

**Preparación, caracterización y evaluación del uso de un kit 3-PACK (Antiséptico-
Queratolítico- Crema de pentamidina) en Leishmaniasis cutánea utilizando un modelo
Murino**

Betsy Yaneth Muñoz Serrano

Tesis de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora:

Patricia Escobar Rivero

Bacterióloga, Ph.D,

Universidad Industrial De Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Proverbios 2:6 Porque el Señor da la sabiduría; conocimiento y ciencia brotan de sus labios.

Primero que todo doy gracias Dios, por su gracia, misericordia y fidelidad.

A la Dra Patricia Escobar Rivero por su dedicación, entrega, sacrificio durante estos dos años y medio, gracias por todas las enseñanzas, gracias por ser un ejemplo mujer esforzada, por su paciencia, por motivarme siempre a dar lo mejor y contribuir grandemente a mi formación como investigadora.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, a mi hijo Edwing Eduardo por su comprensión y regalarme de su tiempo.

A mis compañeros del CINTROP por su apoyo y momentos compartidos, a mis amigas (Liz, Maye, Lina, Andre y Wilmary) y mis amigos (Anyelo, Edwin Escalante, Andres y Jesus) por su respaldo en oración siempre.

Al CINTROP y sus integrantes por permitirme pertenecer al grupo y facilitar los medios para el desarrollo de mi Proyecto.

*A Dra. Sara Robledo y EICOLEISH por la vinculación al proyecto “**Unión Temporal Estrategia Integral para el Control de la Leishmaniasis en Colombia**”.*

Al Dr. Enrique Mejía Ospino y el Laboratorio de Espectrometría de Masas, por el procesamiento de las muestras por HPLC.

Al Dr. Julio Cesar Mantilla y el Departamento de Patología por el procesamiento de las biopsias.

Al Departamento de Ciencias Básicas por el apoyo económico para la asistencia a los congresos internacionales y nacionales.

*Al Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander por su apoyo económico para la asistencia al congreso **6TH WORLD CONGRESS OF LEISHMANIASIS**, realizado en España.*

Tabla De Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos.....	18
1.1 Objetivo general.....	18
1.2 Objetivos específicos	18
2. Marco teórico y estado del arte.....	19
2.1 Leishmaniasis.....	19
2.1.1 Generalidades.....	19
2.1.2 Tratamientos en leishmaniasis	22
2.1.3 Tratamientos tópicos en LC.....	31
2.1.4 La piel: estructura y generalidades.....	35
2.2 La piel como sitio de aplicación de fármacos.....	38
2.3 Formas farmacéuticas utilizadas en los tratamientos tópicos.	40
2.4 Antiséptico, queratolítico y crema de pentamidina [PMD] (3-PACK).....	45
3. Metodología	53
3.1 Preparación y caracterización del 3-PACK	52
3.1.1 Compuestos.....	52
3.1.2 Preparación del 3-PACK.....	52
3.1.3 Caracterización del 3-PACK.....	52
3.2 Esquema de tratamiento del 3-PACK.	57

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN	 6
3.3 Actividad anti- <i>Leishmania</i> del 3-PACK.....	58
3.3.1 Animales y consideraciones éticas.....	58
3.3.2 Infección	58
3.3.3 Grupos experimentales, seguimiento y sacrificio de los ratones	59
3.3.4 Eficacia anti- <i>Leishmania</i> del 3-PACK.....	60
3.4 Eficacia del gel de ácido salicílico.....	61
3.5 Ensayos <i>in vitro</i>	61
3.6 Pruebas de toxicidad de 3-PACK.	62
3.7 Distribución de la PMD hígado y bazo.....	63
3.8 Análisis estadístico.....	65
4. Resultados	66
4.1 Características fisicoquímicas del 3-PACK.....	66
4.2 Implementación de un método de cuantificación de PMD por HPLC y concentración de la PMD en las formulaciones.....	71
4.3 Esquema de tratamiento con el 3-PACK.	72
4.4 Eficacia del tratamiento	73
4.4.1 Eficacia clínica.....	73
4.4.2 Eficacia parasitológica	76
4.5 Estudio histopatológico de las lesiones después del tratamiento.....	79
4.5.1 Eficacia del gel de ácido salicílico (AS) queratolítico.....	81
4.5.2 Actividad del 3-PACK en promastigotes y células THP-1.....	81
4.6 Irritación de las formulaciones en ratones.	82
4.6.1 Concentración de la PMD en el hígado y bazo después del tratamiento	84

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN	 7
4.6.2 Alteraciones físicas y comportamiento	87
4.7 Análisis estadístico.....	88
5. Discusión.....	90
6. Conclusiones.....	100
Referencias Bibliográficas	102

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Especies de Leishmania en el Viejo Mundo y Nuevo Mundo.....	20
Tabla 2. Tratamientos usados en leishmaniasis LC y LV.....	23
Tabla 3. Tratamientos tópicos: métodos físicos en LC.....	33
Tabla 4. Antisépticos y propiedades.....	47
Tabla 5. Potenciadores de la permeación percutánea (PPP) y estructura química.....	51
Tabla 6. Composición porcentual de cada uno de los componentes del 3-PACK.....	53
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de los componentes activos del 3-PACK.....	55
Tabla 8. Análisis semicuantitativo para la estabilidad.....	55
Tabla 9. Características organolépticas del 3-PACK, determinadas 24 horas después de su preparación. A temperatura ambiente (~26°C).....	67
Tabla 10. pH de formulaciones del 3-PACK.....	68
Tabla 11. Eficacia clínica del 3-PACK.....	73
Tabla 12. Análisis parasitológico de las lesiones de LC en los diferentes grupos experimentales.....	78
Tabla 13. Actividad de los componentes del 3-PACK en promastigotes de <i>L. (V) braziliensis</i> y células THP-1.....	83

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Ciclo de vida <i>Leishmania spp.</i>	23
<i>Figura 2.</i> Esquema piel y sus partes	37
<i>Figura 3.</i> Esquema ladrillo estrato corneo.....	38
<i>Figura 4.</i> Diseño metodológico.	51
<i>Figura 5.</i> Equipo de espectroscopia infrarrojo Thermo Scientific™ Nicolet.....	56
<i>Figura 6.</i> Lesión de LC en ratones infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i>	58
<i>Figura 7.</i> Esquema de infección y tratamiento en ratones BALB/c. Rt: radio transversal y RI radio longitudinal.	59
<i>Figura 8.</i> Espectro IR de la solución de CXD al 0,5 %	69
<i>Figura 9.</i> Espectro IR A. Ácido salicílico puro. B. Gel de AS.....	70
<i>Figura 10.</i> Espectros infrarrojo (IR) y.....	70
<i>Figura 11.</i> Curva de calibración concentración de PMD vs área bajo la curva, utilizando HPLC	71
<i>Figura 12.</i> Cromatogramas de PMD.	72
<i>Figura 13.</i> Esquema de tratamiento.....	72
<i>Figura 14.</i> Eficacia clínica. Efecto del tratamiento en el tamaño de lesiones en ratones BALB/c, infectados con <i>L.(V.) braziliensis</i>	75

Figura 15. Eficacia clínica del 3-PACK en ratones BALB/c infectados con *L.(V.) braziliensis*. .
 77

Figura 16. Fotomicrografía de frotis de lesiones de LC en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis* 79

Figura 17. Cortes histológicos de piel de ratón BALB/c infectado con *Leishmania braziliensis*
 80

Figura 18. Aspecto macroscópico de la piel y cortes histológicos de piel de ratones BALB/c
 tratados con el gel de AS al 10%. 82

Figura 19. Efectos de irritación dérmica de los componentes del 3-PACK en ratones BALB/c
 sanos..... 85

Figura 20. Características histológicas de piel de ratón BALB/c tratados con los componentes
 del 3-PACK..... 86

Figura 21. Cromatograma de porcentaje de recuperación PMD 86

Figura 22. Cromatogramas de PMD 87

Figura 23. Peso de los ratones BALB/c al inicio y final del tratamiento. 88

Figura 24. Tratamientos vs control. 89

Abreviaturas

%R	Porcentaje de reducción
A/O	Agua en oleo
AC	Acantosis
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Analgésico antiinflamatorio no esteroideo
AmB	Amfotericina B
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Reflexión total atenuada
CC ₅₀	Concentración Citotóxica 50
CC ₉₀	Concentración Citotóxica 90
CEINCI	Comité de Ética para la Investigación Científica
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CI ₉₀	Concentración Inhibitoria 90
CINTROP	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales
CMC	Carboximetilcelulosa
COOH	Grupo carboxilo
cP	Centipoise
CXD	Digluconato de clorhexidina
DC	Dilatación de capilares.
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación Estándar
EA	Extensibilidad aparente
EC	Estrato corneo
ECC	Envoltura celular cornificada

EE	Estrato espinoso
EG	Estrato granuloso
Es	Estabilidad
ES	Espongiosis
EX	Exocitosis
FB	Fibroblastos
FHN	Factor humectante natural
FP	Folículo piloso
FS	Fotosensibilizadores
GTP	Guanosin trifosfato
h	Hora
HG	Homogeneidad
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
IM	Intramuscular
INS	Instituto Nacional de Salud
IR	Infrarrojo
IV	Intravenosa
KTZ	Ketoconazol
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LogP	Coefficiente de Partición
LV	Leishmaniasis visceral
MBCI	Metilbencetonio
ME	Microemulsiones
MTF	Miltefosina
Na ₂ HPO ₄	Hidrógeno fosfato de sodio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrógeno fosfato de sodio

ND	No determinado
NE	Nanoemulsiones
O/A	Oleo en agua
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
OH	Grupo hidroxilo
PcAlCl	Ftalocianina de aluminio clorada
PG	Propilenglicol
Pka	Logaritmo de la constante de disociación ácida
PM	Sulfato de paromomicina
PM	Peso molecular
PMD	Diisetonato de pentamidina
PPP	Potenciadores de la permeación percutánea
PQ	Paraqueratodis
pt	Posttratamiento
Q	Queratina
RI	Radio longitudinal
Rt	Radio transversal
Sb ^V	Antimoniales pentavalentes
TEA	Trietanolamina
TFD	Terapia fotodinámica
UV	Ultravioleta visible

Resumen

TÍTULO: PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL USO DE UN KIT 3-PACK (ANTISÉPTICO-QUERATOLÍTICO-CREMA DE PENTAMIDINA) EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA UTILIZANDO UN MODELO MURINO*.

AUTORES: BETSY YANETH MUÑOZ SERRANO, PATRICIA ESCOBAR RIVERO**

PALABRAS CLAVE: LEISHMANIASIS CUTÁNEA, PENTAMIDINA, TRATAMIENTO TÓPICO, QUERATOLITICO, FORMULACIONES TÓPICAS, ANTISÉPTICO

DESCRIPCIÓN:

Las lesiones de leishmaniasis cutánea (LC) producidas por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, generalmente son lesiones nodulares de centro exudado, con una costra adherida (hiperqueratosis) y una úlcera debajo de la costra. Las lesiones se encuentran sobreinfectadas con microorganismos (bacterias, hongos) e histológicamente presentan eritema generalizado, engrosamiento del estrato corneo (EC), hiperqueratosis y espongiosis. Los tratamientos tópicos constituyen una gran alternativa en LC, por el bajo costo, poco riesgo de efectos adversos y fácil aplicación.

El objetivo de este trabajo fue implementar un tratamiento de tres componentes (kit 3-PACK): un antiséptico, un queratolítico y una crema de pentamidina (PMD) para el tratamiento de LC en ratones BALB/c infectados con *L. (V) braziliensis*.

Se preparó y caracterizó una solución alcohólica de digluconato de clorhexidina (0,5%) como antiséptico, un gel de ácido salicílico (10%) como queratolítico y una crema de PMD al 3 y 6% como compuesto anti-*Leishmania*. La efectividad clínica y parasitológica del 3-PACK fue determinada en ratones BALB/c infectados con *L. (V) braziliensis*. El tratamiento se realizó aplicando el antiséptico (30 días), el gel queratolítico (7 días) y la crema de PMD (30 días/dos veces al día). Los componentes del 3-PACK presentaron estabilidad y características organolépticas óptimas. El tratamiento con el 3-PACK utilizando PMD al 3 y 6% presentó una eficacia clínica de 61% y 68% respectivamente y una eficacia parasitológica del 100% en los tratados con PMD 6%. No se observaron concentraciones de PMD en el hígado y bazo.

El kit 3-PACK podría ser una buena estrategia para el tratamiento de LC. Es importante mejorar la eficacia clínica en condiciones in vivo mejorando las características de la crema de PMD utilizada para lograr una mejor absorción y distribución del compuesto en las lesiones.

* Tesis de grado

** Facultad de salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de Tesis: Patricia Escobar, Bacterióloga, Ph.D.

Abstract

TITLE: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF A 3-PACK KIT (ANTISEPTIC-KERATOLYTIC-PENTAMIDINE CREAM) IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS ANIMAL MODEL*.

AUTHOR: BETSY YANETH MUÑOZ SERRANO, PATRICIA ESCOBAR RIVERO**

KEYWORDS: CUTANEOUS LEISHMANIASIS, PENTAMIDINE, TOPICAL TREATMENT, KERATOLYTIC, TOPICAL FORMULATIONS, BALB / C.

DESCRIPTION:

Lesions of cutaneous leishmaniasis (LC) produced by *Leishmania* species of the subgenus *Viannia*, are usually nodular lesions of the exudate center, with a crust attached (hyperkeratosis) and an ulcer below the crust. The lesions are superinfected with microorganisms (bacteria, fungi) and histologically they present generalized erythema, thickening of the stratum corneum (CS), hyperkeratosis and spongiosis. Topical treatments are a great alternative in LC, because of the low cost, little risk of adverse effects and easy application.

The objective of this work was to implement a three-component treatment (3-PACK kit): an antiseptic, a keratolytic and a pentamidine cream (PMD) for the treatment of LC in BALB / c mice infected with *L. (V) braziliensis*.

An alcoholic solution of chlorhexidine digluconate (0.5%) was prepared and characterized as an antiseptic, a salicylic acid gel (10%) as a keratolytic and a 3 and 6% PMD cream as anti-*Leishmania* compound. The clinical and parasitological effectiveness of 3-PACK was determined in BALB / c mice infected with *L. (V) braziliensis*. The treatment was carried out applying the antiseptic (30 days), the keratolytic gel (7 days) and the PMD cream (30 days / twice a day). The components of the 3-PACK presented stability and optimum organoleptic characteristics. Treatment with 3-PACK using 3 and 6% PMD showed a clinical efficacy of 61% and 68% respectively and a parasitological efficacy of 100% in those treated with 6% PMD. No concentrations of PMD were observed in the liver and spleen.

The 3-PACK kit could be a good strategy for the treatment of LC. It is important to improve clinical efficacy in vivo conditions by improving the characteristics of the PMD cream used to achieve better absorption and distribution of the compound in the lesions.

* Thesis

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Thesis director: Patricia Escobar, Bacteriologist, Ph.D.

Introducción

Los tratamientos tópicos en LC constituyen una alternativa de los tratamientos sistémicos de primera y segunda línea antimoniales pentavalentes (Sb^V), disetonato de pentamidina (PMD), la anfotericina B (AmB) y sus formas liposomales, miltefosina y paromomicina en leishmaniasis debido a que todos presentan reacciones adversas, contraindicaciones, alto costo, vía de administración dolorosa con protocolos largos de tratamiento y eficacia variable (Barberis y Vélez, 2014). Los tratamientos tópicos son recomendados con precaución en casos de LC producida por especies del subgénero *Viannia* debido a que su efectividad puede estar limitada por los efectos adversos locales como la irritación o por el poco paso del principio activo debido a la barrera de la piel. Sin embargo, son blancos de investigación y desarrollo para LC, dada su fácil aplicación y bajo costo y efectos adversos y contraindicaciones.

El presente trabajo de investigación describe la preparación, caracterización y evaluación del uso de un kit 3-PACK (antiséptico-queratolítico-crema de pentamidina) como alternativa terapéutica en LC. Esta estrategia se ideó teniendo en cuenta las diferentes características que se encuentran en las lesiones cutáneas tanto en los pacientes como en los modelos experimentales en animales tales como: nódulos y úlceras de bordes levantados (tipo cráter) presentando engrosamiento del EC por hiperqueratosis, la infección por bacterias y hongos, las cuales, al ser controladas, podrían favorecer el paso del principio activo anti-*Leishmania* a las capas profundas de la piel donde se encuentra el parásito.

El primer componente es el antiséptico (digluconato de clorhexidina [CDX] al 0,5%) el cual actuaría en la superficie de las lesiones eliminando los microorganismos (bacterias y hongos) presentes. El DCX se eligió, basados en los criterios de selección de un antiséptico ideal, su baja toxicidad, su actividad y su amplio espectro de acción frente a diferentes microorganismos como [*Escherichia coli*, *Streptococcus sanguis*, *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*] (Hernandez y Martínez, 2004). El segundo componente del 3-PACK es el gel queratolítico de ácido salicílico al 10% con el cual se busca disminuir la hiperqueratosis presente en las lesiones de LC y promover la permeabilidad de la epidermis humana. Los queratolíticos más usados son el ácido salicílico y la urea, algunos de sus beneficios son: reblandecimiento (hidratación de la capa córnea), la descamación de la piel con hiperqueratosis, aumento de la penetración de la aplicación tópica de fármacos (Jacobi et al., 2015). El ácido salicílico (AS) en actualidad es de los queratolíticos más conocidos, en concentraciones superiores al 5% su acción queratolítica es más rápida y potente sobre el EC (Kristensen, 1991). El tercer componente del 3-PACK es una crema con actividad anti-*Leishmania* de (PMD). La PMD comercialmente se conoce con el nombre de Pentacarinat®, se utiliza como tratamiento de segunda elección, es un tratamiento parenteral o intramuscular. La PMD es utilizada en pacientes intolerantes o resistentes al tratamiento con Sb^V en dosis de 4 mg/Kg peso/día cuatro dosis cada tres días intramuscular (INS, 2010). Hasta el momento no existen formulaciones tópicas comerciales de PMD.

El propósito de este trabajo de investigación fue: 1°. Diseñar y evaluar cada uno de los componentes del kit 3-PACK. 2°. Caracterizar fisicoquímicamente cada uno de los componentes del 3-PACK, 3°. Determinar la efectividad del 3-PACK en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*. 4°. Determinar la distribución en hígado y bazo de la PMD y la toxicidad después del tratamiento con el 3-PACK.

En la primera parte de este trabajo se hace una revisión bibliográfica que muestra desde lo general hasta lo específico; generalidades de la leishmaniasis, tratamientos utilizados en leishmaniasis y en LC, la piel (estructura y generalidades), formas farmacéuticas para tratamientos tópicos. Se hace un gran énfasis en los antisépticos, queratolíticos, tratamientos tópicos en LC como los métodos físicos [crioterapia, termoterapia y terapia fotodinámica (TFD)] y las formulaciones tipo gel, nanoemulsiones, cremas, entre otros conteniendo diferentes concentraciones de fármacos anti-*Leishmania*, la piel como sitio de aplicación de fármacos, formas farmacéuticas de uso tópico y el 3-PACK.

Posteriormente se muestra el diagrama general de la metodología utilizada y se explican cada una de sus etapas. Estas van desde; primera fase, preparación y caracterización del 3-PACK en donde se seleccionaron los compuestos, se prepararon las formulaciones y se realizó la caracterización fisicoquímica del 3-PACK (pH, viscosidad, color) y la cuantificación de la PMD por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En la segunda fase se realizó el esquema de tratamiento con el 3-PACK en ratones BALB/c el cual consistió aplicar el queratolítico durante los primeros 7 días de tratamiento y el antiséptico y la crema de PMD por 30 días.

En la tercera fase se evaluaron la actividad anti-*Leishmania* del 3-PACK en donde se realizaron ensayos *in vitro* de citotoxicidad en células THP1 y de actividad en promastigotes de *Leishmania*, y se realizaron improntas y biopsias de las lesiones para observar la presencia o ausencia de amastigotes de *Leishmania*. En la cuarta fase fueron evaluadas la toxicidad y distribución de PMD. En la cual se evaluó la irritación dérmica de los componentes del 3-PACK y la distribución de la PMD en hígado y bazo de los ratones tratados con el 3-PACK y el control.

Posteriormente se muestran los resultados, los cuales algunos fueron los esperados en la propuesta inicial en cuanto a diseño, preparación y caracterización del 3-PACK, distribución de la PMD en hígado y bazo y actividad anti-*Leishmania*. Algunos resultados permiten comprender que los tratamientos tópicos para LC en modelos *in vivo* requieren de más investigación y profundización dado que es necesario aumentar la eficacia vs efectividad del tratamiento con el 3-PACK y asegurar que una mayor concentración de PMD llegue a la dermis. En la discusión se encontró que había pocos trabajos al respecto, especialmente en el uso de antisépticos, queratolíticos y formulaciones tópicas de PMD para lesiones LC.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad anti-*Leishmania* del kit 3-PACK (antiséptico-queratolítico-formulación tópica) en leishmaniasis cutánea en un modelo murino.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar y caracterizar fisicoquímicamente cada uno de los componentes del kit 3-PACK (antiséptico-queratolítico- crema de PMD).
- Determinar la efectividad y toxicidad del 3-PACK en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*.
- Determinar la toxicidad y la distribución (en hígado y bazo) del isetionato de pentamidina (PMD), después del tratamiento con 3-PACK.

2. Marco teórico y estado del arte

2.1 Leishmaniasis

2.1.1 Generalidades. La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*, transmitida por flebótomos hembra del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, frecuente en zonas tropicales y subtropicales (Saboya et al. 2016). Entre las especies que afectan al hombre se encuentran la *L. donovani*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) venezuelensis*; *L. tropica*; *L. mayor*; *L. (L.) infantum* y *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana* ver tabla 1, (Akhoundi et al. 2016). En las zonas endémicas de África, Asia, Europa y América, existe una incidencia para leishmaniasis cutánea (LC) de 0,7-12 millones y para leishmaniasis visceral (LV) de 0,2–0,4 millones de casos anualmente (Akhoundi et al. 2016). La leishmaniasis es un problema creciente de Salud Pública a nivel mundial; que afectan la piel, las mucosas o las vísceras (Akbari y Oryan, 2017). Se encuentran diferentes formas clínicas (LV, LC, cutánea difusa y mucocutánea) las cuales varían de acuerdo con la respuesta inmune del hospedero, la especie del parásito involucrada y el tiempo de evolución de la infección [ver tabla 1] (Mansueto et al. 2014).

La LV es una forma clínica de progresión lenta en el sistema retículo endotelial, mortal si no se trata. Se caracteriza por presentar fiebre, anemia, leucopenia y debilidad progresiva.

En áreas del subcontinente de la India y en África Oriental se produce por *L. donovani* (Mauricio et al. 2007). En India, Brasil, Bangladesh, Nepal y Sudán es donde se presentan la mayoría de los casos (90%) (Alvar, Bern, Desjeux, y Cano, 2012).

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) ocurre como resultado de la difusión linfática o hematogena del parásito de una lesión cutánea, se puede presentar de manera simultánea con las lesiones cutáneas. Se manifiesta como nódulos e infiltrados del cartílago nasal. El labio superior, la laringe, la faringe y el paladar también pueden presentar grave destrucción de los tejidos y desfiguración (Pace 2014). En las Américas la LMC se encuentra asociada principalmente a la infección por *L. (V.) braziliensis* (Oliveira et al., 2011).

Tabla 1.

Especies de Leishmania en el Viejo Mundo y Nuevo Mundo

	Forma Clínica	Distribución	Reservorio
Viejo Mundo			
<i>L. aethiopica</i>	LC, LCD	Etiopia, Kenia	Hyracoidea
<i>L. major</i>	LC	Centro y norte de África, Medio Oeste y Asia Central.	Jerbos, roedores
<i>L. tropica</i> (sin. <i>L. killicki</i>)	LC	Centro y norte de África, Medio Oeste y Asia Central, India.	Humanos
<i>L. donovani</i>	LC, LV	África, Sudeste de Asia y	Humanos
Nuevo Mundo			
<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC, LMC	Suramérica (Bolivia, Brasil, Colombia)	Roedores

	Forma Clínica	Distribución	Reservorio
<i>L. (L.) mexicana</i>	LC, LMC, LCD	Estados Unidos de América, Ecuador, Perú, Venezuela.	Roedores y marsupiales
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	LC	Norte de Suramérica y Suramérica.	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC, LMC	Suramérica, Centroamérica, Cuenca del Amazonas occidental	Roedores, marsupiales y perros
<i>L. (V.) panamensis</i>	LC	Suramérica, Centroamérica	Mamíferos
<i>L. (V.) peruviana</i>	LC, LMC	Perú y Bolivia	Roedores, marsupiales y perros
<i>L. (V.) guyanensis</i>	LC	Suramérica	Mamíferos
<i>L. (V.) colombiensis</i>	LC	Suramérica	
Viejo y Nuevo Mundo			
<i>L. (L.) infantum</i>	LV	Europa, Norte de África, Medio Oeste, Asia Central,	Perros, humanos

Nota: Adaptada de Akhoundi et al. 2016; LC: leishmaniasis cutánea, LCD: leishmaniasis cutánea difusa, LMC: leishmaniasis mucocutánea, LV: leishmaniasis visceral.

