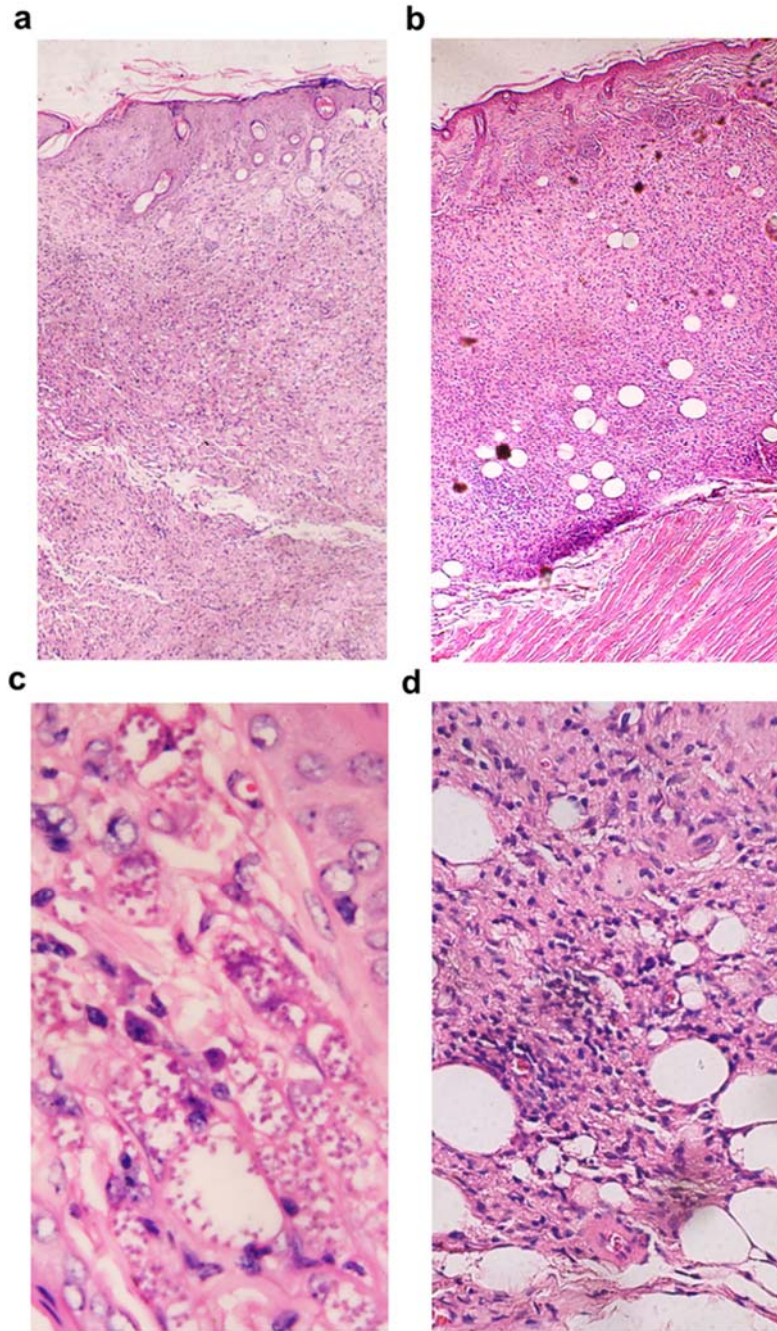


Figura 12. Estudio histopatológico de láminas de piel teñidas con hematoxilina-eosina.

(a) Lesión proveniente de un ratón control no tratado (100x). Se observa acantosis e infiltrado inflamatorio difuso. (b) Piel de ratón curado con MTF (30mg/kg) (100x). Se observa acantosis, infiltrado inflamatorio difuso y presencia de cuerpos vacuolados principalmente ubicados en la parte baja de la epidermis. (c) Lesión proveniente de un ratón control no tratado (1000x). Se observan macrófagos de citoplasma vacuolado conteniendo amastigotes, aumento 1000x. (d) Piel de ratón curado con MTF (30mg/kg), aumento 1000x. Se observan macrófagos de citoplasma vacuolado sin presencia de amastigotes (aumento 1000x).

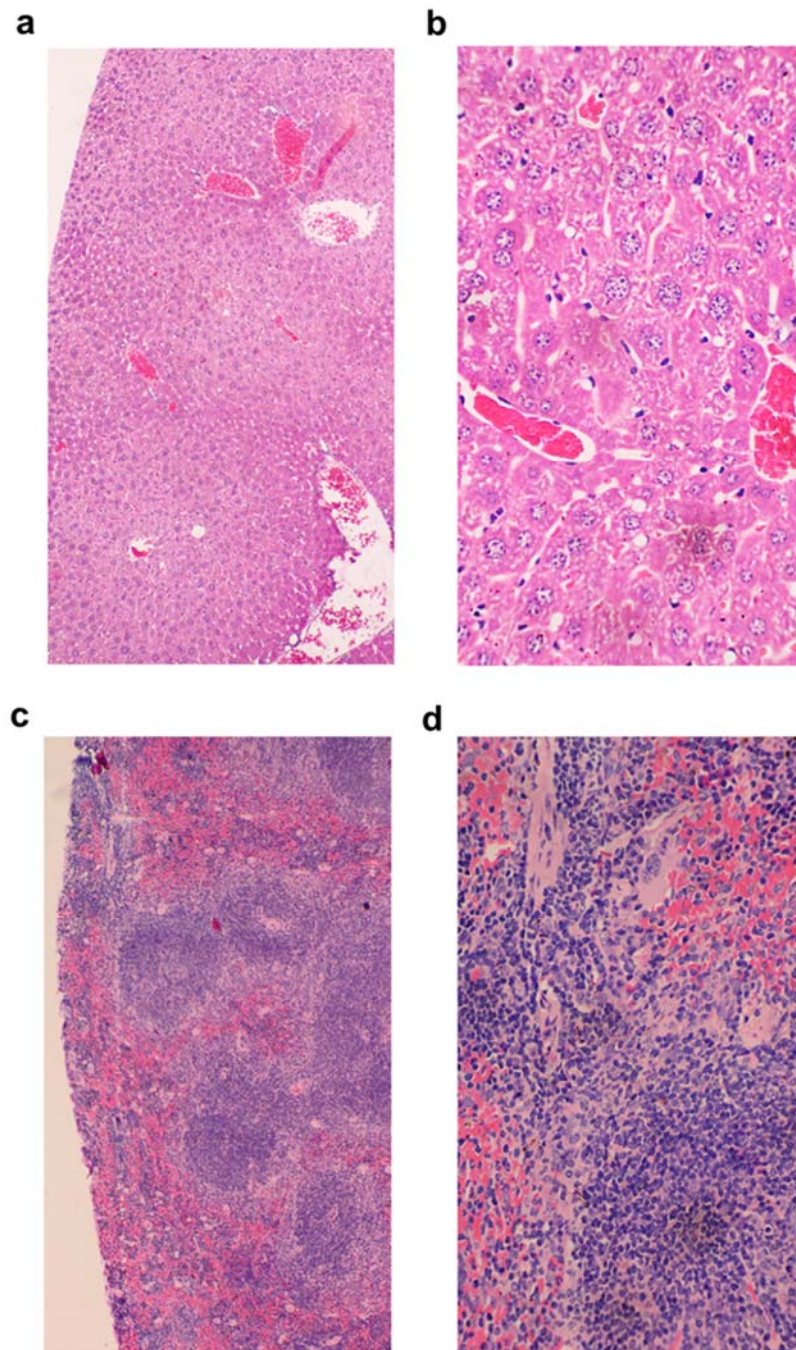


Figura 13. Cortes histológicos de hígado y bazo teñidos con hematoxilina eosina.

No se observan alteraciones en ninguno de los cortes. (a) Hígado de ratón control no tratado (100x). (b) Hígado de ratón control no tratado (1000x). (c) Bazo de ratón control no tratado (100x). (d) Bazo de ratón control no tratado (1000x).

4.8 Eficacia del tratamiento combinado de MTF oral y KTZ en crema al 3%

En la figura 17 se muestra el efecto del tratamiento en los ratones controles (sin tratamiento y tratados con el vehículo crema base), los animales tratados con KTZ al 3% tópico/8 semanas y los tratados con 2,5 mg/kg de MTF oral/15 días y KTZ al 3% tópico/8 semanas. Ninguno de los tratamientos mostró curación estética ni parasitológica. Se demostró la presencia de amastigotes intracelulares en las biopsias e improntas de las lesiones y crecimiento parasitario en las diferentes concentraciones utilizadas para determinar la carga parasitaria. La figura 18 muestra los niveles de carga parasitaria de las lesiones de los ratones tratados y los controles. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la carga parasitaria de los distintos grupos experimentales.

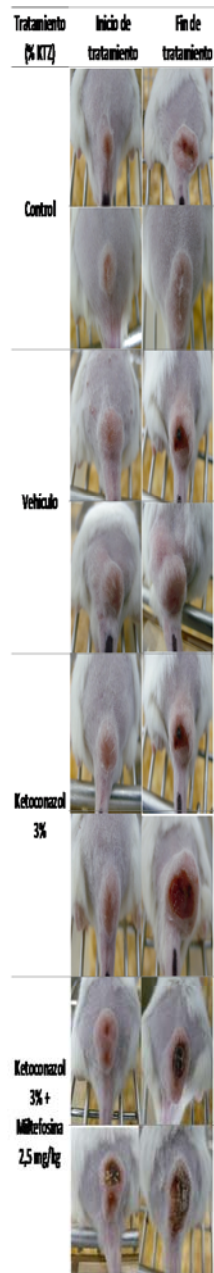


Figura 14. Seguimiento fotográfico al inicio y al final del tratamiento en cuatro grupos experimentales

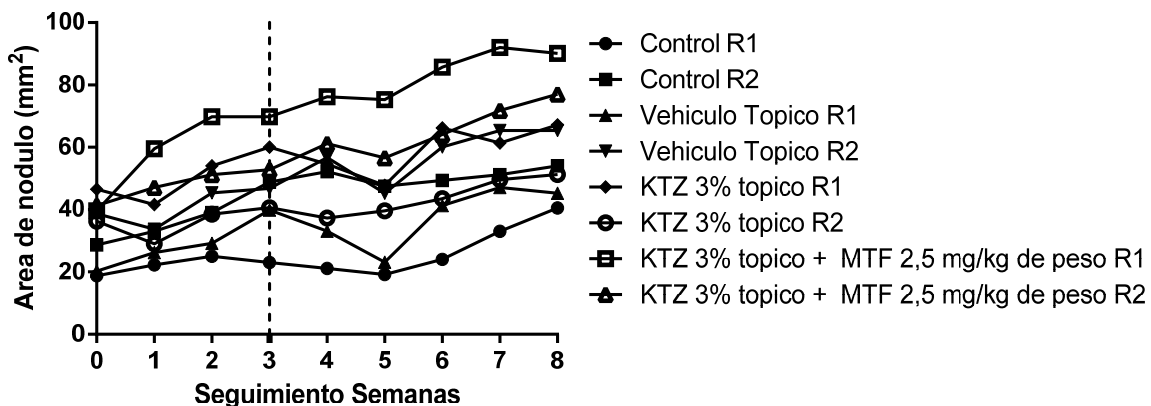


Figura 15. Seguimiento del área de lesión en 4 grupos experimentales durante 8 semanas. La línea punteada representa la finalización del tratamiento oral de MTF 2,5 mg/kg en la terapia combinada con KTZ 3%.

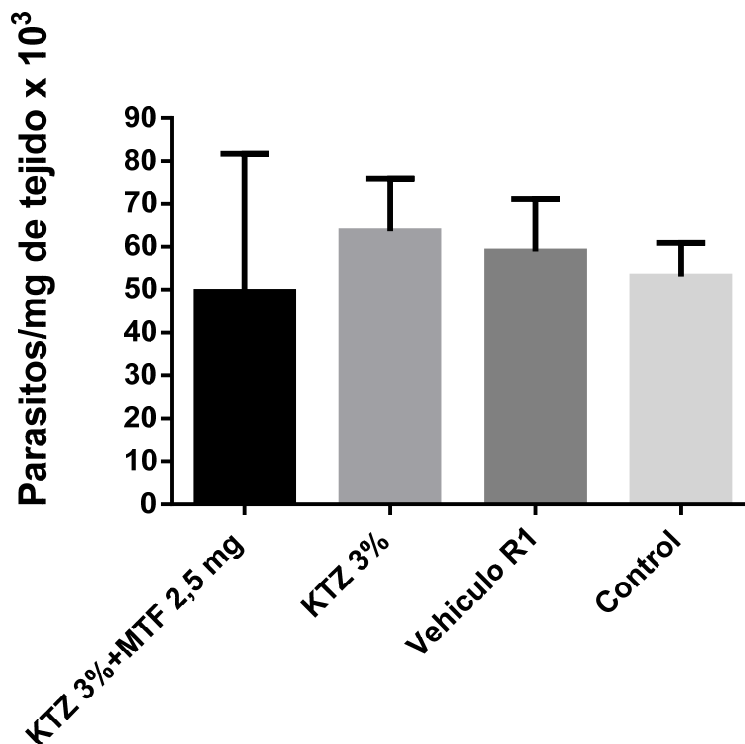


Figura 16. Carga parasitaria en las lesiones de ratones BALB/c determinada mediante dilución límite expresada en parásitos/mg de tejido procesado.

Tabla 14.

Reporte de lectura de improntas de lesión y estudio histopatológico de bazo e hígado.

Grupo experimental	Ratón	Presencia de parásitos		Alteraciones en piel	Alteraciones en órganos
		Impronta	Biopsia		
MTF oral (2,5 mg/kg) + KTZ tópico (3%)	1	+	+	A, IID, MV	N
	2	+	NR	NR	NR
KTZ tópico (3%)	1	+	+	A, IID	N
	2	+	NR	NR	NR
Vehículo tópico	1	+	+	IID	N
	2	+	+	NR	NR
Control sin tratamiento	1	+	+	IID	N
	2	+	NR	NR	NR
Dosis respuesta KTZ tópico (%)	15	+	NR	IID	N
	10	+	NR	A,IID	N
	6	+	NR	IID	N
Dosis respuesta KTZ oral (mg/kg)	500	+	NR	NR	N
	150	+	NR	IID,MV	N
	100	+	NR	IDD	N
	30	-	-	IID, MV	N
	15	-	-	MV	N
Dosis respuesta MTF oral (mg/kg)	7,5	-	-	IID	N
	2,5	+	+	IID	N
	0,8	+	+	A, IID, MV	N
	0,27	+	+	A, IID, MV	N
	0,09	+	+	IID, MV	N

Nota: +: Positivo, -: Negativo, A: Acantosis, IID: Infiltrado inflamatorio difuso, MV: Macrófagos vacuolados, NR: No realizado.

4.9 Efecto del tratamiento en el perfil de los parámetros bioquímicos en suero

En la tabla 14 se recopilan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para los ratones tratados con MTF (2,5 mg/kg de peso por 15 días), con KTZ (3% por 8 semanas) y con MTF/KTZ (2,5 mg/kg de peso durante 15 días/3% durante 8 semanas); así como en los ratones controles (sin tratamiento y con el vehículo crema base). Las pruebas no se efectuaron en los sueros que presentaban hemolisis. Los valores reportados para todas las pruebas se encontraron dentro de los valores establecidos como normales en el laboratorio.

Tabla 15.

Resultados pruebas bioquímicas realizadas en suero

Grupo experimental	Ratón	Hemolisis	BUN mg/dl	ALT (U/l)	FA (U/l)
MIL oral (2,5 mg/kg) + KTZ tópico (3%)	1	SI	NR	NR	NR
	2	No	56,57	21	46,99
MIL oral (2,5mg/kg)	1	Si	NR	NR	NR
	2	No	41,76	22	51,59
KTZ tópico (3%)	1	Si	NR	NR	NR
	2	No	45,39	31	36,85
Vehículo tópico	1	No	47,46	28	47,46
	2	No	51,26	22	51,26
Control sin tratamiento	1	No	49,53	24	49,53
	2	No	41,42	24	39,52
Valores de Referencia			40,60-72,39	21,0-31,0	33,13-77,41

Nota: Nitrógeno ureico, ALT: Alanina transaminasa, FA: Fosfatasa alcalina. NR: no realizado.

4.10 Análisis de las lesiones en los diferentes grupos experimentales:

La comparación estadística del área de lesión entre grupos experimentales no pudo ser realizado debido al bajo poder de prueba obtenido, inferior al 80%, un ANOVA para medidas repetidas (Charan y Kantharia, 2013). Esto se debe al N utilizado en los ensayos, el cual fue calculado a partir de la dosis respuesta de MTF oral en el cual se observó curación estética y parasitológica. El N es suficiente para determinar ambos tipos de curación, pero insuficiente para determinar diferencias en la evolución de las lesiones a través del tiempo.

4.11 Ensayo de irritación-corrosión de la formulación tipo crema de KTZ al 3%

Después de la exposición a una dosis tópica de KTZ al 3%, no se reportaron alteraciones en las características normales de la piel ni en la primera hora ni en las observaciones ulteriores correspondientes a las 24, 48 y 72 horas (Ver figura 19). En análisis histopatológico, ver figura 20, de la piel de uno de los roedores mostró un tejido normal sin alteraciones a nivel de la epidermis ni de la dermis que pudieran sugerir un efecto irritante y/o corrosivo de la formulación de KTZ al 3% a una sola dosis.

Horas	Fotografía
1	R1
	R2
24	R1
	R2
48	R1
	R2
72	R1
	R2

Figura 17. Registro fotográfico del ensayo de irritación-corrosión de la formulación tipo crema al 3% de KTZ

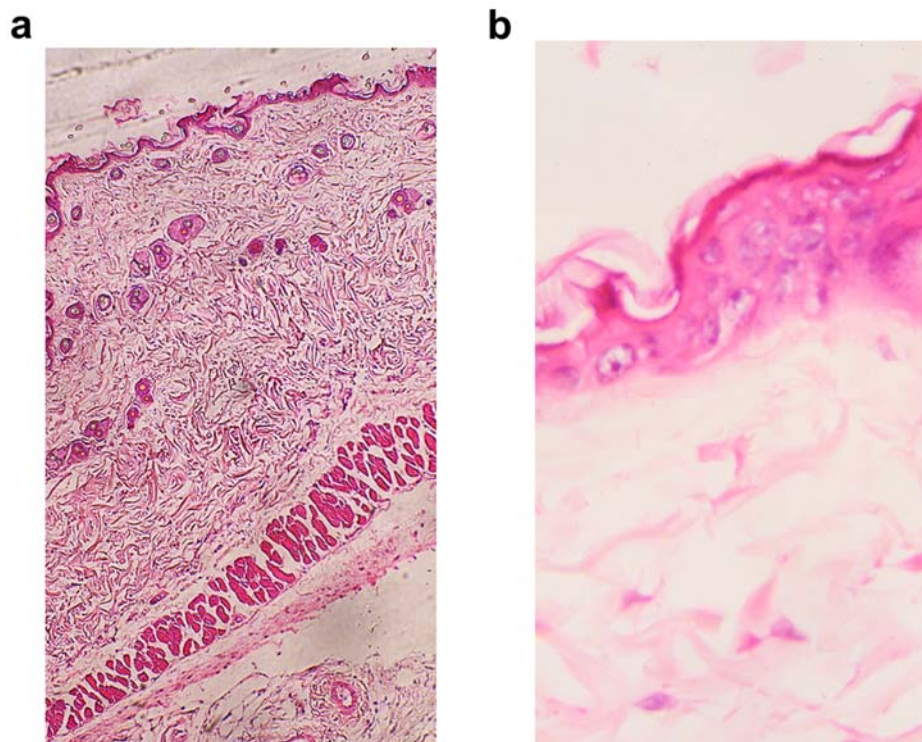


Figura 18. Estudio histopatológico de irritación-corrosión en piel de formulación de KTZ al 3%. No se observan alteraciones del tejido. (a) 100x (b) 1000x