En la LC el periodo o tiempo de incubación varía de acuerdo con la especie de *Leishmania* siendo de una semana a tres meses. Inicialmente emerge una pápula parecida a la picadura de cualquier mosquito (sin síntomas o levemente pruriginosa) que progresa oscureciéndose su color rojo y aumentando su tamaño.

La superficie se cubre ocasionalmente de escamas y en un periodo de una a tres semanas se va formando una lesión nodular, de centro exudado que al secarse forma una costra adherida muy fuertemente, muy parecida a las lesiones hiperqueratósicas de lupus eritematoso discoide (García, 2005). Debajo de la costra aparece una ulcera de bordes elevados y fondo irregular con un tamaño entre 2 y 8 cm (García, 2005). Las lesiones de LC se caracterizan por presentar edema, abundante infiltrado inflamatorio, macrófagos infectados con *Leishmania*, necrosis e hiperqueratosis (Negrão et al. 2017).

La figura 1 muestra el ciclo de vida de *Leishmania*. La leishmaniasis se transmite cuando las mosquitas (insecto hematófago) introducen, desde sus probóscides, promastigotes metacíclicos a un hospedero mamífero. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos u otro tipo de células fagocíticas que se encuentran en la dermis. Al interior de estas células, los parásitos se encuentran en el fagosoma que se une al lisosoma. El parásito se transforma en amastigotes (estadío tisular) el cual se reproduce por fisión binaria. Las células eventualmente pueden lisarse y los amastigotes liberados podrían infectar otras células fagocíticas mononucleares adyacentes (Kumar 2013). El ciclo de vida de los parásitos de *Leishmania* es mantenido a través de la transmisión entre insectos (hematófago) y un hospedero mamífero (roedores, marsupiales, perros o los humanos) ver reservorios tabla 1.

2.1.2 Tratamientos en leishmaniasis. Los antimoniales pentavalentes (Sb^V) están establecidos como tratamientos de primera línea para todas las formas clínicas de leishmaniasis. Los Sb^V disponibles actualmente son el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimonio de meglumina (Glucantime®) y sus formas genéricas (Mitropoulos et al., 2010). El estibogluconato de sodio es una mezcla sintética, que se da por la reacción entre el ácido estibónico y glucónico ver tabla 2 (Roychoudhury y Ali 2008).

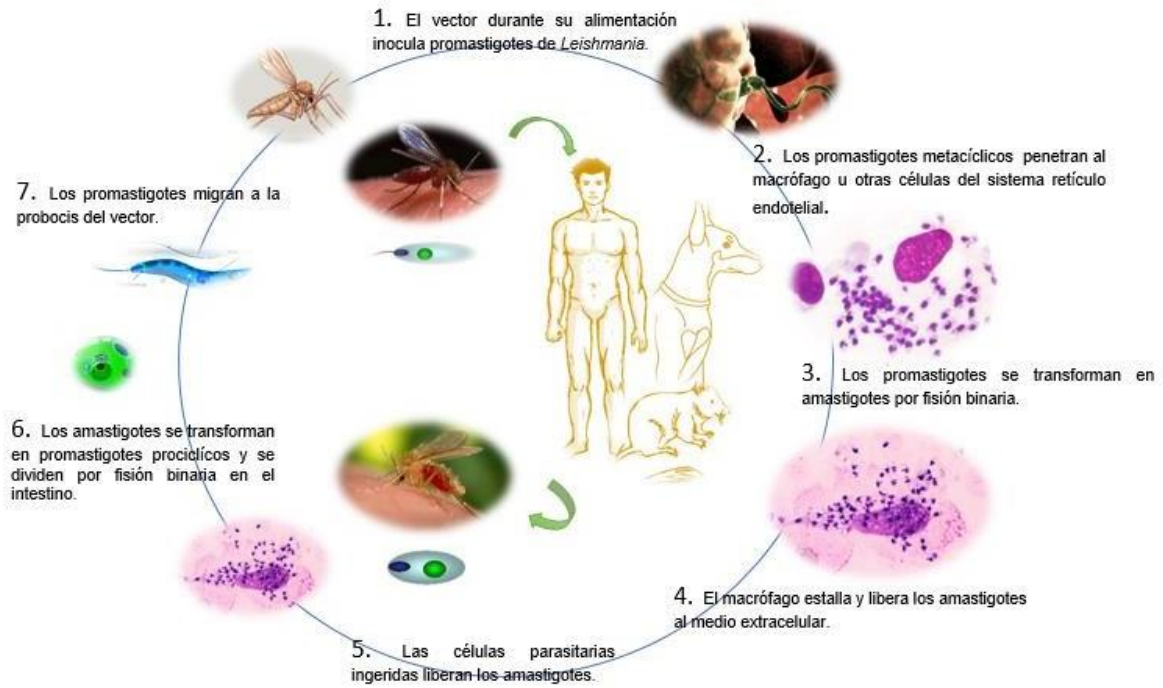
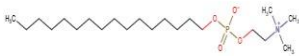
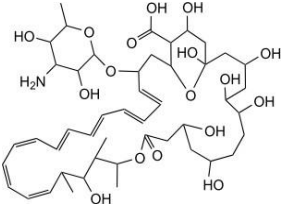
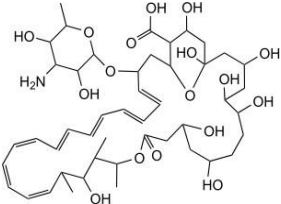
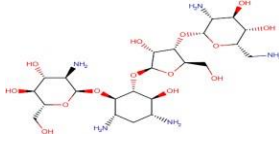


Figura 1. Ciclo de vida *Leishmania spp.*

Tabla 2.

Tratamientos usados en leishmaniasis LC y LV

Farmáco anti- <i>Leishmania</i>	Estrucura molecular	Vía de administración y dosis
Antimoniales pentavalentes (Sb ^V)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3 \quad \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{HCO} \quad \text{Sb}^+ \quad \text{OCH} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{HCO} \quad \quad \text{OCH} \\ \quad \quad \\ \text{HCOH} \quad \text{HOCH} \\ \quad \quad \\ \text{HCOH} \quad \text{HOCH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{OH} \quad \text{CH}_2\text{NHCH}_3 \end{array} $	IM/IV 20mg/kg/día durante 20 días
Isetionato de pentamidina (PMD)		IM 4mg/Kg/día/ Por 28 días en LC y LMC

Farmáco anti- <i>Leishmania</i>	Estructura molecular	Vía de administración y dosis
Miltefosina (MTF)		Oral 25mg/Kg/día por 10 días
Anfotericina (AmB)		IV 3 mg/kg/día por 21 días en LV y 4 mg/kg/día por 21 días para LC y LMC
Anfotericina liposomalL-AMB		IV 10mg/kg – 30mg/kg/ única dosis Para LV
Sulfato de paromomicina (PM)		IM 16 a 18 mg/kg/día De 21-28 días para LV

Tratamientos usados en leishmaniasis LC y LV

Nota: Adaptada de Kip et al. 2017, IM: intramuscular, IV: intravenosa.

El mecanismo de acción de los Sb^V no se encuentra del todo establecido, pero está relacionado con la inhibición de la tripanotión reductasa, la oxidación de los ácidos grasos, así como la formación de ATP y GTP (Singh y Sivakumar, 2004). Los Sb^V son profármacos, demandan una reducción a su forma trivalente (Sb^{III}) para poder tener actividad anti-*Leishmania* (W. L. Roberts, Berman, y Rainey 1995).

Por lo tanto, deben ingresar al macrófago, atravesar la membrana fagolisosomal, y actuar contra el parásito intracelular (W. L. Roberts, Berman, y Rainey 1995). Estudios recientes indican que los Sb^V inducen apoptosis implicando la fragmentación del ADN y la externalización de fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana (Sundar y Goyal 2017). Son utilizados parenteralmente [intravenoso (IV) o intramuscular (IM)] en una dosis de Sb^V de 20 mg/kg de peso/día durante 20 días (Mcgwire y Satoskar, 2013).

Presentan reacciones adversas como mialgias, fiebre, dolor en el sitio de aplicación (IM), dolor abdominal, cefalea, diarrea y vómitos (Arevalo et al. 2007). Son administrados a pacientes que no presentan alteraciones cardíacas, hepáticas o renales dado que pueden presentar un aumento de las enzimas hepáticas, nefrotoxicidad, artralgia, fiebre, erupción cutánea, tos, pancitopenia y neuropatía periférica reversible, arritmia auricular y fibrilación, arritmia ventricular y taquicardia (Roychoudhury y Ali 2008). Los Sb^V pueden causar pancreatitis en el período de tratamiento siendo ésta la responsable de las náuseas y el dolor abdominal experimentado en muchos pacientes (Singh y Sivakumar 2004).

La fármaco-resistencia es la reducción de la eficacia de un fármaco o medicamento específico diseñado para tratar una enfermedad. La evaluación de la respuesta terapéutica al tratamiento con antimoniales para LC en Colombia, se sugiere realizarla a los 45 y 90 días postratamiento, definiendo como criterios de curación: cicatrización, aplanamiento del borde de la ulcera, desaparición de la inflamación, pruebas parasitológicas negativas y biopsias de la lesión sin parásitos e inflamación (Instituto Nacional de Salud [INS] 2010).

Entre las semanas 6 y 9 se espera una respuesta inicial con disminución de al menos el 50% del diámetro de las lesiones (si es mayor se considera falla terapéutica temprana). A los 3 meses se espera una curación inicial con cicatrización completa y ausencia de signos inflamatorios locales (en caso negativo se considera falla terapéutica temprana) y a los 6 y 12 meses una curación definitiva con lesiones cicatrizadas y ausencia de recaídas (lesiones con un diámetro mayor a cero, se consideran falla terapéutica tardía) (Olliaro et al. 2013). La tasa de falla terapéutica de los Sb^V se encuentra entre un 28,2 a 65% para LV en India y Bagladesh (Sundar et al. 2012) y entre 10 y 40% para LC (Dujardin et al. 2012).

La falla terapéutica se puede dar, entre otros a la disminución de la reducción biológica de Sb^V a Sb^{III} , disminución de la afluencia o aumento del flujo de salida del fármaco, y aumento del nivel de tripanotión para restaurar el potencial *redox* del tiol (Maes, Andreia, Cos, y Yardley, 2013). Por esto y lo anterior se han buscado nuevas alternativas de tratamiento para LC.

Los tratamientos de segunda línea en leishmaniasis son: el isetionato de pentamidina (PMD), miltefosina (MTF), la anfotericina (AmB) y sus formas liposomales y el sulfato de paromomicina [PM] (ver tabla 2). La PMD (Pentacarinat®) es una diamida aromática, con carga positiva, encontrándose comercialmente en forma de sal de di-isetionato. Esta sal tiene poca solubilidad en agua 0,0236 mg/mL siendo liposoluble o hidrofóbica (Vásquez, 2009). La PMD es utilizada como agente antiprotozoario eficaz en tripanosomiasis, leishmaniasis y algunas infecciones fúngicas y es utilizada en el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis* (Diken et al. 2016) y contra células cancerosas (Jung et al. 2011) y tumores (Jarak et al. 2011).

Estudios muestran que puede inhibir la actividad de la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa, interfiere en la síntesis de poliaminas y disminuye el potencial de la membrana mitocondrial (Kaur y Rajput 2014). Una ventaja del uso de PMD es el corto curso del tratamiento. El esquema terapéutico óptimo para LC por vía IM se observa en la tabla 2 (Instituto Nacional de Salud [INS], 2010). Se ha utilizado para el tratamiento de LV y LC. La PMD se encuentra asociada a efectos adversos graves como: diabetes mellitus dependiente de insulina, shock, hipotensión, hipoglucemia y muerte (Minodier y Parola 2007). La PMD es utilizada como primera opción de tratamiento en la Guyana Francesa (INS, 2010).

La MTF (1-O-hexadecilfosfocolina), es un agente antineoplásico (Pachioni-Vasconcelos et al. 2017) análogo de la alquilfosfocolina. Se ha utilizado también como tratamiento para esquistosomiasis (El-faham et al. 2017). Su mecanismo de acción se ha relacionado con el metabolismo de los fosfolípidos y la biosíntesis de glicolípidos y glicoproteínas ancladas a un grupo alquilo e inhibe la biosíntesis de fosfatidilcolina (Rakotomanga et al. 2007). Es modulador de la respuesta inmune, suprimiendo la secreción de IL-10 e IL-13 (Gonzalez, Fernández, y McMahon 2015). En *Leishmania*, afecta el metabolismo de lípidos de promastigotes, la oxidación de ácidos grasos y esteroides (Rakotomanga et al. 2005).

La MTF disminuye los niveles de velocidad de consumo de oxígeno y ATP en *L. donovani* mediante la inhibición de citocromo C oxidasa mitocondrial (Roma y Rivas 2007). Activa un canal de Ca^{+2} en la membrana plasmática de *L. donovani* causando la muerte del parásito por apoptosis y tiene un efecto directo sobre los ácidos calcisomas de *L. donovani* (Pinto et al. 2017).

La MTF (Impavido®), es usada en India y África Oriental para tratamiento de LV en dosis de acuerdo al peso, menores de 12 años (2,5 mg/kg al día), para mayores de 12 y en los adultos (50 mg/kg al día), el tratamiento oral es por 28 días (Sundar et al., 2006). En el Nuevo Mundo se utiliza una dosis de 2,5mg/kg durante 28 días para LC causada por *L.(L.) mexicana*, *L.(V.) guyanensis* y *L.(V.) panamensis* (Soto et al. 2004). Como efectos adversos se encuentran vómitos, diarrea, incremento en los niveles de transaminasas hepáticas, creatinina sérica y efectos teratogénicos (Soto et al. 2016).

En un estudio realizado en Colombia a 116 niños, con edades entre 2 y 12 años, con LC en zonas donde predominan *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* se trataron 58 niños con Sb^V (20 mg Sb / kg / d durante 20 días; intramuscular) y 58 niños con MTF (1.8-2,5 mg/kg/d durante 28 días; por vía oral). concluyen que uno de los factores que influyen en la falla del tratamiento (17,2%) de LC con MTF es la pérdida de susceptibilidad en los parásitos (Obonaga et al. 2014). Por otro lado, en el subcontinente Indio se observa una creciente falla terapéutica, se realizó un estudio farmacocinético-farmacodinámico de la población de Nepal, para examinar la relación entre la exposición al medicamento miltefosina y el fracaso del tratamiento en una cohorte de pacientes con LV. La probabilidad general de fracaso del tratamiento fue del 21%. Esto se asoció con el momento en que la concentración de sangre fue 10 veces menor que la mitad de la concentración efectiva máxima de MTF (mediana, 30,2 días). En este estudio se concluyó que una disminución de un día en la exposición a MTF se asoció con 1,08 veces (IC 95% 1.01-1.17) aumento de las probabilidades de fracaso del tratamiento (Dorlo et al. 2018).

La AmB (Fungizone®) es molécula cilíndrica, rígida con grupos hidroxilos (Laura y Ricciardi 2009). Está indicado en el tratamiento de la candidiasis invasiva grave, de micosis sistémicas (aspergilosis, criptococosis, histoplasmosis, fusariosis, zigomicosis, blastomicosis, coccidioidomicosis y micosis por *Malassezia spp*). Comercialmente se encuentra como AmB en dispersión coloidal (Amphocil®) y AmB liposomal (AmBisome®). La AmB se une al ergosterol en la membrana celular de los hongos y *Leishmania*, conduciendo posteriormente a la formación de poros, fugas de fluidos y muerte celular del parásito (Kip et al. 2017).

Reconoce el colesterol en membranas biológicas de las células de mamíferos, cuando se forman agregados solubles o dímeros que igualmente provoca la formación de poros o canales, generando graves problemas de toxicidad (C. W. Roberts et al. 2003). Su administración es por vía endovenosa (0,5-1 mg/kg/día) y su uso es hospitalario (Echeverry, Milena, y Trujillo, 2005). Las reacciones adversas son fiebre y escalofríos, en algunos casos se ha presentado estridor respiratorio y modesta hipotensión, también se ha descrito hiperazoemia, acidosis tubular renal y aumento en las pérdidas renales de magnesio y potasio. El tratamiento con AmB coloidal ha presentado casos de anemia hipocrómica normocítica, cefalalgia, náusea, vómito, malestar general, reducción de peso (Kip et al. 2017). La AmB-liposomal (L-AmB) disminuyó significativamente la toxicidad renal y los efectos adversos produciendo sólo leves reacciones de nefrotoxicidad transitoria o trombocitopenia (Kip et al. 2017).

La dosis sugerida de AmB coloidal en LV es de 3-4 mg/kg/día por 21 días. El tratamiento con L-AmB ha presentado fallas terapéuticas entre el 1,5-4% en pacientes co-infectados con VIH o en pacientes inmunosuprimido con LV en India (Eichenberger et al. 2017).

La L-AmB se ha utilizado en India, Nepal y Bangladesh en una sola dosis presentando tasas de curación mayores al 95% (Sundar et al. 2010). Las dosis utilizadas en los diferentes ensayos clínicos van desde 10-50mg/kg (Mondal et al. 2014).

La PM es un aminoglucósido utilizado para infección por *Dientamoeba fragilis*, coma hepático, amibiasis intestinal aguda y crónica. Está formado por tres amino azúcares unidos por enlaces glucosídicos a un núcleo de 2- desoxiestreptamina central, (ver tabla 2). La PM se une a la subunidad ribosómica 30S de *Leishmania* bloqueando la síntesis de proteínas y disminuyendo la traducción de mRNA en el ribosoma. También puede perturbar la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Kip et al. 2017). En un estudio realizado Bangladesh, pacientes con LC entre 5 y 55 años con LV mostraron una tasa de curación fue de 94,2% a la administración de la PM por vía IM en una dosis de 11mg/kg una vez al día, durante 21 días. (Jamil et al. 2015). Los efectos adversos fueron dolor local en el sitio de la inyección, ototoxicidad reversible y aumento de las transaminasas hepáticas (Sundar y Singh 2017).

Los azoles tales como: imidazoles (ketoconazol, KTZ) y triazoles (fluconazol, itraconazol) han sido utilizados como leishmanicidas y en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas (candidiasis, aftas orales, candiduria, blastomicosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis, cromomicosis y paracoccidioidomicosis).

Inhiben la enzima 14-alfa-demetilasa, una enzima del sistema microsomal oxidativo dependiente del citocromo P450 deteriorando la biosíntesis de esteroides de membrana y la función de sistemas enzimáticos, produciendo una acumulación de 14 alfa metilesteroides (Mongue y Lopez, 2013); En LC son administrados por vía oral en dosis entre 200–400 mg/día, lo cual reduce los efectos secundarios de los Sb^v (Mongue y Lopez, 2013).

Los azoles itraconazol, fluconazol y KTZ han mostrado una eficacia del 65, 61 y 64 % respectivamente en pacientes infectados. Muestran una eficacia del 89% para *L.(L.) mexicana*, 88% para *L.(L.) infantum*, 80% para *L. donovani*, 53% para *L. major* 49% para *L.(V.) braziliensis* y 15% para *L. tropica* (Cota, Lanza, y Rabello 2017). En pacientes iraníes la crema de KTZ por 21 días mostró una tasa de curación fue de 28,9 % en comparación con 22,8 % de los tratados con el placebo (Momeni y Aminjavaheri, 2003). En la tabla 2 se encuentra un resumen de los tratamientos utilizados en leishmaniasis.

2.13 Tratamientos tópicos en LC. Los tratamientos tópicos aplicados en piel generalmente sobre las lesiones de LC constituyen una alternativa interesante, por el bajo costo, poco riesgo de efectos adversos y asegurar la eficacia del tratamiento (Sosa et al., 2013). Se utilizan algunos métodos físicos de aplicación local los cuales utilizan nitrógeno líquido, calor y fotosensibilizadores (FS), también se utilizan las formulaciones tipo gel, nanoemulsiones, cremas, entre otros conteniendo diferentes concentraciones de fármacos anti-*Leishmania* (No, 2016).

Los métodos físicos utilizados en LC son la crioterapia, termoterapia y terapia fotodinámica [TFD] (Ameen 2010). La crioterapia ha sido utilizada en LC del Viejo Mundo y consiste en aplicar nitrógeno líquido a las lesiones. No se encuentra definido el tiempo de aplicación ni los intervalos o ciclos óptimos de aplicación. Sin embargo, en un estudio realizado a niños iraníes, se aplicó nitrógeno líquido -195°C entre 10 y 15 segundos, dos veces por cada ciclo con intervalo de descongelación de 20 segundos mostrando una eficacia de 91% (Layegh et al. 2009).

Un estudio realizado en Jordania en 120 pacientes con LC infectados con *L. major*, se les realizó crioterapia una vez por semana de 1-7 sesiones y se logró una eficacia más del 95% (Mosleh et al. 2008). La termoterapia se basa en la capacidad de destruir el parásito directamente a través de la aplicación de calor. Se realiza a través de aplicación de radiofrecuencia a 50°C por 30 s una vez por semana, durante 4 semanas. Ha sido utilizada en el Viejo Mundo y Nuevo Mundo, para *L. major*, *L. tropica*, *L.(L.) mexicana*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) guyanensis* y *L.(V.) braziliensis* con eficacias entre el 40 y 70% (Monge y López, 2013). En un ensayo clínico realizado en voluntarios con LC en Colombia, una sola sesión de termoterapia que implicaba la aplicación de 50°C en el centro y borde activo de cada lesión mostró una eficacia del 64% (López et al. 2012).

La TFD consiste en el uso de FS que pueden ser excitados por la luz a una longitud de onda específica permitiendo la liberación de especies reactivas de oxígeno que producen muerte celular y destrucción de tejidos (Allison y Sibata, 2010). Tiene bajo grado de toxicidad en los tejidos que se encuentran cerca de donde se realizará el tratamiento y es mínimamente invasiva (Paszko, Ehrhardt, Senge, Kelleher, y Reynolds, 2011) Comercialmente existen varios FS como los derivados del amino-evulínico (ALA), naftalocianinas, clorinas y metaloftalocianinas como la ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl). (Chan et al., 1997).

Ensayos *in vitro* mostraron su efectividad en promastigotes de *L.(V.) panamensis* y *L. (L.) infantum* (Escobar et al., 2006). En pacientes iraníes con LC por *L. major* y *L. tropica*, el tratamiento de la TFD utilizando metil aminolevulinato (Metvix®) como FS mostró una tasa de cura del 89% (Enk et al. 2014).

Tabla 3.

Tratamientos tópicos: métodos físicos en LC

Terapia	Aplicación	Eficacia	<i>Leishmania</i>
Crioterapia	Nitrógeno Líquido	90-100%	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>
Termoterapia	Radiofrecuencia o calor aprox 50°C	37- 45%	<i>L. trópica</i> <i>L. major</i> <i>L.(V.) panamensis</i>
Terapia fotodinámica	Fotosensibilizador	80-90%	<i>L. (L.) infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i>

Nota: Adaptada de Nassif et al., 2017

La terapia tópica utilizando formulaciones conteniendo un fármaco con actividad anti *Leishmania* en LC se inició en 1985, cuando se desarrollaron ungüentos de PM y cloruro de metilbencetonio (MBCl), en 1992 realizaron un ensayo clínico para evaluar el efecto de un ungüento que contenía 15% de PM y 12% MBCl y otro que contenía 15% de PM y 5% MBCl. En el cual, el 74,2% de los pacientes fueron curados en comparación con el 26.6% de los pacientes tratados con el placebo, entre los dos ungüentos con diferente concentración de MBCl, se observaron pequeñas diferencias y eliminación de los parásitos (El-On, Halevy, Grunwald, y Weinrauch, 1992).

En 2015, compararon la eficacia de una nueva formulación tópica WR 279396 (15% PM y 0,5% de gentamicina). Se trataron ratones BALB/c infectados con *L. major* y *L. mexicana*. El día 20 después de la terapia el 100% de las lesiones ya se habían curado y no hubo recaída hasta el día 70 (Grogl et al. 2015). Se realizó un estudio de un ungüento de PM 15% y 0,5% gentamicina, en ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, en menos de dos semanas se observó una disminución de la carga de parásitos con una eficacia del 94% (Lecoeur et al., 2007). Al utilizar oclusión la eficacia clínica y parasitológica incrementó significativamente y no se observó reincidencia de la lesión (Lecoeur et al., 2007).

En un estudio realizado para evaluar la actividad de un gel de PM, el tratamiento tópico con el gel (10% PM) en ratones BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* fue 62,5% mayor que la observada para el tratamiento de Sb^V se utilizaron dos dosis con 5 mg/kg 20 mg/kg por día, durante 20 días, utilizado parenteralmente, mientras que la eficacia de estos dos regímenes en hámster infectados por *L. (V.) braziliensis* fue similar. Estos resultados sugieren que esta formulación podría ser adecuada para estudios clínicos (Goncalves et al., 2005).

También se desarrolló un gel de metilcelulosa de AmB y γ -ciclodextrina (AmB-CD) con actividad antifúngica y leishmanicida *in vitro* y en hámsteres infectados con *L. (V.) amazonensis* (Ruiz et al. 2014). y una crema de AmB 3% para el tratamiento de LC. La crema se probó en animales y posteriormente en pacientes con LC, mostraron que es un medicamento efectivo y seguro.

Por otro lado, se han utilizado cremas de miconazol (2%) y clotrimazol (1%), administradas dos veces al día durante 30 días en pacientes con LC (*L. major*) en Arabia Saudita, las cremas no fueron activas ya que la tasa de cura fue del 16% de las lesiones tratadas con clotrimazol y 0% en las lesiones tratadas con miconazol (Larbi, 1995).

2.1.4 La piel: estructura y generalidades: la piel es el órgano más grande del cuerpo, representando más del 10% de su masa. La piel consta de tres zonas principales: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis está formada por cuatro capas o estratos diferentes que desde el exterior hacia el interior serían: EC, estrato granular, estrato de células espinosas y estrato basal. La principal función de la epidermis es la generación del EC el cual tienen una función protectora que permite la interacción del cuerpo con el medio externo (ambiente). En la epidermis, también se encuentran varios apéndices asociados: los folículos pilosos, los conductos del sudor, las glándulas apocrinas, y las uñas (Riviere y Papich, 2001) [Figura 2]. En la unión de la epidermis-dermis se encuentra una delgada matriz extracelular, con una estructura especializada, compuesta de cuatro capas o láminas: la membrana celular de la célula epitelial basal, que incluye los hemidesmosomas, lámina lúcida (lámina rara), lámina densa (lámina basal) y lámina subbasal. Esta estructura contiene gran cantidad de componentes (colágeno tipo IV y VII, laminina, entactina/nidogen y proteoglicanos de heparán sulfato, fibronectina) que juegan un papel clave en la adhesión de las partes epidermis y dermis. Esta unión actúa como barrera selectiva entre la epidermis y la dermis, al permitir o no el paso de algunas moléculas, influye en el comportamiento celular y la curación de heridas y son el blanco de algunas enfermedades y de lesiones (fricción o ampollas inducidas químicamente) (Riviere y Papich, 2001).

La dermis está formada principalmente de tejido conectivo fibroelástico. Contiene una elevada proporción de fibras siendo el 75% de colágeno, elastina y reticulina. Los tipos de células son fibroblastos, mastocitos y macrófagos, células plasmáticas, cromatóforos, células grasas. Los leucocitos a menudo se encuentran en asociación con vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos, glándulas sudoríparas, sebáceas, folículos capilares y músculos (Riviere y Papich, 2001). La dermis es un tejido vascularizado que sirve de soporte y alimento a la epidermis. Se divide en dos capas; la capa papilar y la reticular. En la papilar las asas capilares (sistema circulatorio) proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular y también contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos. La capa reticular es más gruesa que la papilar, y proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen, compuesta de tejido conectivo denso e irregular con menos células y más fibras. Por último, la hipodermis o tejido subcutáneo, sirve como soporte para la dermis y la epidermis (Walters, 2002).

La piel cumple varias funciones que pueden ser clasificadas como protección y mantenimiento de la homeostasis de la piel (función barrera), de las temperaturas variables, contenido de agua, de productos químicos, bacterias, alérgenos, los hongos y la radiación. También mantiene la homeostasis del cuerpo, como, regulación del calor y las funciones de excreción. La función de la piel debe ser resistente, robusta, flexible y eficaz en la comunicación entre cada uno de sus componentes intrínsecos (Al-Suwayeh, Taha, Al-Qahtani, Ahmed, y Badran, 2014).

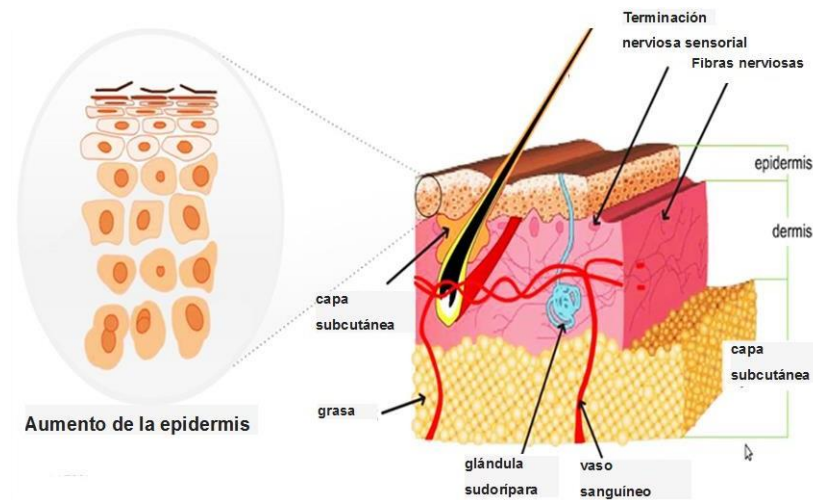


Figura 2. Esquema piel y sus partes

Nota: adaptada de Walters 2002

El EC se compone de varias capas de células queratinizadas, en constante descamación. Según Marcano y González, 2006, el EC ha sido comparado con una pared de ladrillos, donde los corneocitos (queratinocitos) son los ladrillos compuestos de proteínas (queratina y cornodesmosomas principalmente), se encuentran impregnados por una matriz específica de lípidos [cerámidas, ácidos grasos y colesterol] (Marcano y González, 2006).

El EC es más higroscópico que otros materiales queratinosos, como las uñas y los pelos, ya que los lípidos son fundamentales para generar esta oposición al agua. La protección frente a la abrasión por sustancias químicas o agresiones de tipo físico la suministran los corneocitos. Los corneocitos se encuentran compuestos de proteínas insolubles, principalmente la queratina como una matriz organizada; la queratina puede almacenar grandes cantidades de agua.

Los corneodesmosomas son estructuras proteicas intercelulares (desmocolina-1 y desmogleina-1) que mantienen la integridad total del EC, estas estructuras unen a los corneocitos vecinos entre sí tanto en el EC como en las capas adyacentes [ver figura 3] (Marcano y González, 2006).

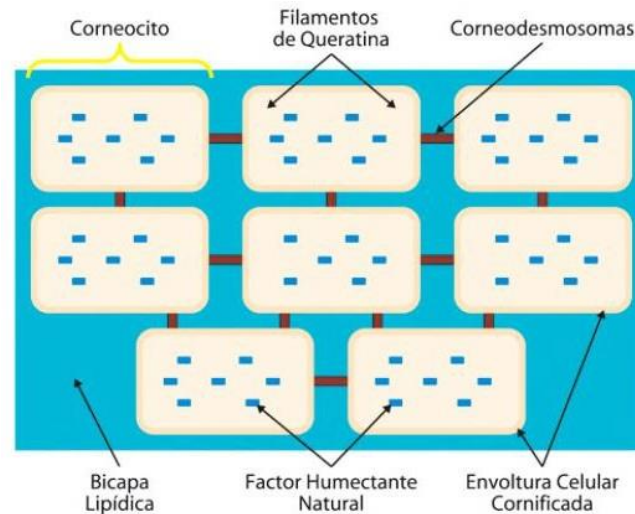


Figura 3. Esquema ladrillo estrato corneo

Nota: Tomado de: Harding C (2004).

2.2 La piel como sitio de aplicación de fármacos Ventajas y desventajas. La piel es

considerada como un sitio potencial para la administración de fármacos, dando una alternativa para aquellos potencialmente tóxicos cuando son administradas por otras vías (intravenosa, intramuscular y oral) para terapias prolongadas y de reemplazo tales como: efectos locales en dermatología (por ejemplo, corticosteroides para la dermatitis), el transporte a través de la piel para efectos sistémicos (por ejemplo, parches de nicotina para dejar de fumar), efectos de superficie (por ejemplo, protectores solares, cosméticos y antiinfecciosos).

Dirigirse a los tejidos más profundos [por ejemplo, agentes antiinflamatorio no esteroideo (AINE) para la inflamación muscular] (Walters, 2002). Algunas estructuras o componentes de la piel tanto en condiciones como con patologías, pueden influir en la permeación del fármaco o principio activo, tales como la estructura del EC, la hidratación y oclusión del EC y la hiperqueratosis (Marcano y González, 2006).

Sobre la estructura del EC, la queratina puede ser estabilizada por medio de filamentos de interqueratinas y de intraqueratinas que se encuentran unidas por puentes disulfuro y está recubierta por una cobertura de proteínas (loricrina, prolina e involucrina) llamada envoltura celular cornificada (ECC) ver figura 3 (Marcano y González, 2006). El factor humectante natural (FHN) es un mecanismo de la piel que mantiene el balance del agua dentro EC relacionado con la flexibilidad y actividad de las enzimas hidrolíticas (Fluhr et al., 2002). El FHN está compuesto principalmente de aminoácidos, ácido pirrolidón, ácido carboxílico, urea, azúcares e iones (Fluhr et al., 2002).

Cerca del 20% del volumen del EC está constituido por la matriz de lípidos, entre las membranas biológicas respecto a composición, organización y propiedades físicas, la bicapa de lípidos es exclusiva y se encuentra constituida con un 50% de ceramidas, entre 10-20% de ácidos grasos y 25% colesterol (Marcano y González, 2006). Otros factores que influyen en la permeación de los principios activos o fármacos son: la hidratación, la oclusión y la queratinización. Los cuales pueden tener ventajas o desventajas de acuerdo con la aplicación y propiedades fisicoquímicas del fármaco.

La hidratación del EC permite una flexibilidad, evitando el agrietamiento y fisuración. Sin embargo, la hidratación excesiva aumenta la permeabilidad de sustancias a través de la piel (Walters, 2002). Por otro lado, la oclusión está definida como el cierre que se produce de una vía o de un espacio abierto (ulceras, heridas, vía digestivas, etc) por medio de algún tipo de obstrucción [apósitos o coberturas] (Hutchinson y McGuckin, 1990). La oclusión es utilizada a menudo para aumentar la biodisponibilidad de los fármacos a través de la piel (Walters 2002). La queratinización es la diferenciación del queratinocito con transformaciones morfológicas y sucesos programados en el metabolismo que son solícitamente regulados genéticamente. Cuya diana u objetivos es un queratinocito muerto [corneocito] (Rodríguez, Brizuela, Muñoz, Lara, y Sáenz, 2011). La hiperqueratosis consiste en una queratinización excesiva (queratina en alta concentración) produciendo un engrosamiento del EC. Entre las posibles causas se encuentran fricción constante, eccema, inflamación crónica y presión persistente (Walters, 2002).

2.3 Formas farmacéuticas utilizadas en los tratamientos tópicos. Existen numerosas formulaciones de diferente naturaleza fisicoquímica o forma farmacéutica que pueden ser aplicados sobre la piel. La forma farmacéutica es el estado físico final bajo el cual se presenta un medicamento para su uso clínico con fines específicos. Las formas líquidas (soluciones, suspensiones y emulsiones), sólidas (polvos y barras), semisólidas [emulsiones semisólidas]. El diseño de la forma de dosificación adecuada permite el transporte a través de la piel.

Las emulsiones son las formas farmacéuticas más utilizadas, Son sistemas heterogéneos constituidos por dos líquidos inmiscibles. Para su disolución es necesario el uso de un emulsificante, que actúa como agente dispersante entre las dos fases no miscibles.

Están divididas en líquidas (microemulsiones y nanoemulsiones) y semisólidas (cremas, ungüentos, geles). Las emulsiones semisólidas por lo general tienen una mayor concentración de agentes emulsificantes, polímeros o componentes espesantes que las líquidas.

Las emulsiones semisólidas están constituidas por una base simple o compuesta en la que se dispersan los principios activos. De acuerdo con la preparación de la base pueden ser hidrófilas, que son aquellas que se elaboran con excipientes miscibles en agua (hidrogel) o hidrofóbicas, aquellas que pueden absorber cantidades muy bajas de agua (organogel, ungüentos). Contienen un excipiente o la combinación de varios de estos los cuales pueden ser emulsificantes (sustancia que ayuda en la mezcla de dos sustancias que normalmente son poco miscibles o difíciles de mezclar agua-aceite), estabilizantes (trietanolamina, ácido cítrico), espesantes (carboximetilcelulosa), antioxidantes [con el fin de conservar la formulación y no presente cambios de color en el tiempo (oxidación)], antimicrobianos (como metilparabeno y propilparabeno) (Botello y García, 2004). Dentro de las formulaciones semisólidas se encuentran las cremas, las pomadas y los geles.

Las cremas se caracterizan por contener una fase continua o externa y una dispersa o interna. Las cremas pueden ser emulsiones de agua en aceite (A/O) donde la fase discontinua acuosa se encuentra dispersa en la fase externa oleosa o emulsiones aceite en agua (O/A) donde la fase interna oleosa se encuentra dispersa en la fase externa acuosa (son las llamadas cremas evanescentes). En general el comportamiento (A/O y O/A) de las cremas está determinado por las características de su fase externa (Boada.2004).

Las cremas están constituidas en 60-80% de agua, su color varía de acuerdo con el tamaño de la fase externa, al tiempo de homogenización o por las propiedades del principio activo, las cremas pueden ser refrescantes (*cold-creams*) que ceden agua con facilidad cuando son aplicadas en la superficie de la piel. Las *cold-creams*, están constituidas principalmente por sistemas vaselina/alcoholes grasos, pueden emplearse como vehículos de medicamentos tópicos y penetrantes, pero, en general, son más usados las cremas oclusivas o poco evanescentes que están constituidas principalmente por vaselina/lanolina y, sobre todo, las mezclas de vaselina o aceites con emulgentes sintéticos A/O (Alonso et al. 2001).

Las cremas tienen propiedades humectantes y emolientes, las cuales las hacen efectivas en condiciones cutáneas tanto secas como exudativas, especialmente aquellas con exudados serosos (Rosen et al. 2014). Las cremas generalmente pueden ser utilizadas en todas las partes del cuerpo, son especialmente efectivas en áreas flexurales y genitales. Las cremas a menudo pueden ser elegidas para placas infectadas y exudativas como las encontradas en eczema o psoriasis (Mayba y Gooderham 2017). En LC se han utilizado cremas de AmB (Anfoleish®) e imiquimod (Aldara®), solas o en combinación con SbV (Carneiro et al. 2012).

Las pomadas o ungüentos están constituidas en un 70% de grasa y 30% de agua, comprenden una base grasosa hidrofílica, generalmente blanca, parafina blanda, que forma una capa oclusiva sobre la piel, evitando así la pérdida de calor y agua, por lo que se emplean en procesos dermatológicos secos y crónicos (Mayba y Gooderham 2017). Los ungüentos mejoran la absorción percutánea de corticosteroides tópicos al aumentar la hidratación y la temperatura de la piel. En LC se han utilizado los ungüentos con PM y en combinación con SbV, obteniendo tasas de curación de 79-90% (Armijos et al. 2004).

Los geles son preparaciones semisólidas compuestos de agua y agentes gelificantes, entre los geles se encuentran los hidrogeles y los lipogeles. Los hidrogeles están formados por agua, glicerol o propilenglicol u otros líquidos hidrofílicos, y agentes gelificantes (carbopol y carboximetilcelulosa [CMC]). Los lipogeles están compuestos por una base oleosa (parafina líquida, vaselina) y un gelificante [CMC, Pluronic®] (Boada.2004).

Los hidrogeles y la propiedad de contener o absorber agua, ha sido de interés en la medicina como sistemas de liberación controlada y/o sostenida de principios activos, dispositivos para diagnóstico, substrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, membranas para hemodiálisis, sistemas terapéuticos biodegradables, lentes de contacto e implantes (Arredondo, 2009).

Las emulsiones líquidas (microemulsiones y nanoemulsiones) son una mezcla de líquidos inmiscibles de agua/oleo (A/O) u oleo/agua (O/A). Las microemulsiones (ME) son mezclas estables térmicamente, translúcida constituidas por una fase oleosa, una acuosa y uno o más compuestos anfifílicos (un extremo polar soluble en agua y otro apolar no soluble en agua) que son tensoactivos o surfactantes tales como Tween20®, Tween80®, Span20®, Span80®. Las ME incorporan un amplio rango de compuestos como: KTZ (Badawi et al. 2012), itraconazol, fluconazol (Güngör, Erdal, y Aksu 2013), ibuprofeno, esteroides, entre otros, mejorando la biodisponibilidad, permitiendo solubilizar materiales hidrofílicos y/o lipofílicos en la misma formulación (Carlucci et al., 2004). El tamaño de las ME va de 100 nm-1µm, o menor de 100 nm en las transparentes (Güngör, Erdal, y Aksu 2013).

En LC se evaluó la actividad de una ME conteniendo fluconazol (FLU), en *L.(L.) amazonensis* encontrándose que las ME con FLU mostraron actividad anti-Leishmania *in vitro*, y exhibieron propiedades prometedoras para usar como sistemas transportadores de fármacos para LC (Oliveira et al. 2015). Las nanoemulsiones (NE) son dispersiones de gotitas de un líquido en otro líquido inmiscible con tamaños de gotículas de 50-300 nm. Contiene un tensoactivo como las ME que proporciona una fuerte estabilización de repulsión entre las interfaces de las gotitas (Graves y Mason, 2008).

Las ME y NE tienen composición y apariencia similar, sin embargo, se pueden distinguir por las siguientes propiedades. Las ME se forman de manera espontánea y típicamente requiere una relación mayor de surfactante a co-surfactante que una NE. La forma de las gotitas puede ser esférica o no esférica en el caso de ME en comparación con la forma esférica de la NE.

Las ME tienen una vida útil más larga que las NE y las dos son termodinámicamente estables (Shakeel et al. 2012). Las NE tienen un alto potencial para sobrepasar la barrera epidérmica y encapsulan altas concentraciones de fármaco [Minoxidil] (de Mattos et al., 2015). En LC se han diseñado NE conteniendo compuestos como ftalocianina de zinc (Oliveira et al. 2017) y AmB. Las NE conteniendo algunas chalconas (compuestos de baja solubilidad en agua) utilizando lecitina de soya y Tween20 como surfactante, fueron preparadas por emulsificación espontánea y probadas *in vitro* y mostraron actividad contra amastigotes de *L.(L.) amazonensis*. (de Mattos et al. 2015). Unas NE que contenían colesterol y AmB (tamaño 169 nm), mostraron actividad y selectividad contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L.(L.) amazonensis* (Caldeira et al. 2015).

2.4 Antiséptico, queratolítico y crema de PMD (3-PACK). El 3-PACK es un kit de tres componentes: un antiséptico, un queratolítico y una crema antileishmania de PMD, donde el antiséptico está dirigido a disminuir la carga microbiana de las lesiones, el queratolítico la hiperqueratosis y la crema de PMD a eliminar el parásito.

Los antisépticos son productos químicos con actividad contra microorganismos (Sánchez y Sáenz, 2005). Se seleccionan según su eficacia, espectro de actividad, efecto residual, inactividad en materia orgánica, hipersensibilidad cutánea, relación eficacia-concentración, estabilidad y transparencia (Martínez, 2013). Son eficaces si logran disminuir al menos 100.000 colonias de microorganismos en cinco minutos y en como mínimo cuatro tipos de cepas bacterianas de referencia (Casamada, N.; Ibáñez, N.; Rueda, J.; Torra, 2002). Se clasifican de acuerdo con el grupo funcional químico al que pertenecen [alcoholes, biguanidas, compuestos yodados], (Ver tabla 4).

Los alcoholes tales como etanol, alcohol isopropílico son preparados del 70-100%, tienen efecto residual (por varias horas) y actúan a nivel de la membrana celular de los microorganismos interfiriendo el metabolismo y desnaturalización de las proteínas, causando lisis celular (Sánchez y Sáenz, 2005). Las biguanidas como la clorhexidina y alexidina son incompatibles con detergente aniónicos y los compuestos inorgánicos y funcionan a un pH entre 5 y 7. El digluconato de clorhexidina (CXD) es la sal de clorhexidina, soluble en agua y se utiliza en concentraciones entre 0,5 y 4,0 % en soluciones antisépticas y desinfectantes. Tiene un amplio espectro de actividad (bacterias Gram+, Gram-, anaerobias facultativas y aerobias obligadas, hongos) y no es irritante.

Utilizada en salas de cirugía, contaminadas por *Staphylococcus aureus*, en bacteriemia asociada a catéter vascular, neumonía asociada al respirador, infecciones maternas y neonatales. La actividad antimicrobiana se debe a su unión y disrupción de la membrana plasmática alterando el equilibrio osmótico y causando lisis celular (Ruiz, Pacheco, y Valderrama 2011).

Los compuestos yodados al 5-10% como: tintura de yodo, y la povidona yodada se han utilizado también como antisépticos para prevenir infecciones (ulceras por presión, salas de cirugía en clínicas). Se combinan con los residuos de tirosina de las proteínas, precipitan las proteínas y los ácidos nucleicos de microorganismos Tienen actividad germicida, en bacterias Gram+, Gram-, micobacterias, hongos, virus y protozoos (Sánchez y Sáenz, 2005).

Los antisépticos son utilizados como desinfectantes de la piel dada la gran variedad de microorganismos (microbiota) que contiene, los cuales funcionan como una interfaz con el entorno exterior, para proteger la piel contra la invasión de otros organismos nocivos o patógenos (Grice y Segre, 2011). En caso de algún evento (externo o interno) varios microorganismos pueden inducir enfermedad por ejemplo en la dermatitis seborreica enfermedad del cuero cabelludo relacionada con *Malassezia spp* (Doncker, 1997), en los trastornos cutáneos relacionados con microorganismos no identificados como las heridas crónicas en los diabéticos, las úlceras por presión, quemaduras infectadas por *S. pyogenes*, *Enterococcus spp.* o *Pseudomonas aeruginosa*, en hongos y/o virus [(Frank et al., 2009), (Otto, 2009) y (Grice y Segre, 2011)]. En las úlceras crónicas (de LC por ejemplo) se recomienda eliminar los microorganismos que se encuentran en las lesiones, con el objeto de disminuir la barrera cutánea que estos generan, antes del tratamiento tópico o sistémico (Sadeghian et al. 2011).

En LC se han utilizado antibióticos como la gentamicina (contenida en cremas de PM), AmB y PM y antifúngicos como el KTZ, fluconazol, itraconazol y antimicrobianos como el cloruro de metilbencetonio y tioxolona (Akbari y Oryan 2017) (Goto y Lauletta Lindoso 2012), (Barberis y Vélez 2014) (Hossein, Parizi y Karvar 2015), (Sadeghian et al. 2011).

Tabla 4.

Antisépticos y propiedades.

Antisépticos	Espectro de acción.	Inicio actividad	Efecto residual	Acción frente a materia orgánica	Toxicidad
Etanol 70%	Bacterias: Gram+, Gram- Virus: HIV, Citomegalovirus	2 min	Nulo	Inactivo	Irritante
Gluconato de clorhexidina	Bacterias: Gram+ (SARM) Gram- (<i>Pseudomona</i>) Esporas, Hongos, Virus	15-30 seg	6 h	Activo	No tóxico
Povidona yodada	Bacterias: Gram+ (SARM), yodada 10%), Gram-, Hongos, Virus	3 min	3 h	Inactivo	Irritante, absorción del yodo a nivel sistémico.
Peróxido de hidrógeno	Bacterias: Gram+, Gram-, Virus (3%)	Inmediato	Nulo	Inactivo	Irritante en las mucosas

Nota: modificada de la guía de uso de antisépticos de laboratorios SALVAT, 2002. SARM (*S. aureus* resistente a la meticilina). Min: minutos, seg: segundos, h: hora

El segundo componente del 3-PACK es el queratolítico. Las lesiones de LC generalmente presentan hiperqueratosis mostrando un exceso de queratina en la capa externa de la piel (EC) y un engrosamiento de la piel, aumentando la barrera para los tratamientos de uso tópico.

Los queratolíticos son agentes químicos que usados al 12-20% que permiten la eliminación del EC. Se han usado en hiperqueratosis como la ictiosis (enfermedad genética que presenta piel seca, engrosada y escamosa), las queratodermias palmo-plantares y la psoriasis (Araguas, Tutor, Jes, y Vicu, 2014). Los más utilizados son el ácido salicílico (AS) y la urea.