5. Ensayos adicionales

5.1 Eficacia del tratamiento oral con KTZ en suspensión

Ninguna de las dosis utilizadas mostró efectividad estética o parasitológica de las lesiones cutáneas producidas por *L. (V.) panamensis* durante las ocho semanas de tratamiento. La dosis de 500 mg/kg de peso fue letal después de la primera dosis. Al momento de la extracción de los órganos se observó necrosis en el estómago del roedor producto de la acumulación de KTZ y alimentos en el

órgano. Las dos dosis restantes de 150 y 100 mg/kg de peso no mostraron letalidad en el tiempo de tratamiento evaluado. El peso se mantuvo estable durante el tiempo de tratamiento (datos no mostrados). En las improntas y biopsias de las lesiones se observó presencia de amastigotes intracelulares. En las biopsias de piel se reportó infiltrado inflamatorio difuso, mientras que las biopsias de órganos fueron normales.

5.2 Eficacia del tratamiento tópico con KTZ en crema en diferentes concentraciones

Ninguna de las formulaciones tópicos tipo crema conteniendo diferentes concentraciones de KTZ mostró ser efectiva en la cura estética ni parasitológica de las lesiones cutáneas después de 8 semanas de tratamiento. No se presentaron alteraciones en el peso ni el hígado y bazo de los roedores tratados.

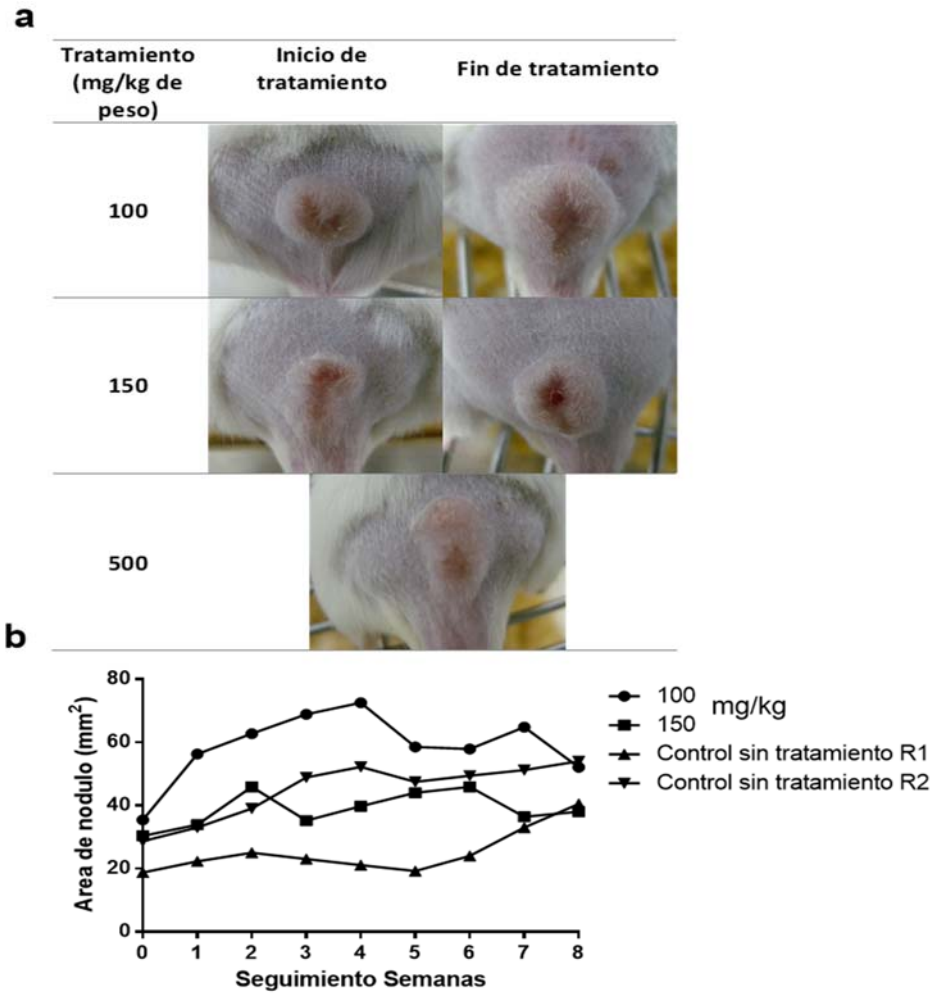
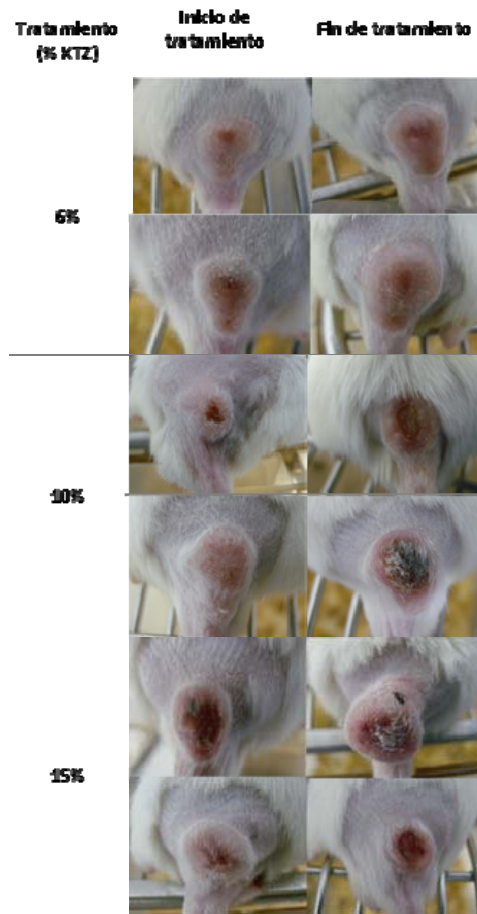


Figura 19. Ensayo de dosis respuesta de KTZ oral en ratones BALB/c infectados.

(a) Seguimiento fotográfico de las lesiones al inicio del tratamiento y fin del tratamiento (b) Seguimiento del área de lesión hasta el sacrificio (semana 8)

a



b

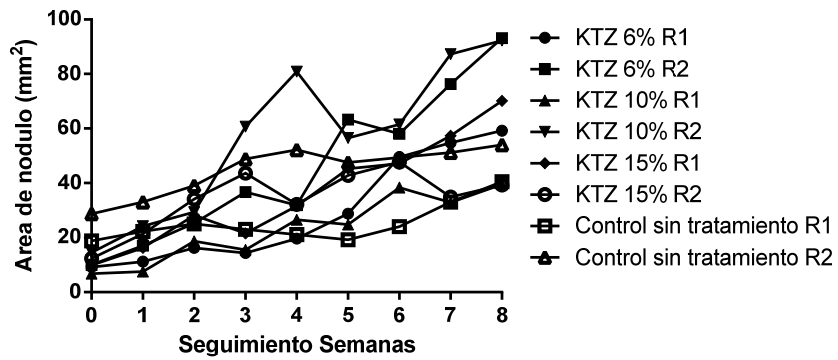


Figura 20. Ensayo de dosis respuesta de KTZ en ratones BALB/c infectados

(a) Seguimiento fotográfico de las lesiones al inicio y al final del tratamiento (b) Seguimiento del área de lesión hasta el sacrificio (semana 8)

6. Discusión

La búsqueda de alternativas terapéuticas en leishmaniasis especialmente en LC producida por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, es prioritaria. Los tratamientos combinados podrían constituir una excelente alternativa debido a la reducción de la dosis/duración de los tratamientos con la consecuente reducción de la toxicidad y los efectos adversos en comparación con las monoterapias. También podría reducir la falla terapéutica a los tratamientos actuales asociada a la aparición de fármaco resistencia por parte del parásito (Handler, Patel, Kapila, Al-Qubati, y Schwartz, 2015; Barrett y Croft, 2012; Urbina, 2010).

Tratando de implementar un modelo *in vitro* que facilitara la evaluación de combinaciones de fármacos, en el presente trabajo se generaron formas de **AmA** a partir de promastigotes de una cepa de referencias de *L. (V.) panamensis* los cuales al ser caracterizados mostraron resultados interesantes relacionados con la biología de esta especie de parásito prevalente en el territorio colombiano. Las condiciones utilizadas en el estudio (cambios de pH y temperatura, y alta concentración de SFB) fueron similares a la utilizadas por otros autores en la generación de esta forma parasitaria, sin embargo, algunos autores recalcan que las condiciones utilizadas para una especie no necesariamente funcionan en otras especies siendo necesaria la búsqueda de las condiciones particulares y óptimas para cada una (Gupta *et al.*, 2001; Zilberstein y Shapira, 1994).

Estudios iniciales en la obtención de **AmA** a partir de promastigotes fueron realizados con *L. (L) mexicana*, mediante modificación en las la temperatura y pH de cultivo similares a lo realizado en el presente trabajo (Pan, 1984). También Eperon *et al* (1989) utilizando mediante incremento

lento de la temperatura (2°C) hasta alcanzar los 32°C y utilizando una alta densidad de promastigotes, obtuvieron **AmA** de *L. (V.) panamensis* de similar morfología a las obtenidas en el presente trabajo (formas redondeadas, inmóviles, de menor tamaño que los promastigotes y con un flagelo restringido al bolsillo flagelar) (Eperon *et al.*, 1989). Esta última característica fue evidenciada mediante observación de las ultraestructuras bajo microscopía electrónica (Eperon y McMahon-Pratt, 1989). Por otro lado, Teixeira *et al* (2002) lograron obtener **AmA** a partir de promastigotes en otras especies como *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) chagasi* utilizando valores de temperatura, pH y porcentajes de SFB específicos para cada especie (Teixeira *et al.*, 2002).

El mayor porcentaje de transformación (98% de promastigotes transformados en **AmA**) se observó para el tercer día de cultivo, similar a lo encontrado en el presente estudio para *L. (V.) panamensis*. Otra similitud encontrada con nuestro estudio es el porcentaje ideal de SFB para la transformación de dicha especie (20%). Las temperaturas y porcentajes de SFB ideales para *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) chagasi* fueron 34°C/20% y 35°C/5%, respectivamente (32°C/20% en el presente trabajo) Interesantemente, el tiempo requerido para obtener porcentajes de transformación superiores al 90% para estas especies fue superior al requerido por *L. (V.) braziliensis* (Teixeira *et al.* ., 2002). Lo anterior demuestra la necesidad de establecer condiciones óptimas de transformación específicas para cada especie de *Leishmania* spp.

Se han encontrado diferencias en la expresión de proteínas de la familia RAN (en inglés *Ras Related Nuclear protein*) entre promastigotes y **AmA** de *L. (V.) panamensis*, las cuales están fuertemente asociadas con el metabolismo parasitario (Walker *et al.*, 2006; Takai, Sasaki, y Matozaki, 2001) .Igualmente se ha demostrado la expresión de otras proteínas diferenciales entre ambas formas de vida; por ejemplo en promastigotes se ha reportado sobreexpresión de enzimas

implicadas en la vía de la glicolisis en comparación con **AmA**, los cuales aumentan los niveles de expresión de enzimas implicadas en la beta oxidación de ácidos grasos y en vías gluconeogénicas, más lentas en la producción de energía en comparación con la glicolisis (Brotherton *et al.*, 2010). Dichos perfiles metabólicos específicos para ambas formas parasitarias podrían explicar las diferencias encontradas en los **TD** y la población máxima alcanzadas durante los 10 días de evaluación del crecimiento.

Adicionalmente, los promastigotes comenzaron a disminuir su número a partir del séptimo día mientras que los **AmA** mantuvieron su número estable hasta el final del experimento (día 10). Este comportamiento podría considerarse como quiescente. *In vivo* se ha demostrado la posible quiescencia de los amastigotes intracelulares implicada con la formación de granulomas, represión de vías en los macrófagos relacionadas con la apoptosis, autofagia y necrosis; así con un bajo crecimiento y mantenimiento de la carga parasitaria (Kloehn, Saunders, O'Callaghan, Dagley, y McConville, 2015). Es posible que los **AmA** entren, de manera similar a lo reportado *in vivo*, en un estado de quiescencia *in vitro*; metabólicamente menos activos en comparación con los promastigotes (Kloehn *et al.* , 2015; Saunders *et al.*, 2014).

Ambas formas parasitarias evaluadas en el presente trabajo fueron infectivas tanto *in vitro* como *in vivo*. En ambos modelos los promastigotes fueron más infectivos en comparación con los **AmA**, infectando un mayor porcentaje de células *in vitro* a las 24 horas (86,5% vs 59%) y requiriendo menos días para generar lesiones cutáneas en el modelo *in vivo* (20 días vs 29,5 días). Esta diferencia en la infectividad ha sido reportada previamente por otros autores en donde por ejemplo Castilla, Sanchez-Moreno, Mesa, y Osuna (1995) mostro que la infección en *L. donovani* en la línea celular J774A.1y, los promastigotes fueron más infectivos que los **AmA** a las 24, 48 y 72 horas posinfección a un radio parásito: célula 1:3, hecho que los autores atribuyen a una mayor

interacción de los promastigotes con las células debido a su movilidad (Castilla, Sanchez-Moreno, Mesa, y Osuna, 1995). Resultados opuestos fueron obtenidos por Balanco *et al* (1998) empleando la misma línea celular, pero infectando con *L (V.) braziliensis*, encontrado mayor infectividad de los **AmA** en comparación con los promastigotes (Balanco *et al*, 1998)

Con respecto a la infectividad *in vivo*, se demostró la capacidad infectiva de ambas formas parasitarias. *In vivo*, Teixeira *et al* (2002) reporta que ambas formas parasitarias de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) chagasi* fueron capaces de generar lesiones en ratones BALB/c. Adicionalmente, los autores reportan que los **AmA** generaron lesiones “ligeramente” de mayor tamaño en comparación con las generadas por promastigotes (Teixeira *et al.*, 2002).

Algunos reportes de infectividad *in vivo* en ratones BALB/c identifican a los **AmA** como una forma parasitaria más infectiva en comparación con los promastigotes (al-Bashir, Rassam, y al-Rawi, 1992). Bates, Robertson, Tetley, y Coombs (1992), reporta diferencias estadísticamente significativas en la evolución de las lesiones en ratones CBA infectados con promastigotes y **AmA** de *L. (L.) mexicana* después de la décima semana de infección. En este estudio sólo se evaluó la evolución de las lesiones durante 4 semanas (28 días), siendo interesante realizar a futuro una evaluación durante un periodo mayor de tiempo (Bates, Robertson, Tetley y Coombs, 1992). Una posible explicación para las diferencias en la infectividad entre ambas formas podría ser la sobreexpresión de moléculas como gp63 en promastigotes metacíclicos en comparación con **AmA** (Saar *et al.*, 1998; Streit, Donelson, Agey, y Wilson, 1996).

La relación entre los niveles de expresión de gp63 y la infectividad ha sido demostrada por Thiakaki *et al* (2006), reportando que una reducción en los niveles de dicha molécula en promastigotes los hace menos infectivos en ratones BALB/c (Thiakaki *et al.*, 2006). Diferencias entre el proteoma entre promastigotes y **AmA** de *L (V.) panamensis*, también contribuirían a

explicar las diferencias en la infectividad en células THP-1 a las 24 horas y en el tiempo de aparición de las lesiones *in vivo* en los ratones BALB/c, al reportarse la expresión diferencial de moléculas asociadas a dicho proceso (Walker *et al.*, 2006). Gupta *et al* (2001) describen los criterios de caracterización de los **AmA**, entre los que se cuentan la morfología celular (ovalada y aflagelar), diferencias en la infectividad *in vivo* e *in vitro* entre promastigotes y AmA y la transformación cíclica mediante reversión de la transformación (Gupta *et al.*,2001). Las formas parasitarias obtenidas en el presente trabajo cumplen con dichos criterios.

Con respecto a la susceptibilidad a los fármacos evaluados, las diferencias encontradas entre promastigotes y **AmA** para MTF ($p < 0,01$), KTZ ($p < 0,05$) y PM ($p < 0,05$) ya han sido reportadas para otras especies de *Leishmania* (Zulfiqar *et al.*, 2017; Vermeersch *et al.*, 2009) . Para el caso específico de MTF, Scariot *et al* (2017) encuentran diferencias en la susceptibilidad al fármaco entre diferentes formas parasitarias de *L. (L.) amazonensis*, siendo los promastigotes menos susceptibles en comparación con la forma axénica y la intracelular de los amastigotes. De Rycker *et al* (2013) reportan la actividad de varios fármacos de uso clínico en leishmaniasis, entre los cuales se encuentran MTF, KTZ, PM y PMD, en **AmA** y amastigotes intracelulares de *L. donoviani*. En este trabajo, los autores reportan niveles de actividad similares para estos fármacos en ambas formas parasitarias (De Rycker *et al.*;2013).

Específicamente para *L (V.) panamensis*, Obonaga *et al* (2014) reportan la actividad de MTF en promastigotes y amastigotes intracelulares, siendo estos últimos farmacológicamente más susceptibles. También en *L (V.) panamensis* Escobar, Matu, Marques, y Croft (2002) reportan mayor susceptibilidad en promastigotes en comparación con amastigotes intracelulares (Escobar, Matu, Marques, y Croft., 2002). La diferencia en la susceptibilidad de distintas formas parasitarias de una misma especie, podría explicarse por las divergencias fisiológicas demostradas por las

diferencias en las cinéticas de crecimiento e infectividad demostradas en este estudio, así como por las diferencias en los perfiles y niveles de expresión génica y proteica (Aoki *et al.*, 2017; Brotherton *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2006).

A pesar la ausencia de interacciones de tipo sinérgica en las combinaciones evaluadas en el presente estudio (MTF: KTZ, MTF:PM y MTF: PMD), en el radio 2:3 para la combinación MTF: PMD se presentó un efecto de potenciación en la actividad de ambos fármacos ($FIC \leq 0,5$). Debido a la dificultad que reviste alcanzar una razón 2:3 de MTF:PM en el sitio de acción *in vivo*, debido a la ruta de administración, farmacocinética y farmacodinamia en el individuo, no es posible asegurar que se observara un efecto de potenciación al administrar en combinación ambos fármacos (Seifert y Croft, 2006).