El AS es un ácido fenólico aromático con grupos carboxilo (-COOH) e hidroxilo (-OH) unidos directamente a un anillo de benceno aromático (Arif, 2015). El AS es soluble en lípidos, lo que le permite ser miscible con los lípidos epidérmicos y los lípidos de las glándulas sebáceas en los folículos capilares (Arif, 2015). Disminuyen la cohesión intercelular del EC diluyendo el cemento intercelular y adhesión de los corneocitos y causando su aflojamiento y posterior desprendimiento. Son utilizados por muchos dermatólogos en el *peeling* químico de la piel (Arif, 2015). El AS reduce el pH del EC aumentando la hidratación y la suavidad de la piel incrementando la permeación de otros principios activos (Araguas et al., 2014). Se puede formular en la mayoría de vehículos (geles, cremas, lociones) en concentraciones entre el 0,5 y 60,0 %, pero las formulaciones comerciales se encuentran entre el 5 y 20% (Arif, 2015).

La urea es otro queratolítico utilizado en concentraciones superiores al 15% con propiedades hidratantes. La urea es un compuesto orgánico, estructurado como un grupo carbonilo unido a dos grupos amino (Araguas et al., 2014). Es utilizada en el desbridamiento y promoción de la curación normal de lesiones hiperqueratósicas superficiales, particularmente cuando la curación se retrasa por infección local, tejido necrótico, restos fibrinosos o purulentos y en condiciones hiperqueratósicas como piel seca y áspera, dermatitis, psoriasis, xerosis, ictiosis, eczema, queratosis pilaris y palmar, queratodermia, callos y callosidades (Pan et al. 2013).

Su mecanismo de acción se debe a la rotura de enlaces de hidrógeno en el EC aflojando la queratina epidérmica y aumentando el agua en sitios vinculantes (Pan et al. 2013).

El 3-PAKC contiene además una formulación tópica tipo crema de PMD. Se escogió la PMD, un tratamiento de segunda opción en leishmaniasis utilizado parenteral o intramuscular. Es utilizada en pacientes intolerantes o resistentes al tratamiento con Sb^V en dosis de 4 mg/Kg peso/día cuatro dosis cada tres días vía intramuscular (INS, 2010). En 63 pacientes con LC por *L. (V) panamensis* colombianos, la PMD utilizada a 4 mg/Kg peso/día cuatro dosis en días alternos presentó una tasa de curación del 86% (Robledo, Puerta, Muñoz, Guardo, & Vélez, 2006). El régimen terapéutico con PMD varía considerablemente en diferentes países. Roussel y colaboradores, 2006, en la Guayana Francesa, una dosis de PMD de 7 mg/Kg de peso mostró una tasa de curación del 78,8%. Priscilla y colaboradores, 2015, en Brasil, utilizando una sola dosis de PMD (7mg/Kg de peso) mostraron una tasa de cura del 55% (Priscilla et al. 2015). No se encuentran hasta ahora evidencias del uso de formulaciones tópicas de PMD para LC.

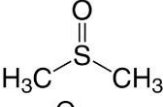
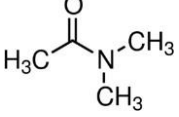
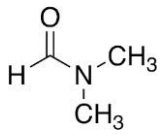
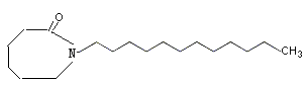
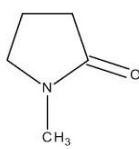
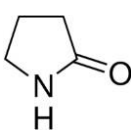
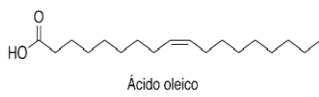
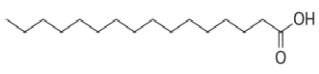
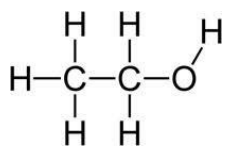
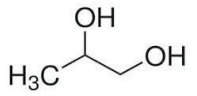
La crema de PMD del 3-PACK, contiene también potenciadores de la permeación percutánea (PPP *Percutaneous Penetration Enhancers* en inglés), compuestos químicos o naturales que alteran la permeabilidad de la piel sin irritar o causar daños en su estructura promoviendo por interacción con los principios activos con los lípidos de la piel.

El objetivo de utilizar los PPP es lograr que los fármacos se entreguen en piel a una velocidad requerida transdérmicamente. Como PPP se encuentran alcoholes, amidas, esteres, esteres de alcohol, ácidos grasos, glicoles, pirrolidonas y surfactantes siendo los más usados los ácidos grasos (ácido oleico, ácido mirístico, ácido esteárico), terpenos (nerol, citral, limoneno, farnesol) y pirrolidonas (Walters 2002). (Williams y Barry, 2004).

En este trabajo se utilizaron, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido oleico, esteárico y láctico, *trans*- β -cariofileno y propilenglicol (PG), ver tabla 5.

Tabla 5.

Potenciadores de la permeación percutánea (PPP) y estructura química

Grupo químico	Ejemplos	Estructura	Interacciones o modo de acción
Sulfóxidos	Dimetilsulfóxido		Denaturalizan las proteínas Interactúan con lípidos intercelulares del EC
	Dimetilacetamida		
	N,N-dimetil-formamida		
Azonas	Laurocapram		Interactúan con lípidos intercelulares del EC
Pirrolidonas	N-metil-2-pirrolidona		Alteran la naturaleza solvente de la membrana Inducen la liberación sostenida del EC por tiempo prolongados.
	2-Pirrolidona		
Ácidos grasos	Ácido oleico		Interaccionan con lípidos del EC
	Ácido esteárico		
Alcoholes	Etanol		Aumentan la solubilidad del fármaco en el vehículo.
Glicoles	Propilenglicol		Alteran la solubilidad del tejido Mejoran la partición del fármaco en la membrana. Modifica la actividad

Grupo químico	Ejemplos	Estructura	Interacciones o modo de acción
			termodinámica del fármaco dentro de la formulación.
Surfactantes	Tween 80		Aumentan el coeficiente de permeabilidad del fármaco.
	Tween 20		
	Lauril sulfato de sodio		
Aceites esenciales	Eucalipto		Aumentan el coeficiente de permeabilidad del fármaco
	Ylang-ylang		
	<i>trans</i> - β -Cariofileno		

Nota: adaptada de (Williams y Barry 2012).

3. Metodología

El presente trabajo de investigación se realizó en cuatro fases: 1°. Preparación y caracterización del 3- PACK, 2°. diseño del esquema de tratamiento utilizado con el 3-PACK en ratones BALB/c, 3°. Determinación de la actividad anti-*Leishmania* del 3-PACK y 4° determinación de la toxicidad y distribución de la PMD (hígado y bazo). Las fases I, II, IV y parte de la fase III fueron realizadas en el laboratorio de quimioterapia, del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander (UIS), la PMD fue cuantificada en el Laboratorio de Espectrometría de Masas ubicado en el Parque Tecnológico Guatiguará (PTG- UIS), los espectros en infrarrojo (IR) de los componentes del 3-PACK se realizaron en el Laboratorio de Espectroscopia Parque Tecnológico Guatiguará (PTG- UIS) y el procesamiento y análisis de las biopsias de las lesiones de LC, en el Laboratorio del Departamento de Patología, Escuela de Medicina, con el apoyo y asesoría del profesor Julio Cesar Mantilla El esquema del diseño metodológico desarrollado en este trabajo se muestra en la figura 4.

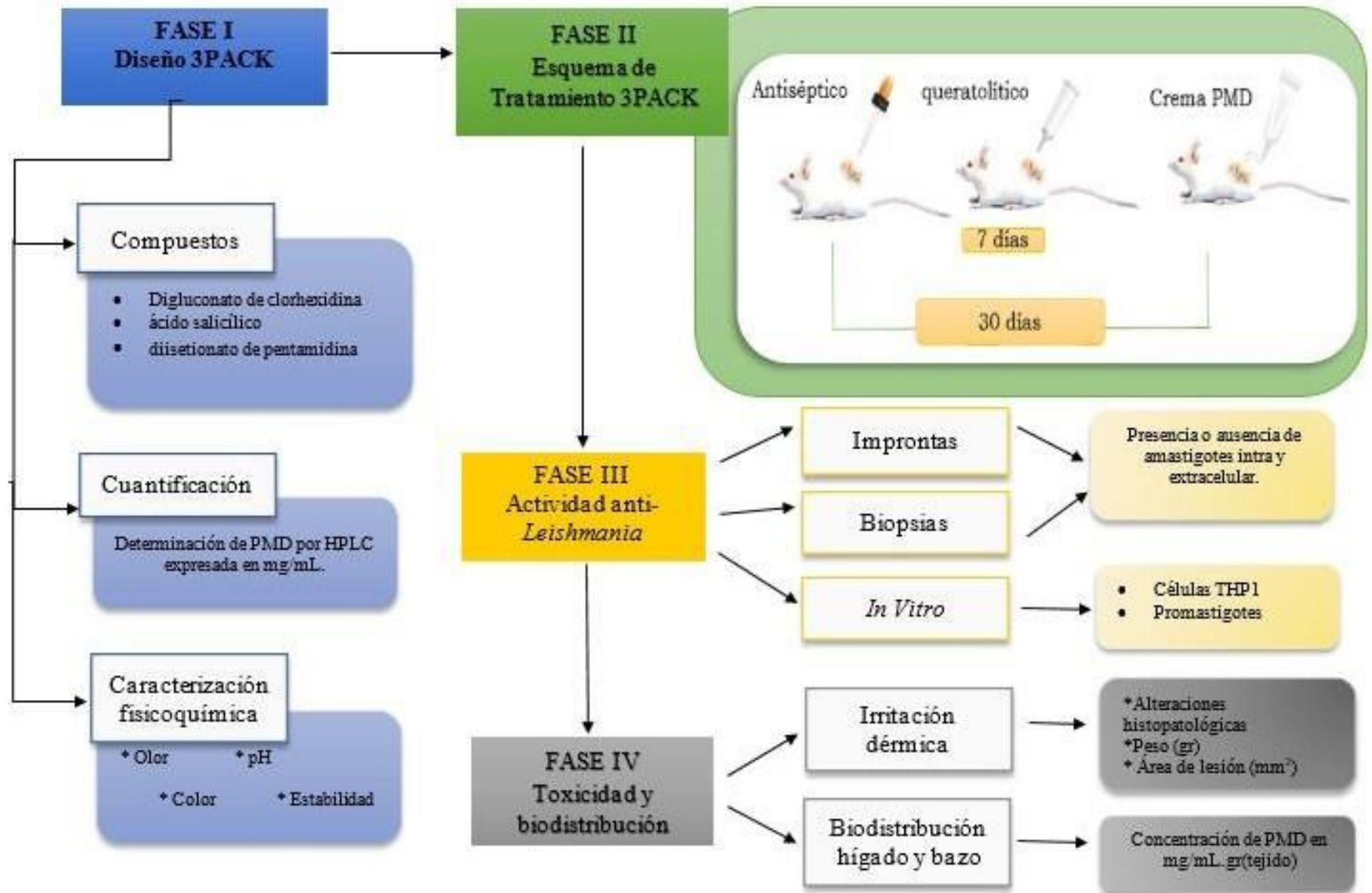


Figura 4. Diseño metodológico utilizado en el presente trabajo. HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia.

3.1 Preparación y caracterización del 3-PACK

3.1.1 Compuestos. El 3-PACK está conformado por un antiséptico de digluconato de clorhexidina (CXD, Sigma Aldrich® St. Louis, USA), un queratolítico de ácido salicílico (AS, Suquin Ltda, Colombia) y una formulación (crema) de PMD. La PMD fue suministrada por la Secretaría de Salud de Santander e importada por Sanofi-Aventis®, Colombia, S.A. En algunos experimentos se utilizó PMD comercial obtenida en Sigma-Aldrich.

3.1.2 Preparación del 3-PACK. Se preparó una solución hidroalcohólica de CXD, un queratolítico de AS y una formulación semisólida tipo gel usando celulosas modificadas [carboximetilcelulosa (CMC)] como agente dispersante. En la tabla 6 se presenta la composición porcentual de los componentes del 3-PACK. Las cremas fueron preparadas utilizando para la fase oleosa ácido esteárico triple, monoesterato de glicerilo, en la fase acuosa trietanolamina (TEA), glicerina. Como PPP químicos se utilizaron ácido oleico y *trans*- β -cariofileno, DMSO, ácido esteárico y láctico y PG y excipientes en la fase acuosa, todos grados farmacéuticos. Los componentes de la fase oleosa fueron fundidos en un baño María a 65°C y luego se mezclaron con los de la fase acuosa en agitación constante hasta observar una emulsión homogénea. La adición de los principios activos se realizó en frío (Aguiar et al. 2009).

3.1.3 Caracterización del 3-PACK. Para el diseño y caracterización de las formulaciones del 3-PACK se tuvieron en cuenta algunas propiedades de los principios activos (CXD, AS y PMD) reportadas en la base de datos *DrugBank* versión 5.0 la cual proporciona información detallada de fármacos aprobados por administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos,

siglas en inglés (U.S. FDA) y algunos fármacos experimentales. La información obtenida se encuentra reportada en la tabla 7.

Tabla 6.

Composición porcentual de cada uno de los componentes del 3-PACK

Componentes	Formulación (%P/P)		
	Antiséptico	Queratolítico	Crema de PMD
Digluconato de clorhexidina	0,5	0	0
Ácido salicílico	0	10	0
CMC	0	2	0
PMD	0	0	3 y 6
Ácido oleico	0	0	1,7
DMSO	0	0	0,5
<i>trans</i> β -Cariofileno	0	0	0,5

PMD: diisetionato de pentamidina, CMC: carboximetilcelulosa, DMSO: dimetilsulfóxido

En las preparaciones se determinaron las características organolépticas (color, olor, homogeneidad y extensibilidad aparente) por métodos cualitativos (Alia y Montes, 2005).

Para la extensibilidad aparente, se situó una pequeña muestra (1g) del gel de AS y por separado (1g) crema de PMD sobre el dorso de la muñeca y se extendió hacia el brazo, mediante la yema de los dedos, se clasificaron como baja, media y alta extensibilidad, en función de la facilidad de extensión de la muestra sobre la piel, entre menos resistencia al movimiento de extensión presente la formulación más alta será su extensibilidad aparente.

Se determinó la estabilidad a 4°, 25° y 37°C por observación macroscópica (Akhtar et al. 2012). Los resultados fueron expresados cualitativamente para las características organolépticas y semicuantitativo para la estabilidad, (+) poco estable, (++) estable, (+++) muy estable, (tabla 8).

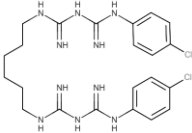
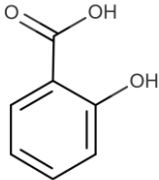
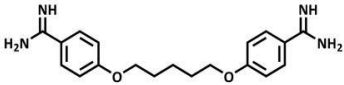
El pH se determinó utilizando un pH-metro digital (Ohaus Starter 3100, Nueva Jersey, USA). Dos gramos de la formulación fueron diluidos en 30 mL de agua, se introdujo el electrodo en la solución y se leyó el valor de pH. Se hizo triplicado para cada formulación. Teniendo en cuenta la escala universal de pH las formulaciones fueron clasificadas como ácidas (pH 0 -6), neutras (pH 7), básicas o alcalinas (pH 8-14).

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro (Brookfield DV₂T, Middleboro, USA) en las siguientes condiciones: temperatura de 26°C, velocidad de 0,2 revoluciones por minuto (rpm) y un torque de 25%. En cada medición se tomaron 100 mL de la formulación. Los resultados se expresaron en centipoise (cps).

El espectro IR de la CXD, del gel de AS y la crema de PMD, se determinó utilizando un Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™50 FT-IR (Figura 5), por ATR (siglas en inglés *Attenuated Total Reflection*) en la región del IR entre 4000 cm⁻¹ y 400 cm⁻¹. Para cada medición se utilizaron aproximadamente 50 µg de cada formulación.

Tabla 7.

Propiedades fisicoquímicas de los componentes activos del 3-PACK

Componente activo	Propiedades fisicoquímicas	Estructura química
Digluconato de clorhexidina	PM: 505,447 g/mol	
	LogP: 4,51	
	Pka: 10,52	
	Solubilidad en agua: 800mg/L	
Ácido salicílico	PM: 138,1207 g/mol	
	LogP: 1,98	
	Pka: 2,79	
	Solubilidad en agua: 2240 mg/L	
Diisetonato de pentamidina	PM: 340, 4195 g/mol	
	LogP: 2,32	
	Pka: 12,13	
	Solubilidad en agua: 0,024 mg/mL	

PM: peso molecular, LogP: coeficiente de partición, Pka: logaritmo de la constante de disociación ácida. Datos tomados de *DrugBank* versión 5.0.

Tabla 8.

Análisis semicuantitativo para la estabilidad

Estabilidad		Características fisicoquímicas
Poco estable	+	Cambios de color, olor, separación de fases en algunas temperaturas.
Estable	++	Ligero cambio de color, no hay cambio de olor ni separación de fases en algunas de las temperaturas en
Muy estable	+++	todas sus características organolépticas se mantienen constantes en el tiempo a diferentes temperaturas evaluadas. <u>No presenta separación de fases.</u>

La concentración de la PMD contenida en las cremas de PMD al 3 y 6%, se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia siglas en inglés (HPLC) según lo descrito por Berger y colaboradores, 1992. Como fase móvil se utilizó una mezcla de 76% fosfatos [hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) con dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4)] a pH 3,2 y 24% acetonitrilo (Sigma- Aldrich). Se utilizó una columna C18 (Agilent Technologies, USA.), 2 0 $\mu\text{L}/\text{min}$ como volumen de inyección, 1mL/min como flujo. La longitud de onda del detector UV fue de 247 nm. La determinación de la concentración de PMD se realizó por extrapolación en la curva de calibración y con la ecuación de la recta por regresión lineal determinada previamente con soluciones patrón de PMD (0,0125 - 0,33mg/mL) (Berger et al. 1992).



Figura 5. Equipo de espectroscopia infrarrojo Thermo Scientific™ Nicolet

3.2 Esquema de tratamiento del 3-PACK.

Teniendo en cuenta las características histopatológicas de las lesiones de LC, estudios previos realizados en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP y los avances en el tratamiento tópico de la LC encontrados en la bibliografía, se realizó la selección de los componentes del 3-PACK y se diseñó el esquema de tratamiento.

Este consistió en la aplicación inicial del antiséptico (0,5% CXD) con el objeto de eliminar las bacterias presentes en las lesiones de LC (durante 30 días). Segundo la aplicación del gel conteniendo el queratolítico (AS 10%), 10 minutos después del antiséptico cada 12 horas durante los primeros 7 días de tratamiento (7 dosis en total) con el objeto de disminuir el engrosamiento del EC y tercero la aplicación de la crema de PMD (3 y 6%), dos veces al día y día de por medio (los primeros 7 días de tratamiento) y dos veces al día desde el día 8 hasta el día 30 de tratamiento.

3.3 Actividad anti-*Leishmania* del 3-PACK

3.3.1 Animales y consideraciones éticas. Los ratones BALB/c fueron obtenidos del Instituto Nacional de Salud (INS). Estos fueron intervenidos bajo las disposiciones legales determinadas en la investigación biomédica con animales amparadas en la ley 84 de 1989. Se mantuvieron en la Unidad Experimental del CINTROP ubicada en el PTG- UIS. Esta investigación se catalogó SIN RIESGO en humanos según la normatividad vigente de la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 ya que no se contempló la intervención, ni la utilización de muestras de seres humanos. Este trabajo contó con el aval del Comité de Ética para la investigación científica (CEINCI – UIS). Se utilizaron ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos bajo ciclos de 12 horas luz artificial/12 horas oscuridad con comida y bebida *ad libitum*.

3.3.2 Infección. Los ratones fueron infectados en la zona lumbosacro (base de la cola) con promastigotes de una cepa *L. (V) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) adquirida comercialmente. se inoculó a una concentración de 2×10^6 parásitos/100 μ L de PBS pH 7,4. Se esperó entre seis y ocho semanas para observar la presencia de las lesiones (nódulo y úlcera) para iniciar el tratamiento (Figura 6).

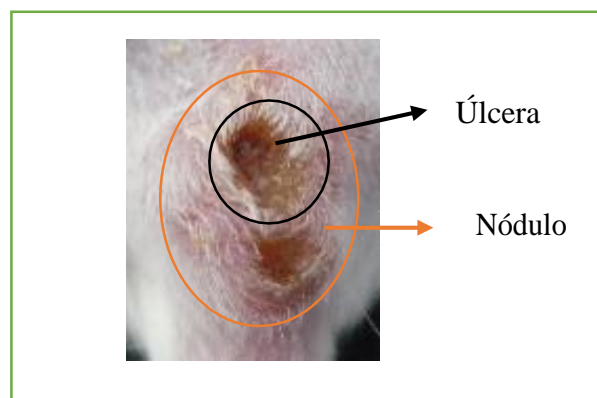


Figura 6. Lesión de LC en ratones infectados con *L. (V) braziliensis*.

3.3.3 Grupos experimentales, seguimiento y sacrificio de los ratones. Se hicieron cuatro grupos experimentales utilizando (2) ratones por grupo excepto el grupo 2, que se utilizaron 3 ratones. grupo 1: ratones tratados con el kit 3-PACK conteniendo crema de PMD 3%; grupo 2: ratones tratados con el kit 3-PACK conteniendo crema de PMD 6%; grupo 3: ratones tratados con el antiséptico y el queratolítico; grupo 4: control tratado con los vehículos del antiséptico, queratolítico y crema. El tratamiento fue aplicado por 30 días. La figura 7 muestra de una manera general como se realizó la infección, se determinó la evolución de la lesión y como se establecieron los grupos de tratamiento.

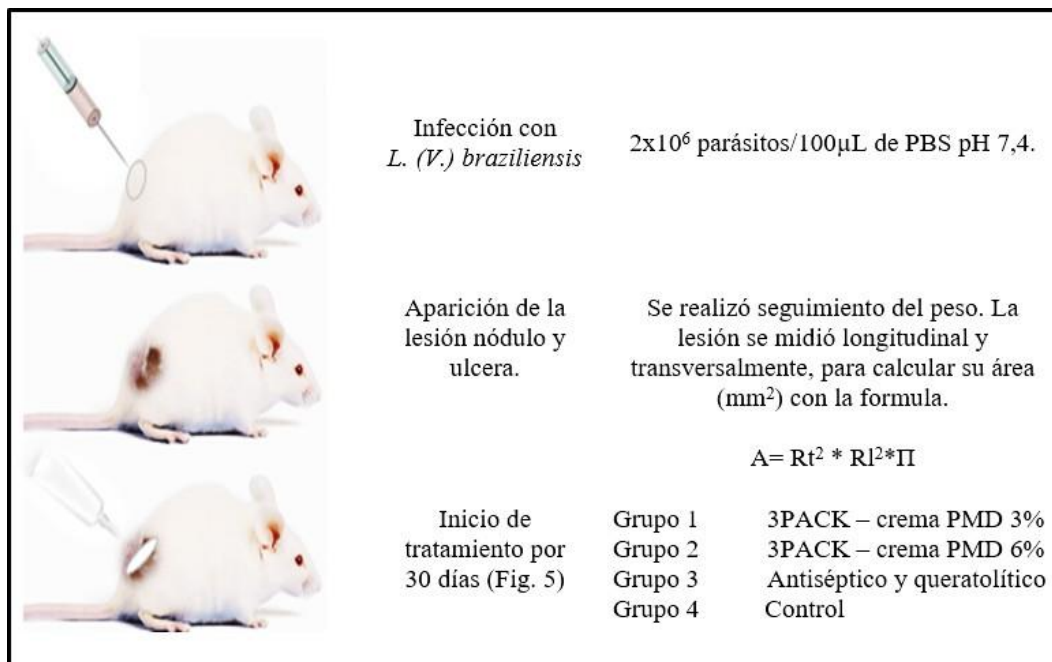


Figura 7. Esquema de infección y tratamiento en ratones BALB/c. Rt: radio transversal y Rl radio longitudinal.

Durante los 30 días del tratamiento y 15 días post tratamiento (pt) se realizó seguimiento semanal. Los ratones fueron pesados y el tamaño de las lesiones se midió utilizando un medidor digital (Caliper®). Se calculó el área de la lesión; expresando los resultados en mm². Adicionalmente se llevó un registro fotográfico de la evolución de las lesiones.

Dos semanas después de la última aplicación los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina y se sacrificaron por dislocación cervical.