Efectos de potenciación o sinergismo en la actividad anti-*Leishmania* de dos compuestos puede ser observado cuando ambos actúan en una misma vía bioquímica del parásito (Urbina, 2010; Johnson, MacDougall, Ostrosky-Zeichner, Perfect, y Rex, 2004). Es posible concluir que, a pesar del desconocimiento de los mecanismos exactos de acción anti-*Leishmania* de los fármacos evaluados en este estudio, ninguno de las combinaciones probadas actúe sobre una misma ruta bioquímica. Con respecto al KTZ, Andrade *et al* (2016) reporta una interacción de tipo sinérgica entre el fármaco y miconazol en promastigotes de *L. (L.) amazonensis*. Al evaluar la combinación en amastigotes intracelulares de la misma especie, encuentran una interacción de tipo aditivo. Posteriormente, realizaron la evaluación de la combinación en ratones BALB/c con lesiones en la oreja ocasionadas por *L. (L.) amazonensis*, encontrado que el tratamiento combinado oral resulta ser más efectivo que la monoterapia con cada uno de los fármacos, reduciendo el tamaño de la lesión y la carga parasitaria en el tejido (Andrade *et al.*, 2016).

En otro estudio, realizado por Gangneux, Dullin, Sulahian, Garin, y Derouin (1999), demostraron que el KTZ a dosis de 50 mg/kg de peso el KTZ fue capaz de aumentar la efectividad de los Sb^V reduciendo la carga parasitaria en bazo en un modelo murino de LV ocasionada por *L. (L.) infantum* (Gangneux, Dullin, Sulahian, Garin, y Derouin, 1999).

En amastigotes intracelulares de *L. (L.) infantum*, Nunes *et al* (2017) reportan un efecto de tipo aditivo entre KTZ y Sb^V (Nunes *et al.*, 2017). Tanto KTZ como MTF mostraron ser selectivos *in vitro* individualmente con índices superiores a 3. Los índices inferiores a 3 reportados para la MTF en combinación en un radio 4:1 en unas de las réplicas y para KTZ 1:4 en ambos ensayos, no fueron suficientes para descartar la combinación como segura para su administración *in vivo*, pues el \square IS para los radios de combinación en cada fármaco fueron superiores a 3.

Con respecto a la PM, De Morais-Teixeira, Gallupo, Rodrigues, Romanha, y Rabello (2014) han observado interacciones de potenciación *in vitro* en combinaciones PM: MTF y PM:AmB en *L. (L.) amazonensis*. En *L. (V.) braziliensis*, los mismo autores reportan sinergismo entre PM:glucantime y entre PM:Anfotericina B en *L. (L.) infantum* (De Morais-Teixeira, Gallupo, Rodrigues, Romanha, y Rabello,2014).

Seirfert y Croft (2006) reportan interacciones de potenciación *in vitro* entre MTF y el estibogluconato de sodio en *L. (L.) donovani* (Seirfert y Croft, 2006). *In vivo*, tanto Seirfert y Croft (2006) como Hendrick *et al* (2017) no encuentran una correlación entre las interacciones reportadas *in vitro* con las terapias combinadas en el modelo murino de infección tanto (Hendrick *et al* 2017; Seirfert y Croft,2006).Debido a esta falta de correlación *in vitro-in vivo*, a la selectividad de la combinación *in vitro* y a la disponibilidad del fármaco para realizar formulaciones de administración oral y tópica, se eligió la combinación MTF: KTZ para ser evaluada *in vivo*.

En cuanto a la idoneidad de los **AmA** como plataforma para la búsqueda de fármacos con actividad anti-*Leishmania* en comparación con los amastigotes intracelulares, De Rycker *et al* (2013) prueban en ambos modelos una librería de 16000 componentes, encontrando un total de 378 componentes activos para amastigotes axénicos frente a 83 compuestos activos para amastigotes intracelulares. Bajo dichos resultados los autores concluyen que los amastigotes axénicos generan un gran porcentaje de resultados falsos positivos en comparación con los amastigotes intracelulares, sugiriendo este último como el modelo más sustentable para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anti-*Leishmania* (De Rycker *et al.*, 2013). Cabe resaltar que los autores realizan la evaluación en *L. donovani*, por lo que la aseveración anteriormente mencionada aplicaría solamente a la especie empleada, al presentarse resultados de actividad dependientes de la especie y de la línea celular utilizada (Fernández *et al.*, 2012; Seifert, Escobar, y Croft, 2010).

Los ensayos de dosis-respuesta *in vivo* permiten cuantificar parámetros de efectividad de un tratamiento como la DE₅₀ y la dosis óptima específicas para el fármaco, modelo animal y especie de *Leishmania*. En el régimen de tratamiento oral con diferentes dosis de MTF de lesiones cutáneas en ratone BALB/c infectados con *L. (V.) panamensis* evaluado en el presente estudio, se encontró una ED₅₀ de 2,56 mg/kg de peso y una dosis sub-óptima de 2,5 mg/kg de peso. Tanto la dosis sub-óptima como la dosis óptima de 7,5mg/kg de peso fueron seguras al no causar pérdida de peso durante el tratamiento y seguimiento (datos no mostrados) ni alteraciones a nivel renal (bioquímicas), hepático (bioquímicas y biopsias) o bazo (biopsias).

In vivo, Escobar *et al* (2001) reportan una ED₅₀ de 7,48mg/kg de peso para MTF administrada oralmente en un modelo de leishmaniasis visceral en ratones BALB/c infectados con *L. donovani* (Escobar *et al.*, 2001). En un modelo de leishmaniasis cutánea en ratones BALB/c infectados en

la oreja con *L. (L.) amazonensis*, Andrade *et al* (2016) evalúan una dosis oral de 20 mg/kg de peso durante 35 días. Los autores reportan una disminución del grosor de la lesión estadísticamente significativa con respecto al control sin tratamiento (Andrade *et al.*,2016). Adicionalmente la dosis no mostró ser tóxica al no ocasionar alteraciones en las pruebas bioquímicas realizadas al momento del sacrificio.

Ensayos clínicos realizados por Soto *et al* (2001) tratando 72 pacientes con diagnóstico de leishmaniasis cutánea y tratados con diferentes dosis de MTF oral durante 3 semanas. Los autores reportan una dosis de 2,25 mg/kg de peso durante 3 a 4 semanas es efectivo y tolerable por los pacientes(Soto *et al.*, 2001). Posteriormente, Soto *et al* (2004) evalúan esta dosis en regiones de Colombia endémicas para *L. (V.) panamensis*, reportando una efectividad del 91%, y en regiones de Guatemala endémicas para *L (V.) braziliensis*. En estas regiones la efectividad fue del 53%(Soto *et al.*, 2004).

En el ensayo de dosis-respuesta de KTZ oral se reportó letalidad para la dosis de 500 mg/kg de peso después del primer día de tratamiento. La dosis letal 50 (DL₅₀) reportada para KTZ en ratones es de 702 mg/kg de peso (Heel *et al.*, 1982). En ninguna de las dosis inferiores (150 y 100 mg/kg de peso) se reportó letalidad ni curación estética o parasitológica de las lesiones. Andrade *et al* (2016), evalúan una dosis oral de KTZ de 100 mg/kg de peso durante 35 días, sin encontrar curación de las lesiones cutáneas ocasionadas por *L. (L.) amazonensis*, pero si una disminución en el tamaño de lesión en comparación con el control no tratado (Andrade-Neto *et al.*, 2016). Saenz *et al* (1990) en su reporte clínico de la eficacia del KTZ oral en casos de leishmaniasis cutánea por *L. (V.) panamensis*, reportan un 76% de pacientes con curación estética para una dosis de 600 mg/día. Es posible que dosis superiores a 150 mg/kg de peso e inferiores a la dosis letal de 500

mg/kg de peso puedan generar curación estética y/o parasitológica en el modelo propuesto en el presente estudio.

De manera similar, no se logró observar un efecto dosis respuesta al administrar formulaciones tópicas con diferentes porcentajes de KTZ (6,10 y 15%), sin que se presentara curación ni parasitológica ni estética en los roedores tratados.

Ensayos clínicos con KTZ tópico como el realizado en Iran por Momeni *et al* (2003), no logran encontrar una diferencia entre el tratamiento y el placebo. Con el fin de complementar los hallazgos reportados en el presente estudio en la evaluación del KTZ oral y el KTZ tópico, un estudio de biodisponibilidad del KTZ para ambas vías de administración podría ser efectuado, lo que permitiría plantear el uso de vehículos que aumenten la permeación del fármaco como lo son las microemulsiones, por ejemplo (Patel, Patel, Parikh, Solanki, y Patel, 2011).

Ni el tratamiento individual con KTZ tópico al 3% como el tratamiento combinado de KTZ 3% con MTF oral 2,5 mg/kg de peso mostraron ser efectivos en la curación estética y parasitológica. El uso de una terapia combinada de KTZ tópico al 3% junto con MTF oral a una dosis sub-óptima de 2,5 mg/kg de peso no mostró curación estética ni parasitológica, como tampoco lo hicieron los grupos tratados con el vehículo no los controles sin tratamiento. Tampoco se observó una reducción en la carga parasitaria con respecto a los controles no tratados.

Estudios de terapia combinada como el realizado por Hendrickx *et al* (2017) en un modelo de leishmaniasis visceral ocasionada por *L. (L.) infantum* en hámsteres, los autores reportar mayor reducción en la carga parasitaria al administrar en combinación MTF y PM en comparación con la monoterapia (Hendrickx *et al.*, 2017). Wijnant *et al* (2017) evalúan la actividad individual y combinada de cloroquina y PM administradas por vía intraperitoneal en un modelo de leishmaniasis cutánea causada por *L. major* y *L. (L.) mexicana* en ratones BALB/c. Tanto la

monoterapia con PM como la terapia combinada con cloroquina generan curación estética en los ratones infectados con *L. major*, disminuyendo también la carga parasitaria, pero sin lograr curación parasitológica (Wijnant *et al.*,2017).

En los ratones infectados con *L (L.) mexicana* no se observa ni curación estética ni reducción de la carga parasitaria con respecto a los controles sin tratamiento. Cabe resaltar que la cloroquina no genera ningún efecto sobre la actividad de la PM, reportándose los mismo niveles de carga parasitaria tanto en la monoterapia con PM como en la terapia combinada (Wijnant, Van Bocxlaer, Yardley, Murdan, y Croft, 2017).

A pesar de ser un tratamiento seguro, que no genera irritación ni corrosión en piel aplicada a una sola dosis ni alteraciones en hígado, bazo y riñón, la administración de KTZ tanto oral como tópico no fue efectiva ni en monoterapia en la curación estética ni parasitológica de lesiones ocasionadas por *L (V.) panamensis*. Dosis iguales o superiores a 7,5 mg/kg de peso de MTF oral durante 15 días fueron capaces de curar la lesión y eliminar al parásito del tejido infectado, pero dosis sub optimas son incapaces de hacerlo. Una vez suspendido el tratamiento oral con MTF 2,5 mg/kg de peso después de 15 días, la eliminación parcial de parásitos pudo recuperarse, con el consecuente incremento en el tamaño de lesión, debido a que el KTZ no mostró ningún efecto anti-*Leishmania in vivo* ni por la vía tópica ni por la vía oral *in vivo*. Debido a esto, la combinación de KTZ tópico 3% junto con dosis sub-optimas de MTF no resulta curativa en el modelo evaluado en el presente estudio.

7. Conclusiones

La caracterización comparativa de promastigotes y **AmA** de *L.(V.) panamensis* indica que estos últimos son una forma diferente en cuanto morfología, crecimiento e infectividad. Esto, sumado a sus similitudes morfológicas con los amastigotes intracelulares y su fácil obtención, una vez establecidas las condiciones óptimas de cultivo, los convierten en un modelo interesante para la evaluación de compuestos con posible actividad anti-*Leishmania*.

La determinación del tipo de interacción farmacológica en **AmA** mostró ser un modelo rápido, fácil y confiable, mostrando reproducibilidad en los ensayos efectuados. A pesar de no encontrarse efectos sinérgicos en las combinaciones evaluadas, todas mostraron una mayor actividad en combinación en comparación con su actividad individual. Las combinaciones MTF:PM y MTF:PMD resultarían ser buenos candidatos para ser evaluados *In vivo* una vez establecida su citotoxicidad combinada *in vitro*.

El reporte de las dosis óptimas de MTF oral en el modelo de infección por *L. (V.) panamensis* en ratones BALB/c permitiría la posterior evaluación de compuestos con potente actividad anti-*Leishmania*, en bajas dosis y durante periodos de tratamientos cortos, en combinación con MTF oral en dosis óptimas.

La inefectividad del KTZ aplicado tanto oral como tópicamente *in vivo*, posiblemente debida a la baja biodisponibilidad del fármaco en el sitio de lesión, podría remediarse mediante el uso de formulaciones con un vehículo que aumente dicha biodisponibilidad. Un tratamiento combinado

de MTF oral a dosis sub-óptimas (2,5mg/kg de peso) con KTZ oral o tópico formulado en dicho vehículo podría resultar efectivo en la curación de las lesiones cutáneas.

Referencias Bibliográficas

- Al-Bashir, N. T., Rassam, M. B., y Al-Rawi, B. M. (1992). Axenic cultivation of amastigotes of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and their infectivity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86(5), 487–502.
- Al-Kamel, M. A. N. (2017). Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. *Clinical Skin Cancer*, 2(1–2), 54–58.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Gómez, M. J., Moreno, I., Domínguez, M., Parro, V., y Larraga, V. (2010). Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1497–1516.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7(5), e35671.
- Andrade-Neto, V. V., Cunha-Júnior, E. F., Canto-Cavalheiro, M. M., Atella, G. C., Fernandes, T. de A., Costa, P. R. R., y Torres-Santos, E. C. (2016). Antileishmanial activity of ezetimibe: inhibition of sterol biosynthesis, In vitro synergy with azoles, and efficacy in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6844–6852.
- Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Müller, K. E., Nerland, A. H., y Floeter-Winter, L. M. (2017). RNA-seq transcriptional profiling of *Leishmania amazonensis* reveals an arginase-dependent gene expression regulation. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 11(10), e0006026.
- Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R., y Kroeger, A. (2001). Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 466–70.

- Asilian, A., Jalayer, T., Whitworth, J. A., Ghasemi, R. L., Nilforooshzadeh, M., y Olliaro, P. (1995). A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(6), 648–51.
- Rico, CI, Rodríguez, J, Conde, CA, Mantilla, JC, & Escobar, P. (2013). Permeación en piel y biodistribución de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) aplicada tópicamente en ratas Wistar. *Revista Argentina de Dermatología*, 94(2) Recuperado en 28 de febrero de 2018, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2013000200002&lng=es&tlng=es.
- Balanco, J., Pral, E., da Silva, S., Bijovsky, A., Mortara, R., y Alfieri, S. (1998). Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. *Parasitology*, 116(2), 103–113.
- Baratta, J. L., Ngo, A., Lopez, B., Kasabwalla, N., Longmuir, K. J., y Robertson, R. T. (2009). Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(6), 713–726.
- Barral, A., Guerreiro, J., Bomfim, G., Correia, D., Barral-Netto, M., y Carvalho, E. M. (1995). Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(3), 256–9.
- Barrett, M. P., y Croft, S. L. (2012). Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin*, 104(1), 175–96.
- Basselin, M., Coombs, G. H., y Barrett, M. P. (2000). Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 109(1), 37–46.
- Bates, P. A., Robertson, C. D., Tetley, L., y Coombs, G. H. (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*, 105 (Pt 2), 193–202.
- 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. *The New England Journal of Medicine*, 368(6), 524–32.

- Besteiro, S., Tonn, D., Tetley, L., Coombs, G. H., y Mottram, J. C. (2008). The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *Journal of Cell Science*, 121(5), 561–570.
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Morrison, L. S., Coombs, G. H., y Mottram, J. C. (2006). Endosome Sorting and Autophagy Are Essential for Differentiation and Virulence of *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 11384–11396.
- Biorad. (2017). *Alamar Blue Assay Protocol: Measuring cytotoxicity or proliferation*. Recuperado el 20 de junio de 2017, a partir de <https://www.bio-rad-antibodies.com/measuring-cytotoxicity-proliferation-spectrophotometry-fluorescence-alamarblue.html>
- Botero, M. C., Puentes-Herrera, M., y Cortés, J. A. (2014). Formas lipídicas de anfotericina. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 518–527.
- 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.
- Bryceson, A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical Medicine and International health*, 6(11), 928–34.
- Burchmore, R. J. S., Rodriguez-Contreras, D., McBride, K., Barrett, M. P., Modi, G., Sacks, D., Landfear, S. M. (2003). Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3901–3906.
- Carter, K. C., Alexander, J., y Baillie, A. J. (1989). Studies on the topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis: the therapeutic effect of methyl benzethonium chloride and the aminoglycosides, gentamicin and paromomycin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 83(3), 233–9.
- Castilla, J. J., Sanchez-Moreno, M., Mesa, C., y Osuna, A. (1995). *Leishmania donovani*: in vitro culture and [1H] NMR characterization of amastigote-like forms. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 142(2), 89–97.

- Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 455–465.
- Charan, J., y Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology y Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303–6.
- Chatelain, E., y Ioset, J.-R. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Drug Design, Development and Therapy*, 5, 175–81.
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–81.
- Croft, S. L., y Brazil, R. P. (1982). Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*. *Annals of Tropical Medicine and parasitology*, 76(1), 37–43.
- Da Silva, I. A., Morato, C. I., Quixabeira, V. B. L., Pereira, L. I. de A., Dorta, M. L., de Oliveira, M. A. P., Ribeiro-Dias, F. (2015). *In Vitro* Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. *BioMed Research International*, 2015, 1–15.
- De Moraes-Teixeira, E., Aguiar, M. G., Soares de Souza Lima, B., Ferreira, L. A. M., y Rabello, A. (2015). Combined suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(12), 3283–90.
- De Moraes-Teixeira, E., Gallupo, M. K., Rodrigues, L. F., Romanha, A. J., y Rabello, A. (2014). *In vitro* interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 150–154.
- De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., ... Gray, D. W. (2013). Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 2913–2922.