3.3.4 Eficacia anti-Leishmania del 3-PACK. La eficacia del 3-PACK clínica y parasitológica se determinó teniendo en cuenta los cambios en el tamaño de la lesión y la presencia de parásitos en las lesiones. Después del sacrificio se realizaron extendidos circulares (improntas) de la lesión en una lámina porta objetos. Las láminas fueron fijadas con metanol absoluto por un minuto y posteriormente se colorearon con Giemsa.

Los extendidos fueron analizados microscópicamente y los resultados se expresaron semi-cuantitativamente por cruces observando la presencia/ausencia de amastigotes intra y extracelulares: (0) ausencia, (+) escasos, (++) moderados, (+++) abundantes. Los resultados de la eficacia clínica fueron expresados como el porcentaje de reducción en el área de las lesiones (mm^2) tanto en nódulo como en úlcera por grupo de tratamiento y comparados con el control (tratado con el vehículo).

Adicionalmente se tomaron biopsias de las lesiones las cuales fueron recogidas en formalina neutra (pH 7,0) al 10%. Posteriormente las biopsias fueron embebidas en bloques de parafina (Leica Microsystems®). Se realizaron cortes histológicos de 5 μm utilizando un micrótopo RM2135 (Leica Microsystems®) los cuales fueron recogidos en láminas de vidrio. Después de una serie de lavados con agua y alcoholes a diferentes concentraciones las láminas fueron coloreadas con hematoxilina/eosina. Las láminas fueron observadas microscópicamente. Los resultados fueron registrados en fotomicrografías y analizados semi cuantitativamente según presencia/ausencia de amastigotes intra y extracelulares descrita anteriormente.

3.4 Eficacia del gel de ácido salicílico.

Para determinar si el queratolítico de AS utilizado cumplía con su función (disminuir el EC), los ratones BALB/c sanos (3 ratones) de 8-10 semanas de edad fueron triconomizados en la región dorsal y posteriormente tratados con el gel de AS (50 mg/día) por 7 días. Un ratón permaneció sin tratamiento (control). Después de tres días de finalizar el tratamiento los tres ratones fueron sacrificados con anestésicos y posterior dislocación cervical.

En el sitio de aplicación, se realizó un corte de la piel de aproximadamente 2 cm², el cual fue fijado con formalina 10% y procesado según lo descrito anteriormente. Se determinó el efecto de éste en el EC. Los resultados se expresaron observando el aumento o disminución del EC.

3.5 Ensayos *in vitro*.

Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar la actividad antileishmania y toxicidad del 3-PACK y la PMD libre *in vitro*. Se utilizaron promastigotes de *L. (V) braziliensis* los cuales fueron cultivados en medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBI, Gibco®, Grand Island, NY, USA) a 26°C. Como células se utilizaron monocitos leucémicos (THP-1, ATCC TIB-202) las cuales fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFBI, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células fueron tratadas con forbolmiristato acetato (PMA, Sigma-Aldrich®) durante 24 horas para ser transformadas a su fenotipo adherente. Las soluciones stock de PMD fueron preparadas en DMSO y las de trabajo en medio de cultivo. Las formulaciones se diluyeron en medio de cultivo en relación 1:100.

Los promastigotes en fase exponencial de *L. (V.) braziliensis* (1×10^6 parásitos/mL) y células THP-1 transformadas (6×10^5 células/mL) fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de PMD libre, PMD en crema al 3 y 6%, queratolítico y crema de PMD 3%, queratolítico y crema de PMD 6%, antiséptico y crema PMD 3%, antiséptico y crema PMD 6% y el vehículo, a 72 horas a 26 y 37°C respectivamente. Los parásitos y células control permanecieron sin tratamiento. Los parásitos fueron contados microscópicamente en hemocitómetro utilizando eosina amarilla 0.25% como colorante vital. Las células fueron tratadas 20 μ L de MTT a 37°C, por 4 horas y luego con DMSO por 5 minutos.

Las absorbancias fueron determinadas por espectrofotometría a 580 nm utilizando un lector de placas MultiSkan™ GO (Thermo Fisher). Se calcularon los porcentajes de reducción y porcentajes de inhibición para cada una de las diluciones. Los resultados fueron comparados con el control y expresados como la concentración inhibitoria o citotóxica 50 (CI₅₀ y CC₅₀) y la CI₉₀ y CC₉₀ para la PMD y PMD combinada con el antiséptico y el queratolítico mediante regresión no lineal en el software de regresión sigmoideal Mxlfittm (Business solution, UK).

3.6 Pruebas de toxicidad de 3-PACK.

Estas pruebas se hicieron con el fin de determinar la irritación y los efectos del tratamiento en el peso y comportamiento de los animales. La irritación dérmica se determinó siguiendo las directrices dispuesta por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), guía 404 para la corrosión y la irritación de la piel de la (Directorate et al. 2014). Los ratones BALB/c fueron tricotomizados y al día siguiente tratados tópicamente con el antiséptico, el queratolítico y la cremas de PMD 3 o 6%. Se realizó seguimiento 4, 24 y 72 h y 9, 14 días pt para

detectar por observación macroscópica signos de eritema y edema. Las reacciones dérmicas de irritación en el sitio de aplicación fueron clasificados como: ausencia (0), ligero (1), leve (2), moderada (3), irritación grave (4). Los animales se sacrificaron a los 16 días pt. Se realizó registro fotográfico durante todo el tiempo de tratamiento. Se tomaron biopsias de piel las cuales fueron procesadas para estudios histopatológicos. Los parámetros histopatológicos de la piel evaluados fueron: hiperqueratosis (engrosamiento del EC), paraqueratosis, espongirosis, exocitosis en infiltración dérmica considerando como (-) ausencia, (\pm) equivoca, (+) leve, (++) moderado y (+++) severo. Se compararon tanto las alteraciones macroscópicas en la piel de los ratones como las características histopatológicas entre los ratones tratados con los vehículos de las formulaciones como los tratados con las formulaciones con el principio activo (CDX, AS y PMD).

Para determinar las alteraciones físicas y de comportamiento los ratones fueron pesados al inicio y final del tratamiento, utilizando una balanza (Ohaus®). Para los cambios en el comportamiento se observó la ingesta del alimento y cualquier manifestación (signos de dolor, irritabilidad) en los animales.

3.7 Distribución de la PMD hígado y bazo.

Después 15 días de terminar el tratamiento con el 3-PACK los siete (7) ratones que recibieron tratamiento, los ratones fueron sacrificados de acuerdo con lo descrito anteriormente. El hígado y el bazo fueron extraídos, colocados en frascos ámbar de 2 mL y preservados a -20°C . Para el procesamiento, los órganos fueron dejados a temperatura ambiente por una hora.

Se pesaron 30 mg de cada uno y se homogenizaron con la ayuda de una jeringa. Posteriormente se agregaron 500 μ L del solvente extractor (buffer fosfato) el cual fue mezclado vigorosamente hasta obtener una solución homogénea. Después de 15 min en reposo, se adicionaron otros 500 μ L del solvente extractor se mezcló bien y luego 500 μ L hasta completar un volumen final de 1,5 mL. Se centrifugó por 15 minutos a 10.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se depositó en viales de 1,0 mL los cuales se pasaron por HPLC para cuantificar la PMD.

Para la estandarización de este procedimiento se determinó primero un porcentaje de Recuperación de la PMD, Para lo cual, el hígado preservado a -20°C (de una raton sano), se dejó atemperando por una hora, luego se pesaron 30 mg y se le inyectó una concentración conocida de PMD (0,25 mg/mL). Después de 24 h a 4°C , se dejó atemperar y se depositó en viales cónicos de 2 mL y se siguieron los pasos descritos anteriormente para la cuantificación de la PMD por HPLC. El porcentaje de recuperación se calculó teniendo en cuenta la concentración inicial de PMD depositada (0,25 mg/mL).

Para los resultados de distribución de PMD en hígado y bazo, se comparó el cromatograma obtenido del análisis de distribución en los órganos, con el cromatograma obtenido en uno de los patrones de la curva de calibración. Los resultados fueron expresados como la concentración de PMD en mg/mL/mg de tejido.

3.8 Análisis estadístico.

Para la comparación del efecto del tratamiento en los diferentes grupos respecto al control, se realizó un análisis estadístico mediante el software SigmaStat versión 3.5. teniendo en cuenta para los ensayos *in vitro* (toxicidad en células y ensayo de actividad en células) comparación análisis por ANOVA de una vía, seguidos de una prueba Bonferroni tomando como diferencias significativas valores de $p < 0,05$. Para evaluar la eficacia del tratamiento 3-PACK respecto al control se realizó una regresión múltiple, tomando como diferencias significativas valores de $p < 0,05$. La eficacia de los ensayos histopatológicos se realizaron análisis cualitativos y semicuantitativos.

4. Resultados

Se muestran las características fisicoquímicas del 3-PACK, su estabilidad, actividad del compuesto anti-*Leishmania* después de preparado *in vitro*, el diseño de tratamiento que se estableció para el uso del 3-PACK en los ratones y el efecto clínico y parasitológico del tratamiento, sus efectos tóxicos y la distribución del fármaco (PMD) en animales infectados y sanos.


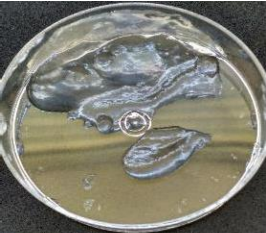

4.1 Características fisicoquímicas del 3-PACK.

La caracterización fisicoquímica de las formas farmacéuticas del 3-PACK permitió analizar la calidad de las formulaciones, basada en sus características organolépticas determinadas por los ensayos físicos realizados como: color, olor, homogeneidad, estabilidad y extensibilidad aparente. En la tabla 9 se muestran los resultados de esta caracterización. Los componentes del 3-PACK fueron homogéneos, el queratolítico (gel de AS 10%) y las cremas de PMD fueron muy estables (+++) en el tiempo, es decir sus características galénicas no variaron después 45 días de preparación a las diferentes temperaturas evaluadas. El antiséptico de CXD a 37°C mostró una disminución en el volumen debido a la evaporación de sus componentes ya que el alcohol etílico es volátil, se recomienda almacenar el antiséptico a 4°C, temperatura en la cual mostró más estabilidad. La extensibilidad aparente para el gel de AS fue baja debido su resistencia al extender el gel en la piel. La crema de PMD, por su composición oleosa y tener mayor fluidez que el gel mostró una alta extensibilidad aparente ya que tiene la facilidad de extenderse sobre la piel y ser absorbida rápidamente.

Tabla 9.

Características organolépticas del 3-PACK, determinadas 24 horas después de su preparación.

A temperatura ambiente (~26°C).


3-PACK	Color	Olor	HG	Es	EA	Foto
Antiséptico	Incoloro	Inoloro	Homogéneo	++	No aplica	
Queratolítico	Incoloro	Inoloro	Homogéneo	+++	baja	
Crema	Blanco	Aceitoso	Homogéneo	+++	alta	

HG: homogeneidad, Es: estabilidad, EA: extensibilidad aparente.

El pH del antiséptico de CXD fue de 7,05, el del gel de AS fue 6,21 y la crema de PMD fue de 5,15 debido a que sus principios activos AS y PMD son ácidos, con valores dentro del rango del pH de la piel (4,5- 6,2). Ver tabla 10. La viscosidad de la crema (sin fármaco) fue de $147545,50 \pm 4,87$ (cP), la cual es óptima de acuerdo con lo reportado en la literatura para formulaciones de uso tópico.

Tabla 10.

pH de formulaciones del 3-PACK

Equipo	Componente	pH1	pH2	pH3	Promedio	DE	Final
	Antiséptico	7,03	7,06	7,05	7,05	+/- 0,01	Neutra
	Queratolítico	6,23	6,20	6,21	6,21	+/- 0,01	Ácida
	Crema	5,15	5,12	5,17	5,15	+/- 0,02	Ácida

El espectro infrarrojo (IR) de la CXD mostró las bandas características de los enlaces N-H flexión en 1581 y 1634 cm^{-1} y tensión entre 3006 y 3612 cm^{-1} . En la región entre 3050 y 3150 se encontró también la tensión del enlace C-H de los grupos aromáticos, aparecen varias señales que corresponden a flexiones en el plano de los aromáticos y varían de acuerdo con los sustituyentes y las posiciones de los mismos. En esta región también se encontraron señales que corresponden los estiramientos C-C, C-N y C-O y aparecen varias señales en función del número de hidrógenos (figura 8). El espectro IR del AS puro mostró en las regiones de 2400 a 3500 cm^{-1} las bandas características para los ácidos carboxílicos de los enlaces C-H y O-H pero con una baja intensidad. En la región 1225~950 cm^{-1} no observan, bien definidos (se observa ruido), los picos de los aromáticos y características de los ácidos carboxílicos (figura 9A). Al comparar los picos del espectro IR del gel de AS en esta región, se observaron picos más débiles pero agudos, debido a los componentes del vehículo de la formulación. Según la teoría estos podrían aumentar su intensidad en presencia de grupos polares (figura 9B).

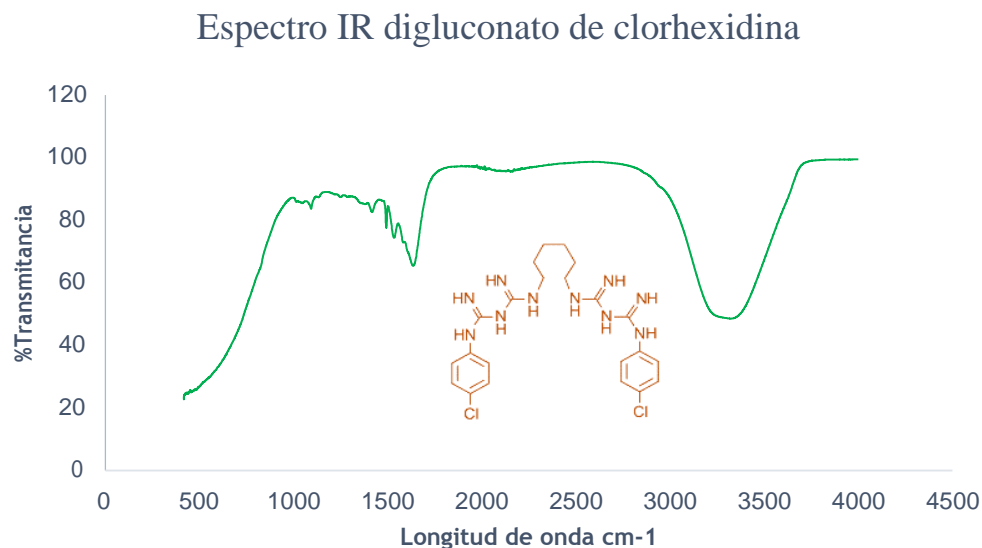


Figura 8. Espectro IR de la solución de CXD al 0,5 %

El espectro IR de PMD en la región de $1225\sim 950\text{ cm}^{-1}$ mostró los mismos picos obtenidos con el gel de AS, ya que la PMD tiene anillos aromáticos, presentó enlace C-O, C-C y C-N en la región comprendida entre 1475 y 1640 cm^{-1} se encontró la flexión del enlace N-H del grupo funcional amida y el enlace C=C de los aromáticos, en la región de $1640\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ se encontró el enlace C=C del grupo amida, en la región de $3100\text{ - }3500\text{ cm}^{-1}$ se encontró la tensión del enlace N-H del grupo amida y los aromáticos (figura 10A).

El espectro IR de la PMD pura y de las formulaciones de crema de PMD al 3 y 6%. mostró un pico de la región comprendida entre 3100 y 3500 cm^{-1} el cual fue mayor en las cremas al 3 y 6% y aumentó la intensidad de la señal debido a la presencia de los grupos O-H y los ácidos carboxílicos presentes en los componentes de la formulación (ácido esteárico, monoesterato de glicerilo) figura 10B.

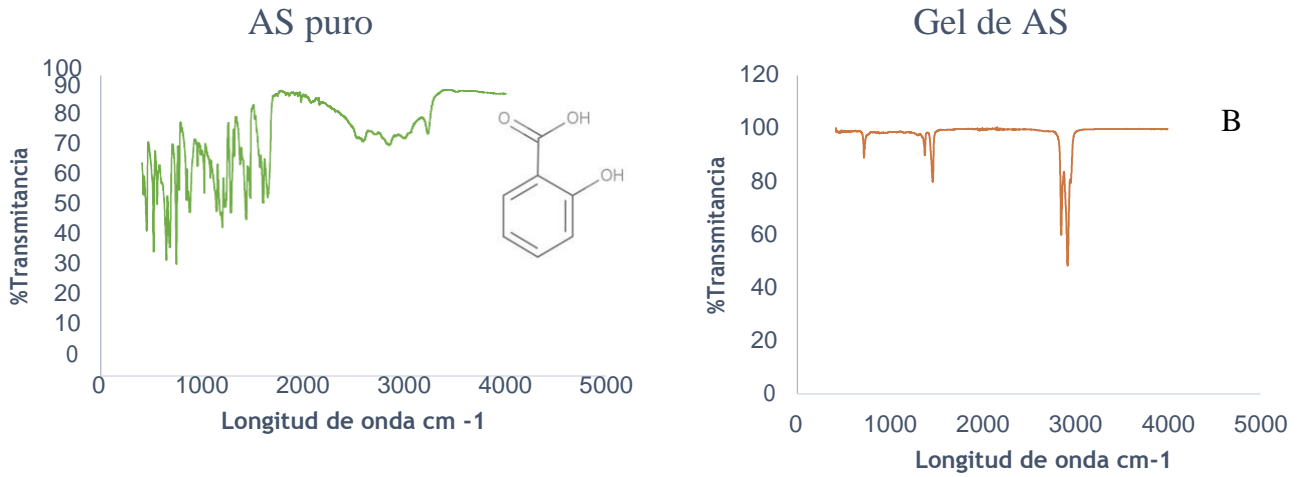


Figura 9. Espectro IR **A.** Ácido salicílico puro. **B.** Gel de AS

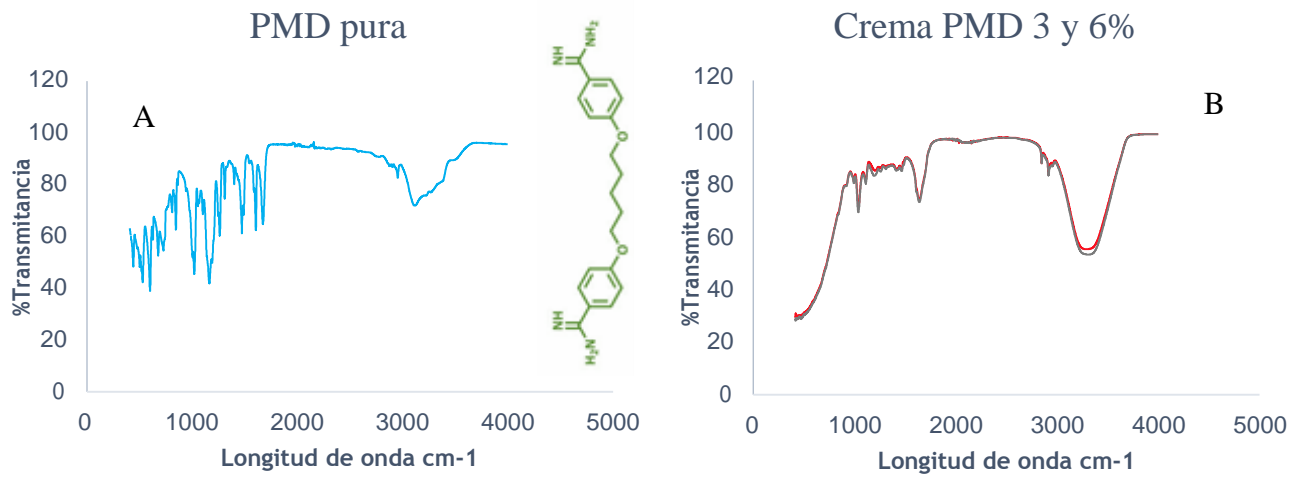


Figura 10. Espectro infrarrojo (IR) **A.** Isetionato de pentamidina pura **B.** crema de PMD 3% (rojo) y 6% (verde).

4.2 Implementación de un método de cuantificación de PMD por HPLC y concentración de la PMD en las formulaciones.

La curva de calibración utilizando patrones de PMD con concentraciones seriadas entre 0,0125- 0,33 mg/mL, mostró un coeficiente de regresión ($R^2 = 0,9995$) por extrapolación de la ecuación de la recta obtenida. Este experimento fue repetido tres veces hasta obtener la mejor curva de calibración, En la figura 11 se muestra la curva de calibración obtenida y la figura 12A muestra el cromatograma del patrón de PMD a (0,062mg/mL) con un tiempo de retención de 1,95 min y la figura 12B el de la PMD en crema 6%, el cual muestra un tiempo de retención de 1,1 min pero con una baja intensidad, también se observan picos que podrían corresponder a los demás componentes de la formulación.

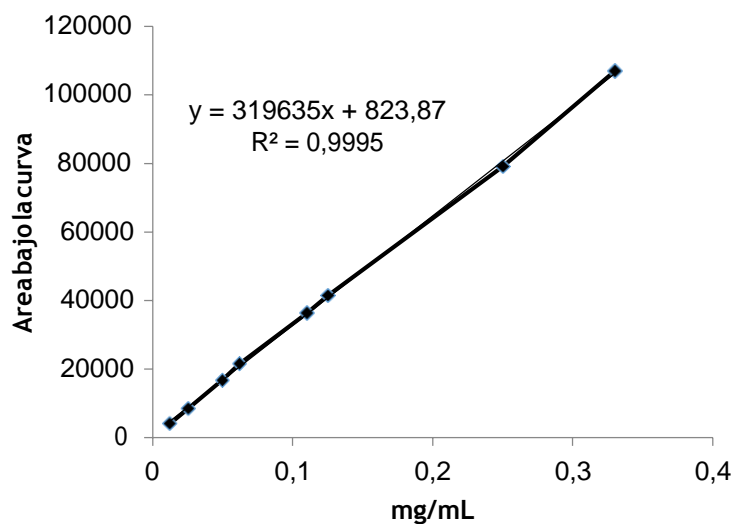
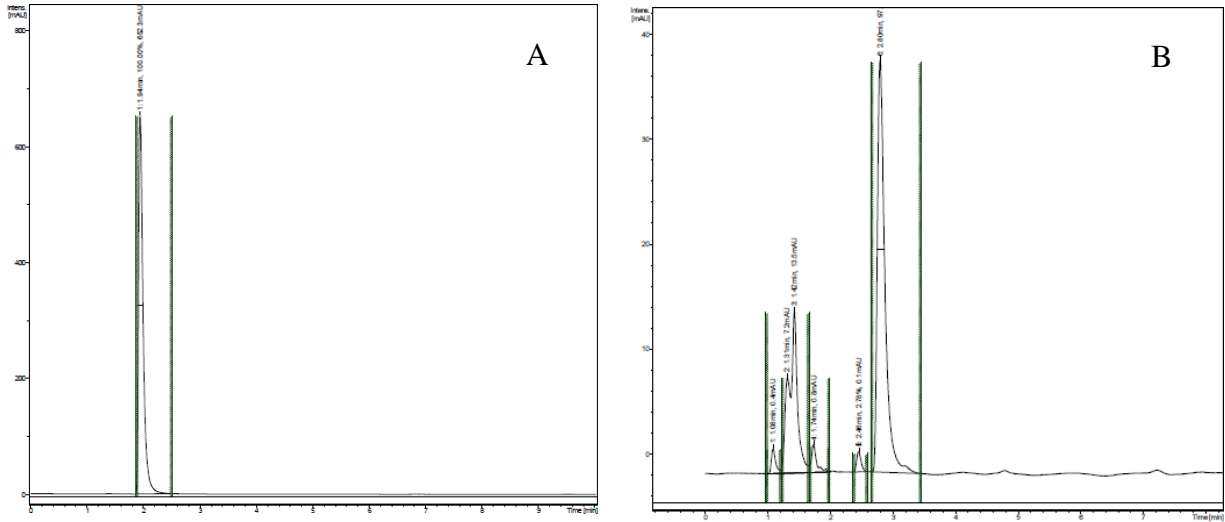


Figura 11. Curva de calibración concentración de PMD vs área bajo la curva, utilizando HPLC.



4.4 Eficacia del tratamiento

4.4.1 Eficacia clínica. Con respecto a las lesiones (nódulos y úlceras) en la siguiente tabla (tabla 11) se muestran los códigos utilizados, los tamaños antes y 15 día pt y los porcentajes de reducción de las lesiones (%R) observados en cada uno de los ratones. Se encontró que uno de los ratones tratados con el 3-PACK utilizando PMD al 3% y dos de los ratones tratados PMD al 6% mostraron un 100% de reducción de las lesiones (nódulos y úlceras). Ambos tratamientos redujeron el 100% del tamaño de las úlceras. El tratamiento con la solución de CXD y el gel de AS y el tratamiento con los vehículos no redujeron las lesiones (ni nódulos, ni úlceras).