- Depledge, D. P., Evans, K. J., Ivens, A. C., Aziz, N., Maroof, A., Kaye, P. M., y Smith, D. F. (2009). Comparative Expression Profiling of *Leishmania*: Modulation in Gene Expression between Species and in Different Host Genetic Backgrounds. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 3(7), e476. Recuperado el 28 de febrero de 2018, de 10.1371/journal.pntd.0000476
- Díaz, M. V., Miranda, M. R., Campos-Estrada, C., Reigada, C., Maya, J. D., Pereira, C. A., y López-Muñoz, R. (2014). Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 134, 1–9.
- Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., y de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–97.
- El-On, J., Jacobs, G. P., Witztum, E., y Greenblatt, C. L. (1984). Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(5), 745–51.
- Elias, P. M., y Menon, G. K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in Lipid Research*, 24, 1–26.
- Eperon, S., y McMahon-Pratt, D. (1989). Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. *The Journal of Protozoology*, 36(5), 502–10.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C., y Croft, S. L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta tropica*, 81(2), 151–7.
- Escobar, P., Yardley, V., y Croft, S. L. (2001). Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), AmBisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in Immunodeficient scid Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1872–1875.
- Feng, X., Rodriguez-Contreras, D., Buffalo, C., Bouwer, H. G. A., Kruvand, E., Beverley, S. M., y Landfear, S. M. (2009). Amplification of an alternate transporter gene suppresses the

- avirulent phenotype of glucose transporter null mutants in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology*, 71(2), 369–381.
- Fernández, O., Diaz-Toro, Y., Valderrama, L., Ovalle, C., Valderrama, M., Castillo, H. Saravia, N. G. (2012). Novel approach to in vitro drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2207–11.
- Fyhrquist, N., Salava, A., Auvinen, P., y Lauerma, A. (2016). Skin Biomes. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(5), 40.
- Gangneux, J. P., Dullin, M., Sulahian, A., Garin, Y. J., y Derouin, F. (1999). Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1), 172–4.
- Garnier, T., Mäntylä, A., Järvinen, T., Lawrence, M. J., Brown, M. B. and Croft, S. L. (2007), Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59: 41–49
- Geraldo, M. V., Silber, A. M., Pereira, C. A., y Uliana, S. R. B. (2005). Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 242(2), 275–280.
- Gessner, P. K., y Cabana, B. E. (1970). A study of the interaction of the hypnotic effects and of the toxic effects of chloral hydrate and ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 174(2), 247–259.
- Girginkardeşler, N., Balcıoğlu, İc., Yereli, K., Özbilgin, A., y Özbel, Y. (2001). Cutaneous Leishmaniasis Infection in Balb/c Mice Using a *Leishmania tropica* Strain Isolated From Turkey. *Journal of Parasitology*, 87(5), 1177–1178.
- Gokool, S. (2003). σ 1- and μ 1-Adaptin Homologues of *Leishmania mexicana* Are Required for Parasite Survival in the Infected Host. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29400–29409.
- González, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., y Tweed, J. A. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 15(2), CD004834.

- Gopferich, A., y Lee, G. (1991). Prediction of Percutaneous Penetration A method for the prediction of in vivo blood levels during application of matrix-type and membrane-controlled-type transdermal delivery devices. *IBC Technical Services*. 1991.
- Goto, H., y Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(4), 419–433.
- Grogl, M., Schuster, B. G., Ellis, W. Y., y Berman, J. D. (1999). Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin. *The Journal of Parasitology*, 85(2), 354–9.
- Guo, Y., Shalaev, E., y Smith, S. (2013). Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49, 137–144.
- Gupta, G., Oghumu, S., y Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 155–184.
- Gupta, N., Goyal, N., y Rastogi, A. K. (2001). In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, 17(3), 150–3.
- Haldar, A. K., Sen, P., Roy, S., Haldar, A. K., Sen, P., y Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular Biology International*, 2011, 571242.
- Hall, M. J., Middleton, R. F., y Westmacott, D. (1983). The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 11(5), 427–433.
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., y Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(6), 911–926.
- Hart, D. T., y Coombs, G. H. (1982). *Leishmania mexicana*: Energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Experimental Parasitology*, 54(3), 397–409.

- Hasne, M.-P., y Ullman, B. (2005). Identification and Characterization of a Polyamine Permease from the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15188–15194.
- Haughan, P. A., Chance, M. L., y Goad, L. J. (1992). Synergism in vitro of lovastatin and miconazole as anti-leishmanial agents. *Biochemical Pharmacology*, 44(11), 2199–2206.
- Heel, R. C., Brogden, R. N., Carmine, A., Morley, P. A., Speight, T. M., y Avery, G. S. (1982). Ketoconazole: A Review of its Therapeutic Efficacy in Superficial and Systemic Fungal Infections. *Drugs*, 23(1–2), 1–36.
- Hendrickx, S., Van den Kerkhof, M., Mabile, D., Cos, P., Delputte, P., Maes, L., y Caljon, G. (2017). Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005620.
- Herman, J. D., Gallalee, J. V., y Best, J. M. (1987). Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid β -oxidation in *leishmania mexicana amastigotes*. *Biochemical Pharmacology*, 36(2), 197–201.
- Hochedez, P., y Caumes, E. (2008). Common Skin Infections in Travelers. *Journal of Travel Medicine*, 15(4), 252–262.
- Hodgkinson, V. H., Soong, L., Duboise, S. M., y McMahon-Pratt, D. (1996). *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Experimental Parasitology*, 83(1), 94–105.
- INS. (2010). *Guía protocolo para la vigilancia en salud pública de leishmaniasis*. Recuperado el 18 de septiembre de 2015, a partir de <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Leishmaniasis%20viceral/01%20protocolo%20Leishmaniasis.pdf>
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Myler, P. J. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436–442.
- J.M. Ramos, y M. Segovia. (1997). Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis. *Revista Española de Quimioterapia*, 10(1). 26-35

- Jha, R. K., Sah, A. K., Shah, D. K., y Sah, P. (2013). The treatment of visceral leishmaniasis: safety and efficacy. *JNMA; journal of the Nepal Medical Association*, 52(192), 645–651.
- Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z., Cao, Z. W., Li, Y., ... Chen, Y. Z. (2009). Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(2), 111–128.
- Johnson, M. D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J. R., y Rex, J. H. (2004). Combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 693–715.
- Karimkhani, C., Wanga, V., Coffeng, L. E., Naghavi, P., Dellavalle, R. P., y Naghavi, M. (2016). Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 584–591.
- Kitano, H. (2007). A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nature reviews. Drug Discovery*, 6(3), 202–10.
- Kloehn, J., Saunders, E. C., O’Callaghan, S., Dagley, M. J., y McConville, M. J. (2015). Characterization of Metabolically Quiescent *Leishmania* Parasites in Murine Lesions Using Heavy Water Labeling. *Plos Pathogens*, 11(2), e1004683.
- Krause, G., y Kroeger, A. (s/f). Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 92–4.
- Lee, M. H., Lim, B., Kim, J. W., An, E. J., y Lee, D. (2012). Effect of composition on water permeability of model stratum corneum lipidmembranes. *Soft Matter*, 8(5), 1539–1546.
- Lee, S. H., Stephens, J. L., y Englund, P. T. (2007). A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nature Reviews Microbiology*, 5(4), 287–297.
- Liegl, U., Bogner, J. R., y Goebel, F. D. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus following pentamidine therapy in a patient with AIDS. *The Clinical Investigator*, 72(12), 1027–9.

- Lobo, I. M. F., Soares, M. B. P., Correia, T. M., de Freitas, L. A. R., Oliveira, M. I., Nakatani, M., David, J. R. (2006). Heat therapy for cutaneous leishmaniasis elicits a systemic cytokine response similar to that of antimonial (Glucantime) therapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(7), 642–9.
- Lodge, R., Diallo, T. O., y Descoteaux, A. (2006). Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cellular Microbiology*, 8(12), 1922–1931.
- Loewe, S. (1953). The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittel-Forschung*, 3(6), 285–90.
- López C. L, Barco MA, C.-A. J. (2016). Eficacia de Los Azoles en el Tratamiento de la Leishmaniasis Cutanea. *Archivos de Medicina*. 12(2), 1698-1709
- Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P. X., y Robert-Gero, M. (1997). *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, 232(2), 339–348.
- Maarouf, M., Lawrence, F., Croft, S. L., y Robert-Gero, M. (1995). Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitology Research*, 81(5), 421–425.
- Machado, P. R. L., Lessa, H., Lessa, M., Guimarães, 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: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(6), 788–93.
- Machado, P. R., Rosa, M. E. A., Costa, D., Mignac, M., Silva, J. S., Schriefer, A., Carvalho, E. M. (2011). Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(8), 438–444.
- Martinez, S., y Marr, J. J. (1992). Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, 326(11), 741–4.

- McConville, M. J., de Souza, D., Saunders, E., Likic, V. A., y Naderer, T. (2007). Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends in Parasitology*, 23(8), 368–75.
- McGwire, B. S., y Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 107(1), 7–14.
- Miranda, C., Llanos, A., Arévalo, 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 : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(10), 1395–403.
- Mishra, M., Singh, M. P., Choudhury, D., Singh, V. P., y Khan, A. B. (1991). Amphotericin B for second-line treatment of Indian kala-azar. *Lancet (London, England)*, 337(8746), 926.
- Mohapatra, S. (2014). Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical parasitology*, 4(1), 4–9.
- Momeni, A. Z., Aminjavaheri, M., y Omidghaemi, M. R. (2003). Treatment of cutaneous leishmaniasis with ketoconazole cream. *The Journal of Dermatological Treatment*, 14(1), 26–29.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C., y Van der Auwera, G. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(7), 1453–1461.
- Moreira, W., Leprohon, P., y Ouellette, M. (2011). Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death and Disease*, 2(9), e201.
- Motulsky, H. (2010). *Intuitive biostatistics: a nonmathematical guide to statistical thinking*. Oxford, Inglaterra: Oxford University Press.
- Mukherjee, S. B., Das, M., Sudhandiran, G., y Shaha, C. (2002). Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24717–27.

- Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., ... Wasunna, M. (2012). Sodium Stibogluconate (SSG) yamp; Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1674.
- Naderer, T., Ellis, M. A., Sernee, M. F., De Souza, D. P., Curtis, J., Handman, E., y McConville, M. J. (2006). Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5502–5507.
- Naderer, T., y McConville, M. J. (2007). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology*, 10(2), 301–308.
- Naderer, T., y McConville, M. J. (2011). Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays In Biochemistry*, 51, 81–95.
- Naderer, T., Wee, E., y McConville, M. J. (2008). Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence. *Molecular Microbiology*, 69(4), 858–869.
- Neghina, R., Neghina, A. M., González-Alcón, C., Valladares, B., Wimmer, B., Torres, N. V, Gaudet, S. (2010). Leishmaniasis, a global concern for travel medicine. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(8), 563–570.
- Neira, L. F., Stashenko, E., y Escobar, P. (2014). Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Salud UIS*, 46(1), 15–22.
- Neva, F. A., Ponce, C., Ponce, E., Kreutzer, R., Modabber, F., y Olliaro, P. (1997). Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(4), 473–475.
- Niazi, S. (2004). Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Liquid Products. CRC Press.
- Nunes, D. C. de O., Bispo-da-Silva, L. B., Napolitano, D. R., Costa, M. S., Figueira, M. M. N. R., Rodrigues, R. S., Yoneyama, K. A. G. (2017). *In vitro* additive interaction between ketoconazole and antimony against intramacrophage *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *Plos One*, 12(6), e0180530.

- Obonaga, R., Fernandez, O. L., Valderrama, L., Rubiano, L. C., Castro, M. d. 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.
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(1), 1.
- OECD. (2016). *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. Recuperado el 20 de enero de 2016, a partir de: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264224292-en
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V, Marzochi, M. C., y Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta tropica*, 118(2), 87–96.
- Olivier, M., Gregory, D. J., y Forget, G. (2005). Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 293–305.
- OMS. (1996). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias - Segunda edición. Recuperado el 6 de julio de 2016, a partir de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.4.3.html#Jh2924s>
- OMS. (2016). OMS | Leishmaniasis. Recuperado el 18 de septiembre de 2015, a partir de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- OMS. (2010). *Control de las leishmaniasis*. Recuperado el 18 de septiembre de 2015, a partir de <http://www.who.int/asdf/sadfsdf/as5256/es/>
- OMS. (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization technical report series, (975), v–xii, 1-100.
- OMS. (2016). *Dermal Absorption (EHC 235)*. WHO. Recuperado el 20 de enero de 2018, a partir de <http://www.who.int/ipcs/features/2006/ehc235/en/>

- Pan, A. A. (1984). *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Experimental Parasitology*, 58(1), 72–80.
- Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., Solanki, A. B., y Patel, B. G. (2011). Investigating effect of microemulsion components: *In vitro* permeation of ketoconazole. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16(3), 250–258.
- Patino, L. H., Mendez, C., Rodriguez, O., Romero, Y., Velandia, D., Alvarado, M., Ramírez, J. D. (2017). Spatial distribution, *Leishmania* species and clinical traits of Cutaneous Leishmaniasis cases in the Colombian army. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005876.
- Pearson, R. D., y Sousa, A. Q. (1996). Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 22(1), 1–13.
- Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M., y Loiseau, P. M. (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.
- 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.
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., Bern. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596.
- Restrepo, M., Gomez, M. E., y Restrepo, A. (1997). Tratamiento de la leishmaniasis cutánea con ketoconazol. *Acta Médica Colombiana*, 12 (4), 253–269
- Ridley, D. S., De Magalhaes, A. V., y Marsden, P. D. (1989). Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of Pathology*, 159(4), 293–299.
- Roque, A. L. R., y Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 3(3), 251–62.

- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., ... Zilberstein, D. (1998). Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95(1), 9–20.
- Saenz, R. E., Paz, H., y Berman, J. D. (1990). Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Medicine*, 89(2), 147–155.
- Santa-Rita, R. M. (2004). Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 704–710.
- Saunders, E. C., Ng, W. W., Kloehn, J., Chambers, J. M., Ng, M., y McConville, M. J. (2014). Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of *Leishmania mexicana* Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism. *Plos Pathogens*, 10(1), e1003888.
- Scariot, D. B., Britta, E. A., Moreira, A. L., Falziroli, H., Silva, C. C., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V. (2017). Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. *Frontiers in Microbiology*, 8, 255.
- Schaible, U. E., Schlesinger, P. H., Steinberg, T. H., Mangel, W. F., Kobayashi, T., y Russell, D. G. (1999). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *Journal of Cell Science*, 112 (5), 681–93.
- Schubach, A., Haddad, F., Oliveira-Neto, M. P., Degraive, W., Pirmez, C., Grimaldi, G., y Fernandes, O. (1998). Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *The Journal of infectious diseases*, 178(3), 911–4.
- Schubach, A., Marzochi, M. C., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A. V, Araujo, M. L., Oliveira, A. L., ... Marzochi, K. B. (1998). Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 58(6), 824–7.

- Schwartz, E., Hatz, C., y Blum, J. (2006). New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(6), 342–349.
- Scorza, B., Carvalho, E., y Wilson, M. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1296.
- Seifert, K., y Croft, S. L. (2006). *In Vitro and In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 73–79.
- Seifert, K., Escobar, P., y Croft, S. L. (2010). *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 508–511.
- Seifert, K., Pérez-Victoria, F. J., Stettler, M., Sánchez-Cañete, M. P., Castanys, S., Gamarro, F., y Croft, S. L. (2007). Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(3), 229–35.
- Sernee, M. F., Ralton, J. E., Dinev, Z., Khairallah, G. N., O’Hair, R. A., Williams, S. J., y McConville, M. J. (2006). *Leishmania* beta-1,2-mannan is assembled on a mannose-cyclic phosphate primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), 9458–9463.
- Serrano, X., García-Marchan, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G., y Benaim, G. (2009). Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1403–10.
- Sindermann, H., y Engel, J. (2006). Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 17–20.
- Singh, O. P., Singh, B., Chakravarty, J., y Sundar, S. (2016). Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infectious Diseases of Poverty*, 5, 19.
- SIVIGILA. (2016). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Recuperado el 15 de noviembre de 2016, a partir de [http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn Epidemiologico/2015 Boletin epidemiologico Semana 52.pdf](http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf)

- Soares, R. P. P., Cardoso, T. L., Barron, T., Araújo, M. S. S., Pimenta, P. F. P., y Turco, S. J. (2005). Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*, 35(3), 245–253.
- 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), 557–63.
- Soto, J., Grogl, M., y Berman, J. D. (1993). Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 16(3), 417–25.
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266–1272.
- 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 : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 26(1), 56–8.
- 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 : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 20(1), 47–51.
- Soto, J., Toledo, J. T., Gutierrez, P., Arboleda, M., Nicholls, R. S., Padilla, J. R., Grogl, M. (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), 147–51.
- Soto, J., Toledo, J., Gutierrez, P., Nicholls, R. S., Padilla, J., Engel, J., Berman, J. (2001). Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(7), E57-61.

- Streit, J. A., Donelson, J. E., Agey, M. W., y Wilson, M. E. (1996). Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. *Infection and immunity*, 64(5), 1810–8.
- Sudhandiran, G., y Shaha, C. (2003). Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca²⁺ through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 25120–25132.
- Sundar, S., y Chakravarty, J. (2010). Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 159–66.
- Sundar, S., Rai, M., Chakravarty, J., Agarwal, D., Agrawal, N., Vaillant, M., Murray, H. W. (2008). New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single-Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short-Course Oral Miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, 47(8), 1000–1006.
- Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Modabber, F. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*, 377(9764), 477–486.
- Tafuri, W. L., Santos, R. de L., Arantes, R. M. E., Gonçalves, R., de Melo, M. N., Michalick, M. S. M., y Tafuri, W. L. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, 292(1–2), 17–23.
- Takai, Y., Sasaki, T., y Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, 81(1), 153–208.
- Tallarida, R. J. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 1–7.
- Tallarida, R. J., y Raffa, R. B. (1996). Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: replacing the isobologram. *Life Sciences*, 58(2), 23–28.

- Teixeira, M., de Jesus Santos, R., Sampaio, R., Pontes-de-Carvalho, L., y dos-Santos, W. (2002). A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research*, 88(11), 963–968.
- Thakur, C. P., Pandey, A. K., Sinha, G. P., Roy, S., Behbehani, K., y Olliaro, P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(3), 319–22.
- Thiakaki, M., Kolli, B., Chang, K.-P., y Soteriadou, K. (2006). Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes and Infection*, 8(6), 1455–1463.
- Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T., y Louis, J. A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*, 7(5), 545–555.
- Trinconi, C. T., Reimão, J. Q., Yasunaka, J. K. U., Miguel, D. C., y Uliana, S. R. B. (2014). Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2608–2613.
- Unger, A., O’Neal, S., Machado, P. R. L., Guimarães, L. H., Morgan, D. J., Schriefer, A., Carvalho, E. M. (2009). Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4), 574–579.
- Urbina, J. A. (2010). New insights in Chagas disease treatment. *Drugs of the Future*, 35(5), 409.
- Veccihia, B., y Bunge Annette. (2006). Animal models: a comparison of permeability coefficients for excised skin from humans and animal. Carolina del Norte, Estados Unidos. *Dermal Absorption Models In Toxicology And Pharmacology*.
- Vélez, I. D., Jiménez, A., Vásquez, D., y Robledo, S. M. (2015). Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. *Case Reports in Dermatology*, 7(3), 275–86.

- Vermeersch, M., da Luz, R. I., Tote, K., Timmermans, J.-P., Cos, P., y Maes, L. (2009). In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3855–3859.
- Walker, J., Vasquez, J.-J., Gomez, M. A., Drummelsmith, J., Burchmore, R., Girard, I., y Ouellette, M. (2006). Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(1), 64–73.
- Wijnant, G.-J., Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., y Croft, S. L. (2017). Efficacy of Paromomycin-Chloroquine Combination Therapy in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8), e00358-17.
- Wortmann, G., Zapor, M., Ressner, R., Fraser, S., Hartzell, J., Pierson, J., ... Magill, A. (2010). Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), 1028–33.
- Yang, G., Choi, G., y No, J. H. (2016). Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6828–6836.
- Ziaei, H., Sadeghian, G., y Hejazi, S. (2008). Distribution Frequency of Pathogenic Bacteria Isolated from Cutaneous Leishmaniasis Lesions. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(3), 191.
- Zilberstein, D., y Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 449–470.
- Zimmermann, G. R., Lehár, J., y Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today*, 12(1–2), 34–42.
- Zulfiqar, B., Shelper, T. B., y Avery, V. M. (2017). Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*, 22(10), 1516–1531.