Tabla 11.

Eficacia clínica del 3-PACK

Grupo	3-PACK	Ratón	Área de lesión (mm ²)					
			Nódulo			Úlcera		
			Inicio	15 días pt	% R	Inicio	15 días pt	% R
1	PMD-3%	R1	26,0	0	100	0	0	0
		R2	20,5	28,1	0	0	0	0
2	PMD-6%	R1	26,6	0	100	0	0	100
		R2	47,5	46,5	2,11	3,3	0	100
4	CXD y AS	R1	20,0	51,9	0	2,2	12,5	0
		R2	24,2	47,5	0	2,0	15,6	0
5	Control	R1	24,9	73,8	0	0	7,8	0
		R2	38,5	84,0	0	0	9,7	0

PMD-3%: crema de PMD 3%, PMD-6%: crema de PMD 6%, pt: posttratamiento, %R: porcentaje de reducción, mm²: milímetros cuadrados, control: tratados con el vehículo, CXD: antiséptico de clorhexidina al 0,5%, AS: gel de ácido salicílico al 10%.

En la figura 14 A y C se muestran los resultados de las áreas de las lesiones (nódulos y las úlceras) de los ratones del grupo 1 (3-PACK y PMD al 3%) y grupo 2 (3-PACK y PMD al 6%) comparado con el control [tratado con vehículos (línea discontinua)].

En la figura 14 C y D se muestran los resultados de las áreas de los nódulos y las úlceras de los ratones del grupo 1 y los del grupo 2 que no redujeron. En todas se observa la evolución de las lesiones en diferentes tiempos.

Para determinar la eficacia del tratamiento, tal como se mencionó en la metodología, se compararon los grupos respecto al control (tratado con el vehículo). Los resultados del grupo 1 tratado con el 3-PACK y PMD al 3%, mostraron un porcentaje de reducción del 61%. Para los ratones del grupo 2 tratados 3-PACK y PMD al 6%, se obtuvo una reducción del 68,2% con respecto a los **nódulos**. Sin embargo, el tratamiento con PMD 6% redujo al 100% las úlceras en dos de los tres ratones tratados. Para el grupo 3 tratado con antiséptico-queratolítico y el grupo 4 control (tratados con el vehículo) se observó un incremento en el área de las lesiones (tanto nódulo como úlceras) superior al 100%. En el análisis por regresión múltiple de los resultados del tratamiento 3-PACK comparado respecto al control, hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los tratamientos frente al control.

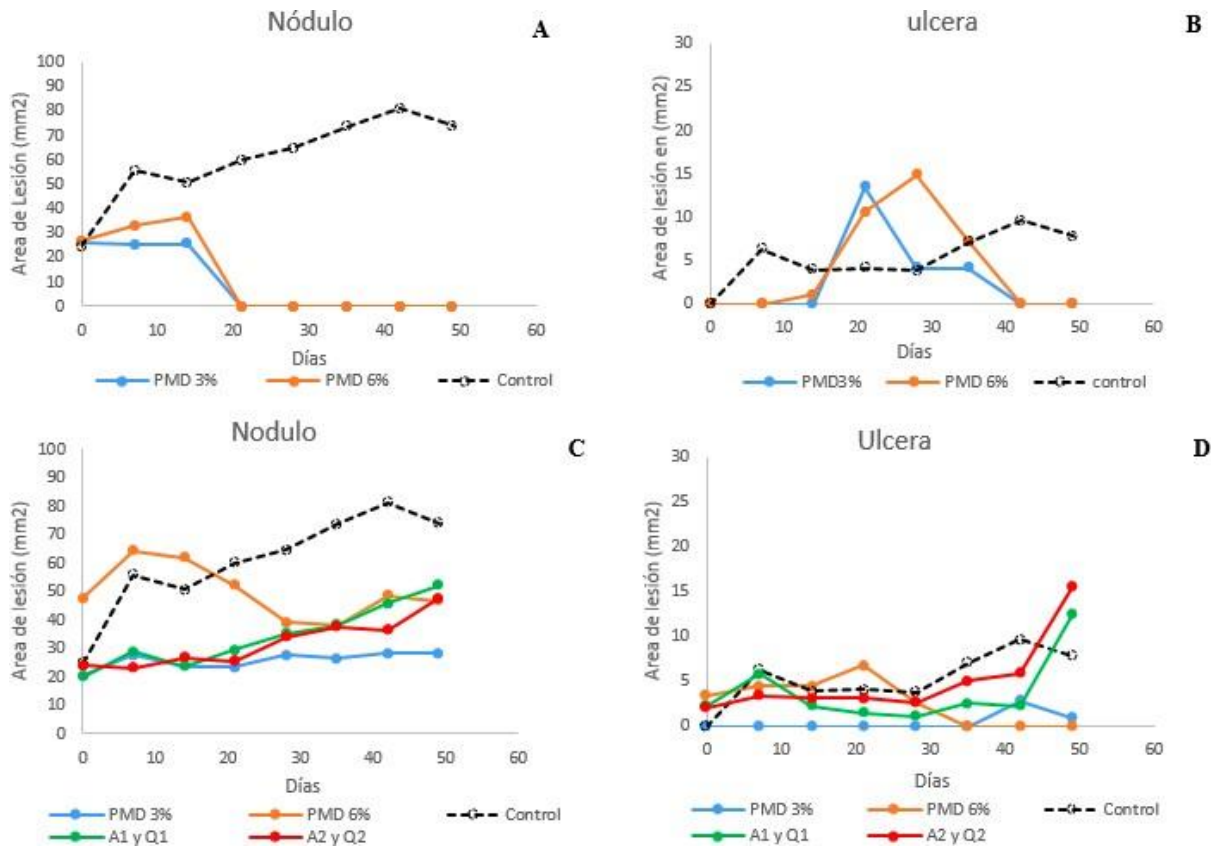


Figura 14. Eficacia clínica. Efecto del tratamiento en el tamaño de lesiones en ratones BALB/c, infectados con *L.(V.) braziliensis*. Las gráficas muestran la evolución en el área de las lesiones (nódulos y úlceras) en el periodo de tratamiento. **A.** Área del nódulo ratón (R1) grupo 1 (azul), (R1) del grupo 2 (anaranjado) y control (línea discontinua). **B.** Área de la ulcera (R1) grupo 1(azul), (R1) del grupo 2 (anaranjado) y control (línea discontinua). **C.** Área del nódulo ratón (R2) grupo 1 (azul), (R2) del grupo 2 (anaranjado), control (línea discontinua), R1 grupo 3 antiséptico y queratolítico (verde) y R2 grupo 3 antiséptico y queratolítico (rojo).

La figura 15 muestra el seguimiento fotográfico realizado de las lesiones, tomando como ejemplo los ratones R1 del Grupo 1 y 2 (los que presentaron 100% de reducción de las lesiones).

Un inconveniente que mostró este tratamiento fue la irritación que se empezó a evidenciar a los 15 días de iniciar el tratamiento. Se observó un fuerte enrojecimiento de la lesión y los ratones manifestaron signos de dolor (rechazo al aplicar el tratamiento y estrés). Estos efectos se mantuvieron, aunque en menor intensidad 15 días pt (Ver figura 15).

Este fenómeno no fue evidente en los ratones tratados con la CXD al 0,5% y gel de AS al 10%. Inicualmente se pensó que eran algunos componentes de la PMD (Pentacarinat) utilizado. Se preparó una formulación de PMD al 6% comercial (obtenida en Sigma) en idénticas condiciones, y se trató un ratón infectado. El ratón tratado también mostró signos de irritación a los 15 días de iniciar el tratamiento, teniendo que aplicar el tratamiento días de por medio para evitar cualquier molestia en los animales. Sin embargo, el tratamiento con el 3-PACK utilizando la PMD comercial fue efectivo en el ratón observándose cicatrización en el área de la lesión. Los grupos tratados con el antiséptico - queratolítico y el grupo control (tratado con los vehículos) no mostraron irritación.

4.4.2 Eficacia parasitológica. En las improntas de las lesiones del ratón tratado con el 3-PACK utilizando la crema de PMD al 3% (R1 del Grupo 1) se observaron escasos (+) amastigotes intra y extracelulares. En el R1 y R3 de los tratados con el 3-PACK y PMD al 6% no se observaron (ausentes 0) parásitos en los campos examinados (figura 16 A y B). En la tabla 12 se encuentra la información semicuantitativa de la eficacia como se describió en la metodología. En la figura 16 C el grupo tratado con el antiséptico y queratolítico muestra una moderada (++) concentración de amastigotes lo cual deja ver que no hubo cura parasitaria, el grupo control (tratado con los vehículos) muestra una abundante (+++) concentración de amastigotes intra y extracelulares (figura 16 D).

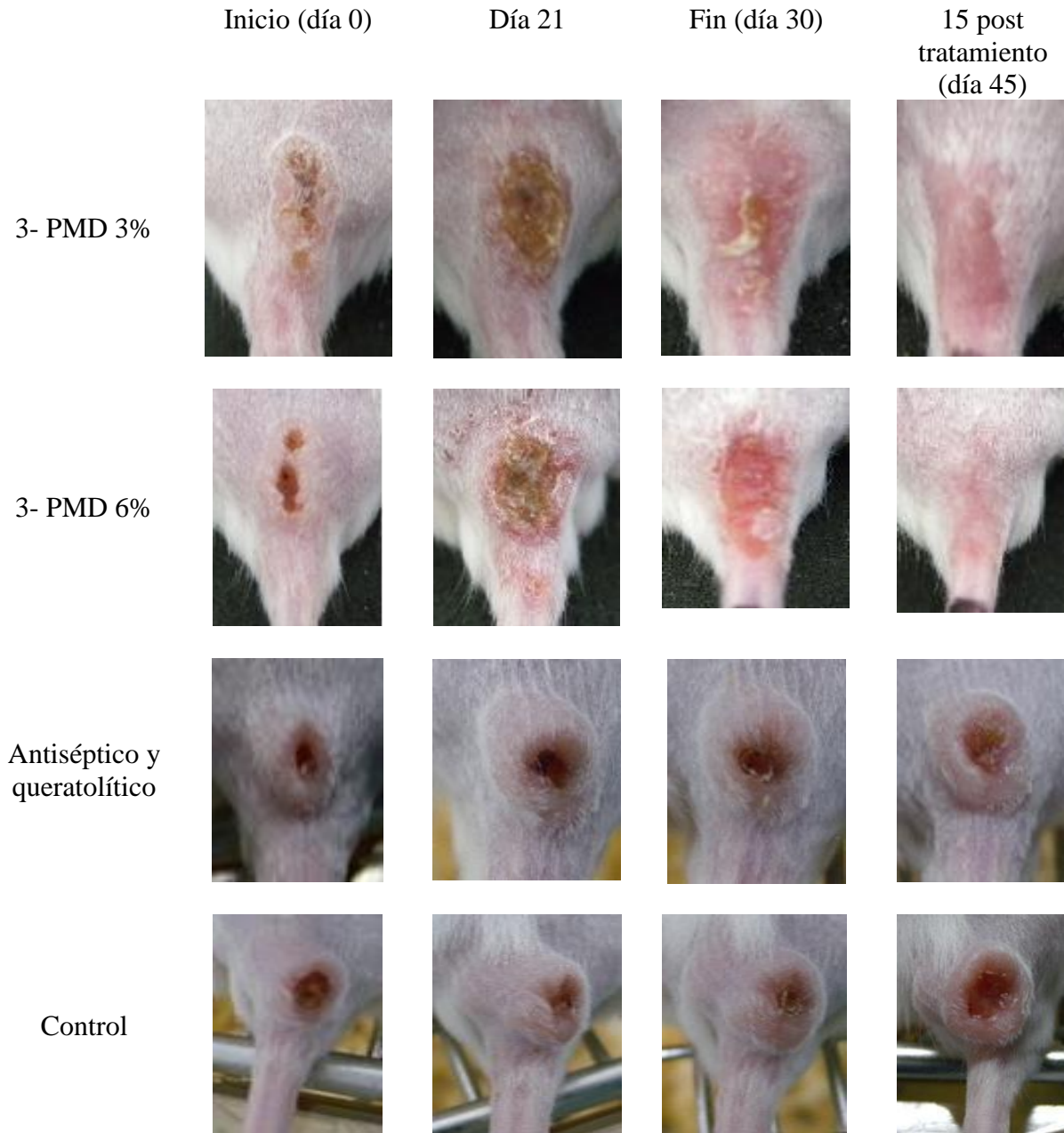


Figura 15. Eficacia clínica del 3-PACK en ratones BALB/c infectados con *L.(V.) braziliensis*. el tratamiento tópico se realizó por 30 días. La imagen muestra las lesiones de leishmaniasis al inicio, durante y 15 días después del tratamiento en cada uno de los grupos.

Tabla 12.

Análisis parasitológico de las lesiones de LC en los diferentes grupos experimentales

Grupo	3-PACK	Ratón	Presencia de parásitos			
			Ausencia (0)	Escasos (+)	Moderados (++)	Abundantes (+++)
1	PMD-3%	R1				
		R2				
2	PMD-6%	R1				
		R2				
		R3				
4	CXD y AS	R1				
		R2				
5	Control	R1				
		R2				

PMD-3%: crema de PMD 3%, PMD-6%: crema de PMD 6%, pt: posttratamiento, %R: porcentaje de reducción, mm²: milímetros cuadrados, control: tratados con el vehículo, CXD: antiséptico de clorhexidina al 0,5%, AS: gel de ácido salicílico al 10%.

La eficacia parasitológica también se determinó en biopsias de las lesiones después del tratamiento encontrándose amastigotes de *Leishmania* intra y extracelular en los grupos tratados con 3-PACK y crema de PMD 3% (amarillo) y en el grupo control (morado). Las biopsias obtenidas de las lesiones del grupo tratado con 3-PACK y PMD 6% (verde) no se observaron amastigotes (Ver figura 18).

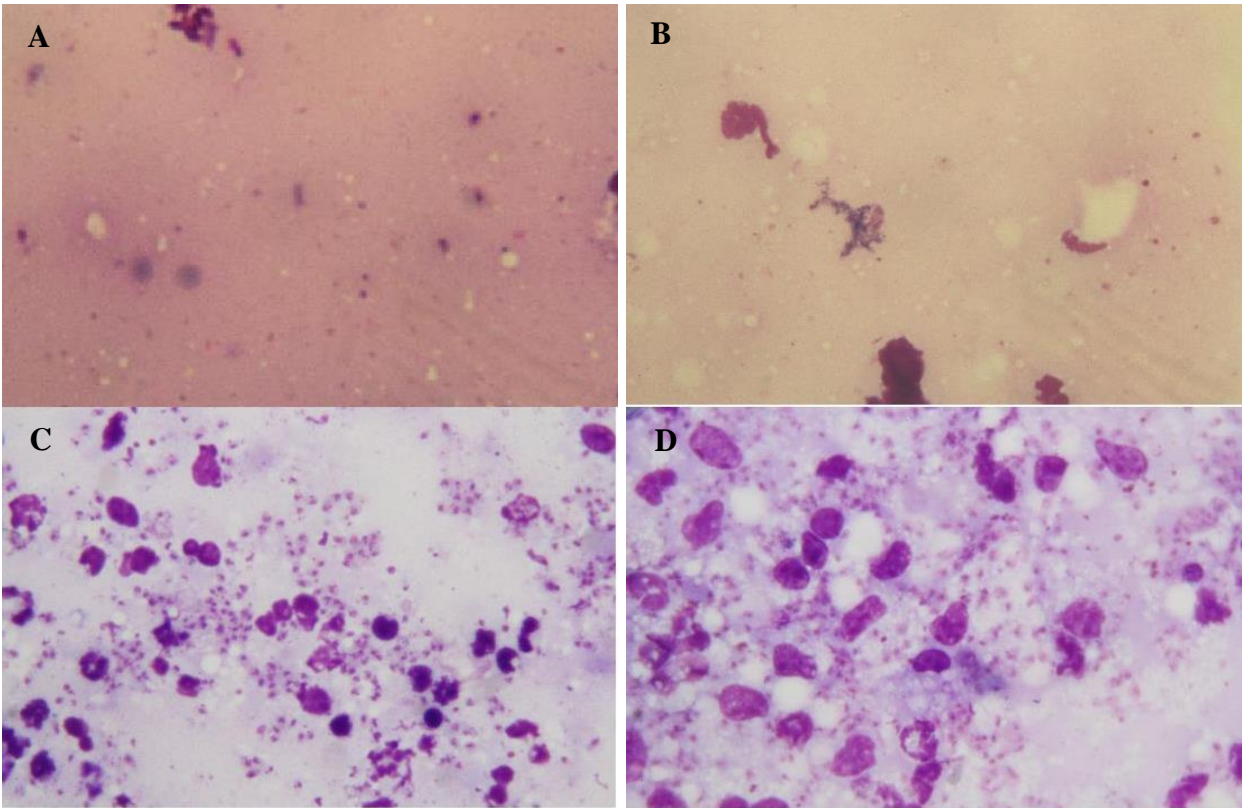
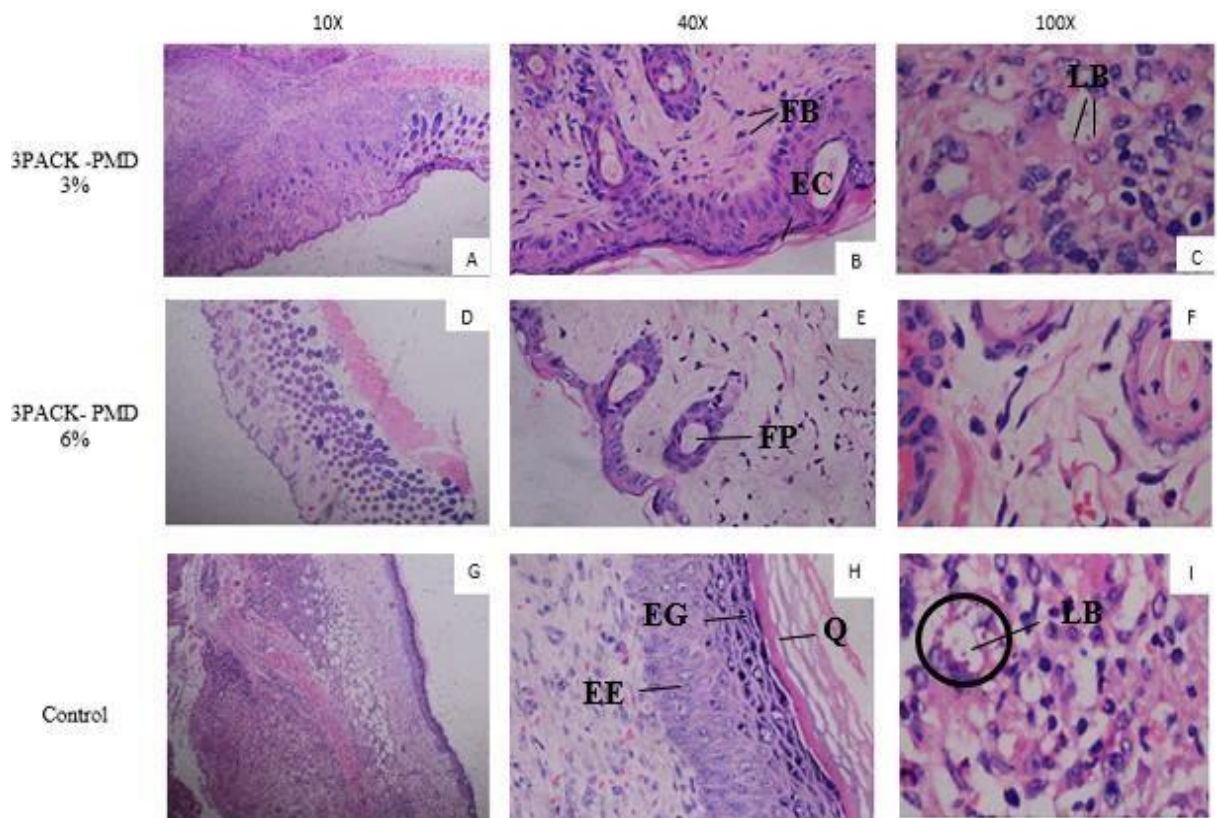


Figura 16. Fotomicrografía de frotis de lesiones de LC en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*. **A.** ratón tratado con 3-PACK y crema de PMD 3%. **B.** ratón tratado con 3-PACK y crema de PMD 6%. **C.** ratón tratado con antiséptico y queratolítico. **D.** Ratón sin tratamiento. Aumento de 400X. Las láminas fueron coloreadas con Giemsa.

4.5 Estudio histopatológico de las lesiones después del tratamiento.

En las biopsias de las lesiones de los ratones tratados con el 3-PACK y PMD al 3% y el control se puede observar el EC presentó engrosamiento debido al exceso de queratina [hiperqueratosis] (figura 18 B y H). Para las figuras 18 D, E y F que fue el grupo de ratones tratados con 3-PACK-PMD 6% tuvieron cura estética y parasitaria, las biopsias de la piel en los diferentes aumentos (10, 40 y 100 X) son muy similares a las de piel normal.

Sin embargo, para el grupo control (tratado con vehículos) se observa presencia de amastigotes en el aumento de 100X. se observó el exceso de queratina (Q) en el EC y un ensanchamiento de la epidermis especialmente en el estrato espinoso. En la figura 20 se muestra una de las biopsias de los tratamientos y las características histopatológicas producidas por cada uno de los componentes del 3-PACK, encontrándose que no presentaron (impétigo, espongiosis, paraqueratosis, exocitosis, acantosis, dilatación de capilares).



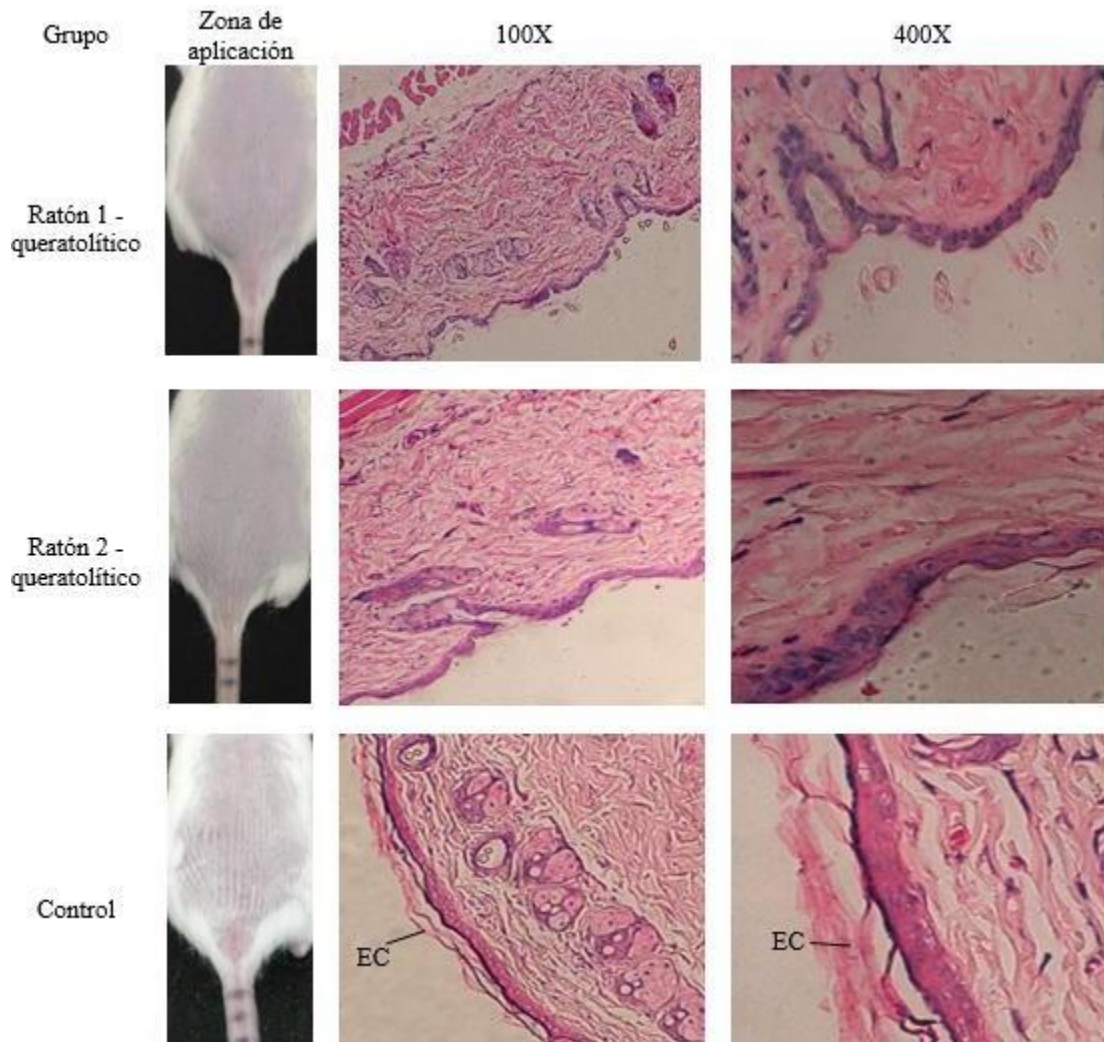
EC: estrato corneo, EE: estrato espinoso, EG: e. granuloso, FP: folículo piloso, FB: fibroblastos, Q: queratina
LB: *Leishmania braziliensis* (amastigotes).

Figura 17. Cortes histológicos de piel de ratón BALB/c infectado con *Leishmania braziliensis* tratados con el 3-PACK en aumentos de 10, 40 y 100X.

A, B, C corresponden a los cortes de la lesión de ratón tratado con PMD 3%. D, E, F corresponden a los cortes de la lesión de ratón tratado con PMD 6%. G, H, I corresponden a los cortes de la lesión del grupo control PMD 6%.

4.5.1 Eficacia del gel de ácido salicílico (AS) queratolítico. Los ratones BALB/c (3 ratones) sanos fueron tratados con el gel de AS durante 7 días. Se mantuvo un ratón sano sin tratamiento (control). Macroscópicamente no se observaron signos de irritación/corrosión, ni enrojecimientos pt (Figura 19, fotografía). La biopsia de piel sana del control mostró la estructura normal de la epidermis en donde se puede visualizar la capa superficial del EC (Ver figura 18, fila inferior). La piel de los ratones tratados con gel de AS al 10% (R1 y R2) mostró un adelgazamiento o pérdida del EC.

4.5.2 Actividad del 3-PACK en promastigotes y células THP-1. La PMD libre (en forma comercial de Pentacarinat®) fue activa en promastigotes de *L. (V.) brazilienses*. Los parásitos *in vitro* fueron 48 veces más susceptibles a la PMD libre que al fármaco contenido en las cremas al 3 y 6% respectivamente (Ver tabla 13). Como se esperaba, la PMD contenida en la crema al 6% mostró una mejor actividad a la contenida en la crema al 3%. Las formulaciones del gel de AS al 10% y la solución de CXD al 0,5% diluidos 100 veces en medio de cultivo no mostraron actividad anti-*Leishmania*. Mezclas de las cremas de PMD con el gel de AS o con la solución de CXD mantuvieron la actividad de la PMD en los parásitos, disminuyendo la susceptibilidad de estos sólo en 2 veces aproximadamente (Tabla 13). En células THP-1 utilizando concentraciones equivalentes a las aplicadas a los parásitos los compuestos no mostraron toxicidad a las concentraciones evaluadas. La toxicidad de las mezclas (crema de PMD más AS o CXD) no fue determinada dada la no toxicidad presentada por las formulaciones individuales.



EC: estrato corneo

Figura 18. Aspecto macroscópico de la piel y cortes histológicos de piel de ratones BALB/c tratados con el gel de AS al 10% por 7 días controles (sin tratamiento) 100 y 400X.

4.6 Irritación de las formulaciones en ratones.

El tratamiento con la CXD al 0,5%, las cremas de PMD al 3 y 6%, no presentaron signos de edema, eritema o alopecia al ser utilizados una sola dosis de ~20mg al hacerles seguimiento por 14 días. Sin embargo, el tratamiento con el gel de AS al 10% mostró irritación leve (grado 2) de acuerdo

con la clasificación descrita en la metodología. A partir del día 9 pt se observó un leve enrojecimiento en la piel del ratón.

Este efecto fue reversible (Ver figura 19). Microscópicamente, el análisis de las biopsias de piel de ratón BALB/c (epidermis y dermis) tratados una sola dosis de los componentes del 3-PACK no mostraron ninguna alteración histopatológica, La figura 20 muestra una biopsia representativa de un ratón tratado por cada uno de los componentes del 3-PACK, donde los parámetros estudiados impétigo, espongirosis, paraqueratosis, exocitosis, acantosis, dilatación de capilares no son evidentes [ausentes (-)].

Tabla 13.

Actividad de los componentes del 3-PACK en promastigotes de L. (V) braziliensis y células THP1

Compuesto	Promastigotes ($\mu\text{g/mL}$)		Células THP-1 ($\mu\text{g/mL}$)	
	CI ₅₀ \pm DS	CI ₉₀ \pm DS	CC ₅₀ \pm DS	CC ₉₀ \pm DS
Pentacarinat®	0,12 \pm 0,1	0,34 \pm 0,02	>300	>300
Vehículo	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
Crema 3%	4,89 \pm 0,8	15,41 \pm 3,70	> 10000	> 10000
Crema 6%	0,99 \pm 0,1	18,73 4,5	2488	> 10000
Gel de AS	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
Antiséptico	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
Crema 3% + Gel de AS	8,19 \pm 0,2	9,83 \pm 0,4	ND	ND
Crema 6% + Gel de AS	2,8 \pm 0,1	3,31 \pm 0,3	ND	ND
Crema 3% + Antiséptico	8,31 \pm 0,2	8,6 \pm 0,3	ND	ND
Crema 6% + Antiséptico	3,42 \pm 0,1	6,71 0,1	ND	ND

DS: Desviación estándar, CI₅₀: Concentración inhibitoria 50, CI₉₀: Concentración inhibitoria 90, C₅₀: Concentración citotóxica 50, CC₉₀: Concentración citotóxica 90, ND: no determinado, antiséptico: solución de CXD 0,5%.

Por otro lado, el tratamiento del 3-PACK en los ratones con LC, utilizando el protocolo estandarizado, mostró irritación (la cual fue reversible 16 días pt), con un fuerte enrojecimiento, lo cual inicialmente se pensó que podría ser por los excipientes de la PMD (Pentacarinat®) por lo que se decidió tratar un ratón con el 3-PACK y crema de PMD 6% utilizando PMD comercial (Sigma). Sin embargo, el grado de irritación y los signos de enrojecimiento fueron los mismos, lo que descarta que la irritación se debiera a los componentes del Pentacarinat. Según este resultado se pudo inferir, que la irritación es causada por pH ácido de la formulación (5,15). Este pH se trató de aumentar en la formulación. Sin embargo, la PMD se precipitó. La PMD se caracteriza por ser ácida y al aumentar el pH en la formulación pierde estabilidad y se precipita.

4.6.1 Concentración de la PMD en el hígado y bazo después del tratamiento. El experimento de recuperación de la PMD en donde concentraciones conocidas de PMD de 0,25mg/mL, fueron agregadas a lisados de hígado mostró una recuperación del 80%. La figura 21 muestra el cromatograma de recuperación PMD agregada a los lisados de hígado. Al determinar el área bajo la curva y por extrapolación en la curva de calibración, se determinó la concentración de PMD por mg de órgano fue de 20 mg/mL. La recuperación del 80% mostrada, indica que un 20% de PMD de ella puede estar quedando en pellet del órgano al realizar la extracción. El cromatograma muestra dos picos uno correspondiente al tiempo de retención de la PMD (1,76 min) y otro a 2,57 min pico que puede corresponder a los componentes del tejido.

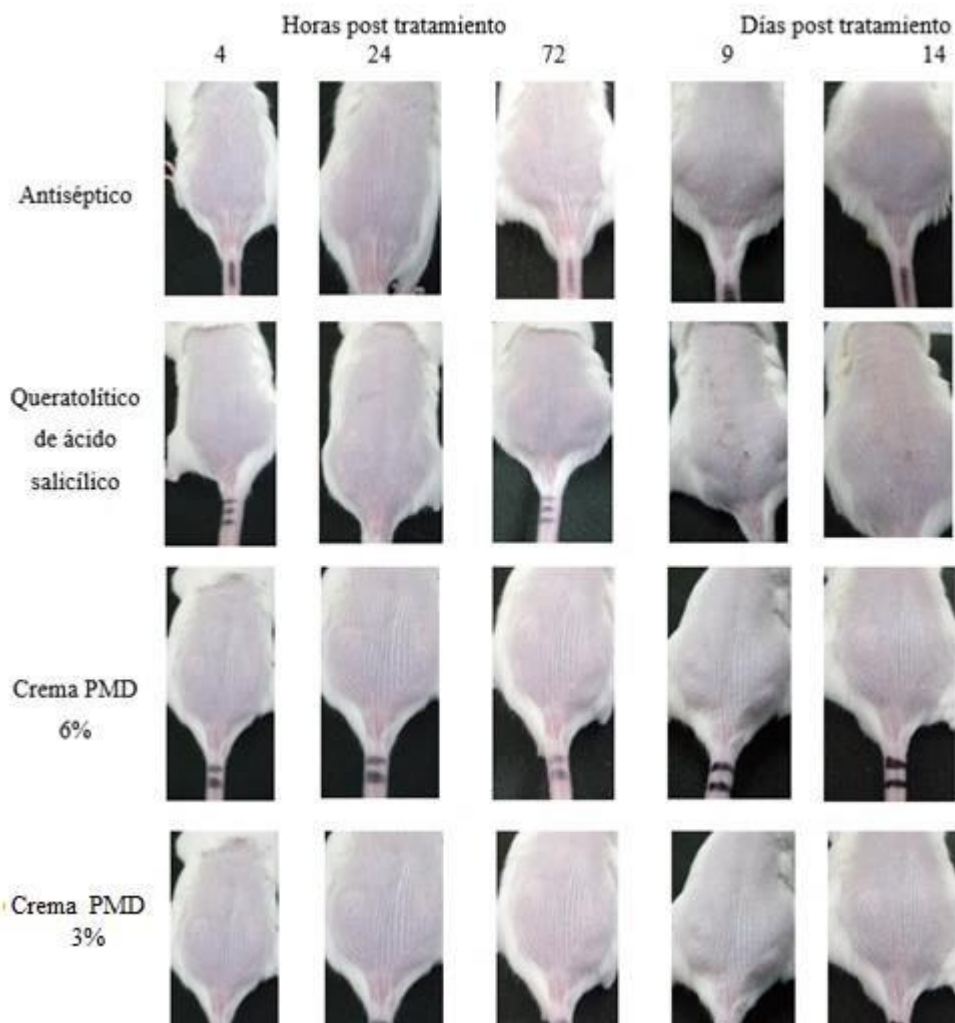
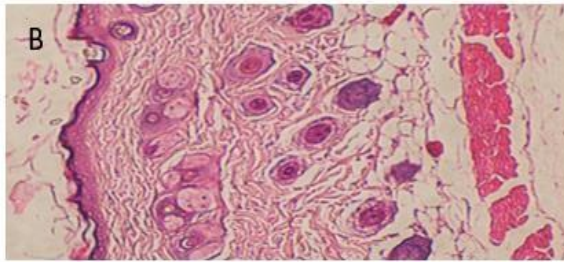
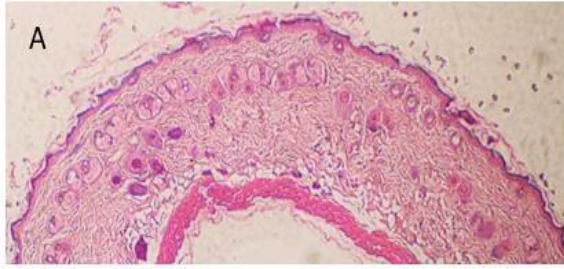


Figura 19. Efectos de irritación dérmica de los componentes del 3-PACK en ratones BALB/c sanos. La figura muestra las características macroscópicas de las lesiones después de la aplicación de una sola dosis de CXD 0,5%, de gel del AS al 10% y de la PMD 3 y 6% según lo descrito en materiales y métodos.

La concentración de PMD se determinó después del tratamiento (30 días) con el 3-PACK y crema de PMD al 3 y 6%. Macroscópicamente los órganos obtenidos no presentaron alteraciones morfológicas en cuanto a tamaño, utilizando del medidor digital Caliper®. Utilizando la metodología estandarizada (Ver detección de PMD por HPLC numeral 3.1.3) ninguno de los sobrenadantes de los órganos presentó el pico con tiempo de retención de 1, 2 min correspondiente al pico de la PMD.



Tratamiento	IM	ES	PQ	EX	AC	DC	Otros
Antiséptico	-	-	-	-	-	-	ninguno
Queratolítico	-	-	-	-	-	-	ninguno
Crema PMD 3%	-	-	-	-	-	-	ninguno
Crema PMD 6%	-	-	-	-	-	-	ninguno

IM: impétigo, ES: espongiosis, PQ: paraqueratoris, EX: exocitosis, AC: acantosis, DC: dilatación de capilares.

Figura 20. Características histológicas de piel de ratón BALB/c tratados con los componentes del 3-PACK y alteraciones histopatológicas observadas en las capas de la epidermis y dermis.

A. magnificación de 100X. **B.** magnificación de 400X. La figura muestra la biopsia de un ratón tratado con 3-PACK (crema PMD 3%).

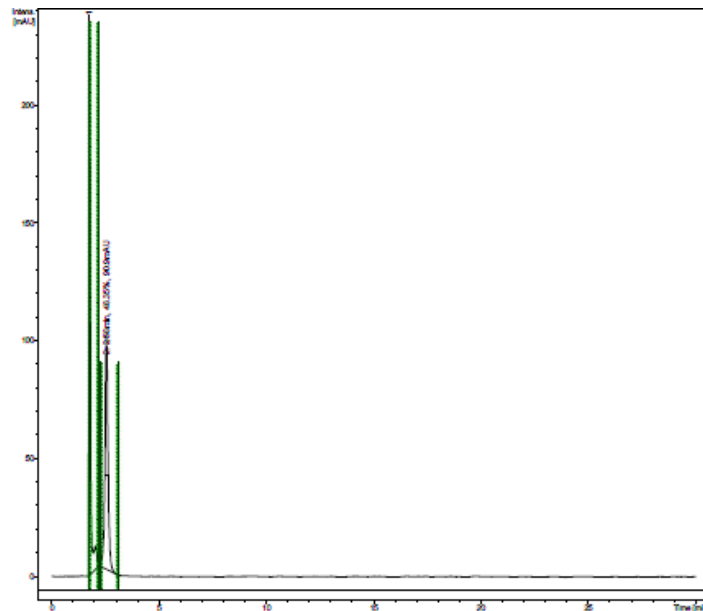


Figura 21. Cromatograma de porcentaje de recuperación PMD (0,25mg/mL)

En la figura 22A se muestra el espectro de la PMD estandarizado según referencia y en la figura 22B el espectro de una muestra representativa en hígado.

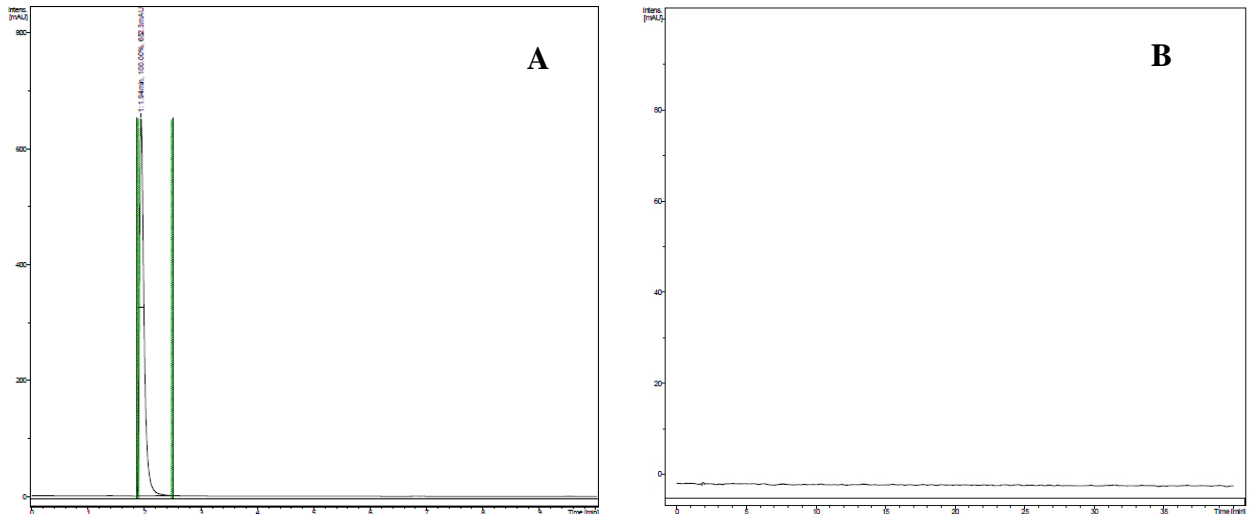


Figura 22. Cromatogramas de PMD **A.** Cromatograma de patrón de PMD (0,062mg/mL) **B.** Cromatograma de PMD en hígado

4.6.2 Alteraciones físicas y comportamiento. El tratamiento con 3-PACK con PMD al 3 y 6%, antiséptico y queratolítico y el grupo control, no indujo cambios en el peso en ninguno de los ratones (figura 23, $p = 0,072$). Durante los días de tratamiento no observaron cambios en el comportamiento. Al día 15 los ratones presentaron molestias y signos de dolor en el momento de la aplicación.

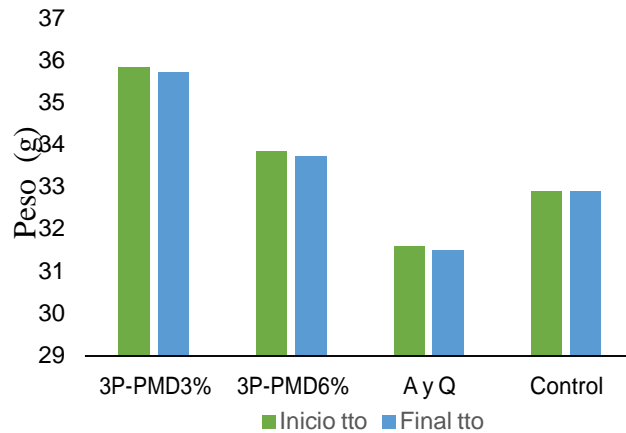


Figura 23. Peso de los ratones BALB/c al inicio y final del tratamiento.

3P-PMD3%: 3-PACK-crema PMD 3%, 3P-PMD6%: 3-PACK-crema PMD 6%, A y Q: antiséptico y queratolítico.

4.7 Análisis estadístico.

Se realizó una regresión múltiple, en el software SigmaStat versión 3.5. Se encontró que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada tratamiento respecto al control. (Figura 24) la ecuación obtenida en la regresión es:

$$\text{Area de lesión} = 42,709 + (0,0707 * \text{Día}) - (7,527 * \text{tratamiento})$$

El tratamiento es el que permitirá predecir el área de la lesión, y según la ecuación, cada uno de los tratamientos reducirá el área en $7,527 \text{ mm}^2$.

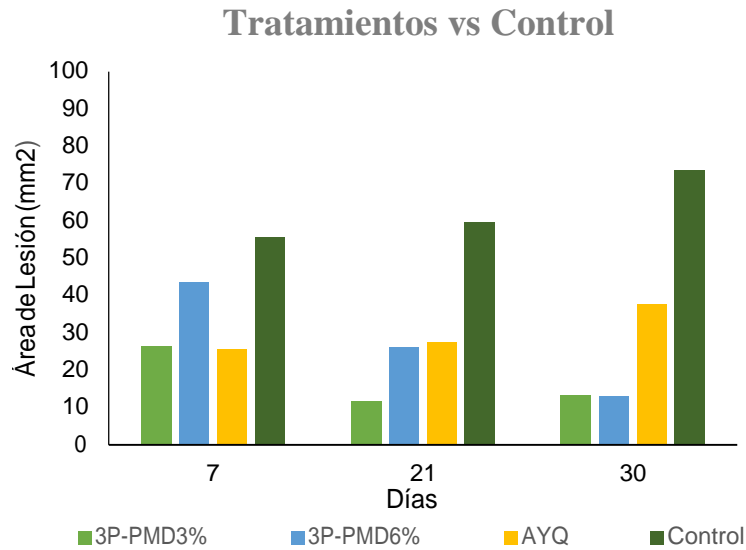


Figura 24. Tratamientos vs control. esta figura muestra los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los grupos tratados comparados frente al control. ($p < 0,05$). 3P-PMD3%: 3-PACK-crema PMD 3%, 3P-PMD6%: 3-PACK-crema PMD 6%, A y Q: antiséptico y queratolítico.

5. Discusión

Los tratamientos tópicos en LC constituyen una alternativa de tratamiento especialmente en pacientes con lesiones no diseminadas. Sin embargo, estos deben aplicarse con precaución en casos de LC producida por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* por la heterogeneidad de las lesiones que presentan y por la capacidad que tiene algunas de estas especies de diseminación. En este trabajo se diseñó un tratamiento tópico de tres componentes (3-PACK) cada uno teniendo en cuenta algunas características de las lesiones por *L. (V.) braziliensis*, como la sobre infección por microorganismos que presentan algunas lesiones ulceradas, la hiperqueratosis evidenciada principalmente en el engrosamiento del EC y costra en la parte superior de la ulcera, y la presencia del parásito de *Leishmania* los cuales en condiciones *in vitro* son altamente susceptibles a fármacos como es la PMD (Mukherjee et al. 2006).

La solución de CXD al 0,5% mostró una estabilidad en el tiempo a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) sin presentar cambios de color, olor, pH. Sin embargo, se recomienda, por ser una solución hidro-alcohólica, su almacenamiento a temperaturas entre 4 y 26°C, para evitar su evaporación y pérdidas de volumen lo cual conducirá disminución de la concentración de CXD en la formulación. La CXD al 0,5%, no mostró efectos tóxicos ni en células THP-1 ni en la piel de los ratones aplicada en una dosis, lo cual la hace segura para uso en humanos.

Sin embargo, existen algunos reportes en la literatura que muestra que la CXD utilizada en concentraciones mayores al 0,5% (iguales o mayores al 2%) como antiséptico puede inducir dermatitis y reacciones alérgicas [(Ebo et al. 1998) Sijbesma y Weegen 2011)].

Estas reacciones se manifiestan en forma de eritema o prurito (picor, que genera la necesidad de rascarse). Si bien en este trabajo no se evaluó la actividad antimicrobiana de la CXD, suspensiones líquidas de CXD al 2%, han mostrado efecto en la descolonización *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) al utilizarse en polvo al 1% y líquida al 4% (Ruiz, Pacheco, and Valderrama 2011). La CXD al 0,5% fue elegida como parte del 3-PACK en este trabajo basados en los criterios de selección de un antiséptico, su baja toxicidad, su amplio espectro de acción frente a diferentes microorganismos Gram + y Gram – como (*Escherichia coli*, *S. sanguis*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*) entre otros.

El gel de AS al 10% fue fácil de preparar y mostró una estabilidad en el tiempo en cuanto a color, olor, pH y extensibilidad aparente. Después de 45 días de preparación sus características fisicoquímicas no variaron. Su extensibilidad aparente fue clasificada como baja, de acuerdo con lo reportado en la literatura, en el comportamiento reológico de formulaciones semisólidas, una formulación semisólida tiene una alta extensibilidad aparente si no presenta resistencia al ser extendida o esparcida en la piel, a medida que esta resistencia aumenta su extensibilidad aparente disminuye, se clasifica [alta, media y baja] (Pérez, Rodríguez, Morales, Soler, y Martín, 2011). Se escogió un gel de CMC para preparar el queratolítico de AS para asegurar la solubilidad y estabilidad del AS en la formulación debido al carácter lipofílico del AS.

El gel de AS tuvo un pH ácido (6,21), sin embargo, su absorción (después de aplicación) no se vio afectada ya que se encuentra dentro del rango de pH de la piel (4,5- 6,2).

Formulaciones tópicas aplicadas a estos pH de (4,5- 6,2), permiten una mayor absorción de sus componentes en la piel por el aumento de su permeabilidad al interactuar con los lípidos del EC (Maibach 2016). El gel de AS al 10% no presentó toxicidad en células THP-1 después de tres días de tratamiento a la concentración máxima de 10 mg/mL de AS, Sin embargo, al ser utilizado tópicamente (una dosis de ~20 mg) se observaron ligeros signos de irritación en la piel de los ratones. Esta fue reversible y microscópicamente la estructura de la piel se encontraba normal. El tratamiento con gel de AS al 10% por 7 días mostró patrones histopatológicos normales (ver figura 21) exceptuando su efecto en el EC de los animales confirmando de este modo la capacidad del AS de destruir esta capa superficial de la piel. Sin embargo, tanto el pH ligeramente ácido, su irritación leve al utilizarse en una dosis y su efecto sobre el EC nos dice que debe utilizarse con algo de precaución para no inducir irritación al utilizarse por tiempos prolongados. Sin embargo, su efecto sobre el EC fue muy importante, no solo porque demostró su actividad queratolítica, sino porque evitó la formación de costras debida posiblemente a la hiperqueratosis (dato no mostrado), eliminando esta barrera para facilitar el paso de la PMD presente en las cremas. En las biopsias realizadas al final del tratamiento con el 3-PACK [30 días después de suspender el tratamiento con el gel de AS (Ver figura 18). El EC en la piel de los ratones tratados y curados fue evidenciada, observándose a tejido cicatrizante con ES (por la reepitelización) en el área.

El AS (en concentraciones mayores al 5%) es uno de los queratolíticos más utilizados en formulaciones tópicas, por su acción rápida y potente sobre el EC. Es utilizado generalmente como cremas ungüentos, cremas y soluciones (hidro alcohólicas) para el reblandecimiento (hidratación de la capa córnea), la descamación de la piel con hiperqueratosis, aumento de la penetración de la aplicación tópica de fármacos tales como corticoesteroides (Jacobi et al., 2015). Sin embargo, su uso está limitado por el riesgo de irritación local, como ardor, piel seca, descamación, descamación o dermatitis de contacto (Cordoro, 2008). También induce intoxicación sistémica crónica o aguda, con síntomas tales como dolor oral, dolor de cabeza, síntomas del sistema nervioso central, síntomas gástricos, e hiperventilación especialmente cuando es utilizado en cosmética (*peeling*). Estos síntomas pueden aparecer después del tratamiento tópico prolongado de grandes superficies corporales, es decir, formulaciones iguales o superiores al 20%, especialmente en niños menores de 12 años de edad y en pacientes con insuficiencia renal o hepática significativa (Jacobi, Mayer, y Augustin 2015).

La PMD fue el fármaco anti-*Leishmania* utilizado en el 3-PACK debido a la susceptibilidad que tienen los parásitos de *Leishmania* a este fármaco en condiciones de laboratorio (Mukherjee et al. 2006). Esta actividad también fue demostrada en este trabajo en donde concentraciones de PMD contenida en su forma comercial Pentacarinat fue activa en promastigotes de *L. (V.) brazilienses* mostrando un índice de selectividad mayor de 3 (>3). La PMD (Pentacarinat), se utiliza en leishmaniasis como tratamiento de segunda elección, en Colombia, y como primera opción en la Guyana Francesa (Roussel et al, 2006) intramuscular o parenteral.

También ha mostrado ser activa neumonía por *Neumocystis carinii* utilizándose por vía inhalatoria a través de la boca o nariz como aerosoles aplicados con un nebulizador (Respigard II) con filtro para PMD, que proporciona un tamaño de partícula inferior a 5 micras.

En el presente trabajo se evaluaron dos formulaciones en crema de PMD al 3 y 6% p/p. Se escogieron formas farmacéuticas tipo crema debido a las propiedades fisicoquímicas de la PMD [pka (12,13) y el logP (2,32)] en donde, el mejor vehículo para facilitar la entrega del compuesto era la crema, ya que si se formulaba en un ungüento este dificultaría la liberación de la PMD, y en un hidrogel no tendría buena estabilidad (se precipitaría) por la lipofilidad de la PMD. Para mejorar la permeación de la formulación, la PMD se debe encontrar en su forma no disociada, según la teoría de coeficiente de reparto. De acuerdo con valor del pka de la PMD, a un pH ácido, se encuentra en su forma no disociada, por lo tanto la crema de PMD se formuló a un pH ácido (5,15) para asegurar el paso a través de la piel de una mayor concentración de PMD. El carácter ácido de la PMD no permitió formularla a un pH neutro, porque se perdía la estabilidad (se precipitaba). Los resultados de actividad con las formulaciones de PMD al 3 y 6 % fueron muy importantes, ya que demostraron que la PMD no perdía su actividad en los componentes de la crema y que era activa en medios fisiológicos (pH 7,0). La PMD ha demostrado tener actividad *in vitro* contra *Leishmania* con actividad de $IC_{50} 0.5 \pm 0.1 \mu M$ en *L. mexicana* (Basselin, Lawrence, y Gero, 1997).

Otra ventaja de las formulaciones tipo crema es que estas son de fácil preparación y bajo costo. La concentración escogida del fármaco se hizo en base a la concentración de fármaco que contiene otra crema ensayada en LC como es la Anfoleish la cual contiene 3% de AmB (Barberis y Vélez, 2014). La PMD fue reformulada en una formulación tópica, en remplazo a las suspensiones de PMD utilizadas por las vías intramuscular o parenteral, tratando de disminuir las diversas reacciones adversas que se presentan durante y después del tratamiento como: dolor, abscesos en el lugar de la inyección, náuseas, vómitos, mareos, malestar general, mialgia, dolor de cabeza, hipotensión, síncope, hipoglucemia e hiperglucemia (Soto et al, 1993).

En las referencias buscadas, no se encontraron evidencias del uso tópico de la PMD en crema al 3 y 6%. Las características fisicoquímicas de las cremas se mantuvieron en el tiempo (hasta 3 meses de evaluación) a diferentes temperaturas lo que permite inferir que se logró un sistema muy estable, y que a un pH de 5,15 podría permitir una buena absorción dérmica del compuesto, sin embargo, y como se describe en los resultados encontrados, se observó irritación en ciertos días del tratamiento. Es necesario diseñar una formulación que permita aumentar el pH para disminuir la irritación generada en el transcurso del tratamiento (30 días) sin disminuir la permeación y estabilidad del fármaco.

La extensibilidad aparente también fue alta, presentando una viscosidad adecuada para formulaciones semisólidas a temperatura ambiente. La viscosidad de una crema (o sistema farmacéutico) es un parámetro importante de tener en cuenta dado que va influir en la estabilidad de la formulación en el tiempo (Kitagawa, Yutani, Kodani, y Teraoka, 2016).

Se tienen que viscosidades en el rango de 130,000 – 220,000 centipoise para cremas anfifílicas (A/O), mantienen una buena estabilidad, ya que a mayor viscosidad se tiene una mayor estabilidad, debido a que el sistema necesitará más energía para lograr la coalescencia de los glóbulos de la fase interna (Nagelreiter, Kratochvilova, y Valenta, 2015). Esto se encuentra por ejemplo en formulaciones conteniendo otros fármacos como acetato de frudocortisona en donde las viscosidades son entre 140,000 – 200,000 centipoise (Nagelreiter, Raffener, Geyerhofer, Klang, y Valenta, 2013).

Con respecto a la efectividad del 3-PACK en animales infectados con *L.(V.) braziliensis* se puede decir que esta dependió de la concentración de PMD contenida en las cremas y del tiempo del tratamiento que a su vez dependía del efecto irritante. En caso de irritación o signos de dolor o ansiedad en los animales, el tratamiento se suspendía por un día. El porcentaje de efectividad fue 61% en el 3-PACK crema de PMD 3% y de 68% en el 3-PACK crema de PMD 6%. Estos resultados son muy alentadores debido a la dificultad de encontrar un tratamiento efectivo para la LC por *L.(V.) braziliensis*, parásitos que tiene además capacidad de diseminarse a otros órganos e inducir leishmaniasis mucosa. Es necesario determinar cuáles son los eventos que están sucediendo al interior de las lesiones durante el tratamiento y la interacción del fármaco con el parásito. Los mecanismos de acción de la PMD están relacionados con la interferencia en la incorporación de nucleótidos en las cadenas de ARN y ADN, e inhibición de la topoisomerasa II del kinetoplasto, inactivando la transcripción de proteínas en *Leishmania* (Barberis y Vélez, 2014). Grogl y colaboradores (2015), infieren que existe una relación directamente proporcional entre el tamaño de la lesión con la carga parasitaria.

Se puede decir que para el 50% de los ratones de los grupos de los animales tratados con PMD al 3 y 6%, el 3-PACK mostró actividad, ya que al disminuir el tamaño de la lesión también se redujo la carga parasitaria (Grogl et al. 2015).

En un estudio reciente se evaluó la efectividad de formulaciones (cremas hidratantes y cremas Anhidras). Comandolli-Wyrepkowski y colaboradores, 2017, en el laboratorio de Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) evaluaron la efectividad de las cremas en hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*) infectados con *L. (L.) amazonensis* en la nariz. Estas formulaciones estaban compuestas de: 10% de ácido usnico y PMD (Pentacarinat) a una concentración del 10% y aceite de *Copaiba*. Realizaron tres grupos de tratamiento tópico, con cremas hidratantes (n=36) y otro grupo tratado con cremas anhidras (n=24) y un grupo control sin tratamiento (control negativo). Los grupos de tratamiento recibieron una dosis de 50mg/día de las cremas, durante 8 días consecutivos. Los animales permanecieron bajo observación con recolección de datos durante más de 32 días sin tratamiento y fueron sacrificados 40 días después del ensayo. El tamaño promedio de las lesiones de los grupos tratados con las cremas hidratantes mostró una reducción del 27,37% y el tamaño promedio de las lesiones para los grupos tratados con cremas anhidras demostró una reducción del 26,63%, en comparación con el grupo control en el día 40 pt. En el tratamiento realizado con las cremas hidratantes y PMD 10% se observó presencia de edema en la histopatología de las lesiones y le atribuyen este efecto a la formulación (Comandolli-wyrepkowski, Grafova, y Naiff, 2017).

Un aporte importante en este trabajo fue la implementación de una metodología para cuantificar un fármaco utilizando como herramienta el HPLC. En este trabajo se realizó la cuantificación de PMD en las formulaciones y en los tejidos (hígado y bazo). En las cremas se obtuvieron valores de concentración muy cercanos a los valores reales de las cremas al 3 y 6%. Lo cual se pudo conseguir por la linealidad del método ($R^2 = 0.9995$), la precisión y sensibilidad de la técnica. La técnica analítica HPLC se ha convertido en una herramienta esencial en el descubrimiento, desarrollo y producción de fármacos. Debido a los avances tecnológicos como: HPLC automatizada, HPLC-MS (espectrometría de masas), HPLC-NMR (resonancia magnética nuclear), métodos de purificación de alto rendimiento y desarrollo de métodos automatizados, que han permitido mejorar los tiempos, la eficiencia y la sensibilidad de la técnica.

En el análisis de la distribución de PMD en hígado y bazo de los ratones tratados con el 3-PACK por HPLC, no encontró concentraciones detectables de PMD, infiriendo que la PMD aplicada tópicamente o no se acumula en esos órganos o por ser un tratamiento tópico las concentraciones de PMD son bajas y metabolizadas rápidamente. Aunque el estudio realizado en este trabajo no analizó la farmacocinética y distribución de la PMD en los diversos órganos, otros estudios han demostrado que los órganos con las concentraciones acumuladas más altas de PMD, después del tratamiento IV, fueron riñón, hígado, bazo y las glándulas suprarrenales (Kip et al. 2017). Después de 2,5 horas de la infusión IV, la PMD fue absorbida rápidamente por el hígado encontrándose el 65% del total de fármaco inyectado. Parece que la PMD se excreta en la bilis pero que su liberación del hígado es lenta ya que después de 24 h de su infusión IV, el 99% de la PMD absorbida aun permanecida confinada en este órgano (Kip et al. 2017).

Lograr cuantificar la PMD libre o en una forma farmacéutica tipo crema fue un avance importante en la investigación Berger y colaboradores (1992), describieron diferentes metodologías para analizar la PMD encontrando que la técnica de HPLC, en comparación con la técnica de fluorescencia tiene un mayor rendimiento, es una técnica más rápida y más sensible, para los análisis de rutina en clínica y que no es recomendable hacer este análisis por la fluorescencia, ya que la PMD es muy poco fluorescente y el límite de detección es bajo (Berger et al. 1992). Uno de los principales problemas para la cuantificación de la PMD por HPLC es su baja solubilidad en solventes orgánica. Para evitar esto en los primeros experimentos de estandarización de la técnica se adicionaron agentes de pares iónicos como heptano sulfonato y trietilamina a la fase móvil para prevenir la unión irreversible a la columna (Road, 1985).

El esquema de tratamiento diseñado en este trabajo es novedoso, actualmente no se encuentra ningún tratamiento (conocido en las referencias) tópico para leishmaniasis cutánea que involucre los tres componentes del 3-PACK (antiséptico-queratolítico-crema de PMD). Los tratamientos tópicos en LC hasta el momento han sido liposomas, nanoemulsiones, ungüentos, geles o cremas, con diferente principio activo como anfotericina (Barberis y Vélez 2014), paromomicina (Grogl et al. 2015), miconazol (Agarwal and Katare 2002), miltefosina (Bocxlaer et al. 2016), entre otros, de los cuales se han realizado ensayos *in vivo* en modelo murino y algunos como la crema de AmB (Anfoleish) ya se encuentran en ensayos clínicos.

6. Conclusiones

- Se diseñó un tratamiento 3-PACK compuesto de antiséptico (CXD 0,5%), queratolítico (gel de AS al 10%), Estable, con cremas de PMD al 3 y 6% que mantenían la actividad anti-*Leishmania in vitro* igual que el medicamento de referencia (Pentacarinat).
- En este trabajo se demostró la eficacia del gel queratolítico de AS al 10%, ya que disminuyó el grosor EC lo que permitió eliminar esta barrera, para potencialmente incrementar el paso del principio activo (PMD) presente en las cremas.
- El tratamiento con el 3-PACK con PMD al 6% mostró una efectividad clínica del 68% y parasitológica del 100%, demostrándose su alto potencial terapéutico frente a lesiones crónicas, nodulares y ulceradas, de *L. (V.) braziliensis*.
- Dosis únicas de los componentes del 3-PACK no fueron (o leve en el caso del AS) para la piel, sin embargo, el tratamiento con un mayor número de dosis en los animales infectados mostró, irritación y algo de molestia en los animales en el momento de aplicación. Este efecto fue reversible.
- Al realizar el ensayo de distribución en hígado y bazo, no se encontraron trazas de PMD en ninguno de los dos órganos, lo que indica que la PMD no se está acumulando o que por ser un tratamiento tópico no alcanza a llegar al torrente sanguíneo.

- El tratamiento anti-*Leishmania* 3-PACK, es un tratamiento innovador, por varios aspectos, primero, no se han registrado hasta el momento tratamientos en LC con tres componentes como el 3-PACK, segundo, el enfoque terapéutico de los tratamientos disponibles hasta ahora ha sido solamente eliminar el parásito y no han tenido presente los otros factores que influyen en la lesión, el 3-PACK se enfoca en varios frentes o variables como las bacterias presentes en las lesiones de LC, la hiperqueratosis, una de las principales barreras de los tratamientos tópicos en LC y el parásito. Tercero, es el primer tratamiento con cremas de PMD en ratones BALB/c infectados con *L. (V.) braziliensis*. Al momento de iniciar este estudio (enero 2016) no se había reportado ningún tratamiento tópico con PMD.
- El tratamiento anti- *Leishmania* con el 3-PACK es una buena alternativa para la LC, pero es necesario continuar con la investigación, realizando más ensayos y mejorando la formulación para un obtener una tasa de cura mayor y una disminución en la irritación.

Referencias Bibliográficas

- Agarwal, R., Katare, O. (2002). Preparation and in vitro evaluation of miconazole nitrate- loaded topical liposomes. *Pharmaceutical Technology*, 49–60.
- Aguiar, M., Silva, D., Nunan, F., Aguiar, E., Fernandes, A., Ferreira, L. (2009). Combined Topical Paromomycin and Oral Miltefosine Treatment of Mice Experimentally Infected with *L. (L.) Major* Leads to Reduction in Both Lesion Size and Systemic Parasite Burdens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 (6), 1234–40.
- Akbari, M., Oryan, A. (2017). Application of Nanotechnology in Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica* 172, 86–90.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, K., Votýpka, J., Marty, P. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *Neglected Tropical Diseases*.1–40.
- Akhtar, N., Khan, A., Muhammad, S., Ahmed, M., Khan, H., Rasool, F., Saeed, T. (2012). Formulation and Characterization of a Cream Containing Terminalia Chebula Extract. *Forschende Komplementarmedizin* 19 (1), 20–25.
- Vila, J. (2001). Tecnología farmacéutica volumen II; formas farmacéuticas. Madrid, España: Editorial Síntesis.
- Allison, R., y Sibata, C., (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2), 61-75.
- Al-Suwayeh, S., Taha, E., Al-Qahtani, F., Ahmed, M., Badran, M. (2014). Evaluation of skin permeation and analgesic activity effects of carbopol lornoxicam topical gels containing penetration enhancer. *The Scientific World Journal*, 1-9.

- Alvar, J., Bern, C., Desjeux, P., Cano, J. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS ONE* 7(5).
- Ameen, M. (2010). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management, *Royal Free Hospital, Dermatology Department, London, NW3 2QG, UK*.
- Araguas, C., Garcia T., Jes, T., Vicu, Z. (2014). *Tratamiento queratodermias palmoplantares*. (Trabajo final de grado de Podología), Universidad de Barcelona, España.
- Arevalo, I., Tulliano, G., Quispe, A., Spaeth, G., Matlashewski, G., Llanos-cuentas, A., Pollack, H. (2007). Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 44, 1549-54.
- Arif, T. (2015). Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 8, 455-61.
- Armijos, R., Weigel, M., Calvopina, M., Mancheno, M., Rodriguez, A. (2004). Comparison of the Effectiveness of Two Topical Paromomycin Treatments versus Meglumine Antimoniate for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Acta Tropica* 91 (2), 153–60.
- Arredondo, A. (2009). Hidrogeles potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista de Ingeniería Biomédica* 3 (5), 83-94.
- Badawi, A., Sakran, W., Ramadan, M., El-Mancy, S. (2012). Improvement of the Microbiological Activity of Topical Ketoconazole Using Microemulsion Systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 22 (6), 473–78.
- Barberis, F. y Vélez, I. (2014). Opciones terapéuticas para el manejo de la leishmaniasis Cutánea Americana treatment options for american cutaneous leishmaniasis. *Rev Panam Infectol* 16(2), 113-123.

- Basselin, M., Lawrence, F. y Gero, M. (1997). Altered transport properties of pentamidine-resistant leishmania donovani and L. amazonensis promastigotes. *Parasitol Res* 83, 413–418.
- Berger, B., Henry, L., Hall, J. y Tidwell, R. (1992). Problems and pitfalls in the assay of pentamidine implications for clinical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36 (9): 1825–39.
- Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S. y Croft, S. (2016). Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB / c mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 68, 862–72.
- Botello, A. y Garcia, M. (2004): Manual de Farmacia, Temario General Módulo II, 181-202.
- Caldeira, L., Fernandes, F., Ferreira, D., Frézard, F., Crocco, L. y Miranda, L. (2015). Nanoemulsions loaded with amphotericin B: a new approach for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 70, 125–31.
- Carneiro, G., Gontijo, M., Fernandes, A. y Anto, L. (2012). Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin. Drug Deliv* 9(9),1083-97.
- Casamada, N., Ibáñez, N., Rueda, J., Torra, J. (2002). Guía práctica de la utilización de antisépticos en el cuidado de heridas. *Laboratorios SALVAT*, 1.
- Comandolli-wyrepkowski, C., Grafova, I. y De Farias Naiff, M. (2017). Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. *Acta Amazonica* 47 (1), 39–46.
- Cota, F., Lanza, E. y Rabello, A. (2017). Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: a systematic review and meta- analysis. *PLoS ONE* 12(10), 58–73.
- de Mattos, C., Argenta, D., de Lima Melchiades, G., Sechini, M., Tonini, M., Hoehr, M., Weber, T. (2015). Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leshmaniasis: optimization using a full factorial design. *International Journal of Nanomedicine* 10: 5529–42.

- Diken, A., Hanedan, O., Ecevit, A. y Erol, E. (2016). Pentamidine in pneumocystis jirovecii prophylaxis in heart transplant recipients. *World J Transplant* 6 (1), 193–99.
- Doncker, P. (1997). Prolonged effects of antidandruff shampoos time to recurrence of *Malassezia ovalis* colonization of skin. *International Journal of Cosmetic Science* 19, 111–117.
- Dorlo, T., Rijal, S., Ostyn, B., De Vries, P., Singh, R., Bhattarai, N., Uranw, S., et al. (2018). Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. *The Journal of Infectious Diseases* 210, 146-53.
- Dujardin, J., Llanos-cuentas, A., Valencia, C. y Are, J. (2012). Prediction score for antimony treatment failure in patients with ulcerative leishmaniasis lesions. *PLoS Negl Trop Dis* 6(6).
- Ebo, D., Stevens, W., Bridts, C. y Matthieu, L. (1998). Contact allergic dermatitis and life-threatening anaphylaxis to chlorhexidine. *J Allergy Clin Immunol* 101,128-9.
- Echeverry, M., Milena, S. y Trujillo, G. (2005). Guía de atención de la leishmaniasis. *Ministerio de la Protección Social. Programa de Apoyo a la Reforma de Salud/PARS 21*, 176-219.
- Eichenberger, A., Buechi, A., Neumayr, A., Hatz, C., Rauch, A., Huguenot, M., Diamantis-karamitopoulou, E. y Staehelin, C. (2017). A Severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin b treatment failure in an immunosuppressed patient 15 year after exposure. *BMC Infectious Diseases* 17(81), 1–5.
- El-faham, M., Eissa, M., Igetei, J., Amer, E., Liddell, S., El-azzouni, M. y Doenhoff, M. (2017). Treatment of schistosoma mansoni with miltefosine in vitro enhances serological recognition of defined worm surface antigens. *PLoS Negl Trop Dis* 11(8), 1–26.
- El-On, J., Halevy, S., Grunwald, H. y Weinrauch, L. (1992). Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 27(2), 227-231.
- Enk, C., Nasereddin, A., Alper, R., Jaffe, C., Wulf, H. (2014). Cutaneous leishmaniasis responds to daylight-activated photodynamic therapy: proof-of-concept for a novel self-administered therapeutic modality. *Journal of Dermatological Treatment* 14, 26–29.

- Fluhr, J., Dickel, H., Kuss, O., Weyher, I., Diepgen, T. L. y Berardesca, E. (2002). Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *British Journal of Dermatology*, 146(5), 770-776.
- Frank, D., Wysocki, A., Specht-glick, D., Rooney, A., Feldman, A., Amand, A. y Trent, J. D. (2009). Microbial diversity in chronic open wounds, *Wound Repair and Regeneration* 17, 163-172.
- García, D. (2005). Leishmaniasis cutánea. Servicio de Dermatología. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. España. 96(1), 1-24.
- Goncalves, S., Fernandes, P., Souza, R., Cardoso, J., De Oliveira-Silva, F., Maciel, F., Ferreira, L. (2005). Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica* 93(2), 161-167.
- Gonzalez, Laura., Fernández, O. y McMahon-pratt, D. (2015). Ex vivo host and parasite response to antileishmanial drugs and immunomodulators. *PLoS Negl Trop Dis* 9(5), 1-19.
- Goto, Hiro. y Lauletta, J. (2012). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26 (2), 293-307.
- Graves, M. y Mason, T., (2008). Transmission of visible and ultraviolet light through charge-stabilized nanoemulsions. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(33), 12669-76.
- Grice, E., y Segre, J. (2011). The skin microbiome. *Nature Publishing Group* 9(4), 244-53.
- Grogl, Max., Schuster, B., Berman, J., Grogi, M., Schuster, B. y Berman, J. (2015). Successful Topical Treatment of Murine Cutaneous Leishmaniasis with a Combination of Paromomycin (Aminosidine) and Gentamicin. *The American Society of Parasitologists* 85 (2), 354-59.
- Güngör, Sevgi., Erdal, M. y Aksu, B. (2013). New formulation strategies in topical antifungal therapy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 03(01), 56-65.

- Hossein, M., Parizi, D. y Karvar, M. (2015). The topical treatment of anthroponotic cutaneous leishmaniasis with the tincture of thioxolone plus benzoxonium chloride (Thio-Ben) along with Cryotherapy: A Single-Blind Randomized Clinical Trial. *Dermatologic Therapy* 28, 140–46.
- Hutchinson, J. y McGuckin, M. (1990). Occlusive dressings: A microbiologic and clinical review. *American Journal of Infection Control*, 18(4), 257-268.
- Jacobi, A., Mayer, A. y Augustin, M. (2015). Keratolytics and emollients and their role in the therapy of psoriasis: a systematic review. *Dermatology and Therapy* 5(1), 1-18.
- Jamil, K., Haque, R., Rahman, R., Faiz, M., Toha, A., Dhalaria, P., Kochhar, S., Desjeux, P. y Bhuiyan, M. (2015). Effectiveness study of paromomycin im injection (pmim) for the treatment of visceral leishmaniasis (vl) in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis* 9(10).
- Jarak, I., Marjanovi, M., Piantanida, I., Kralj, M. y Karminski-zamola, G. (2011). European Journal of Medicinal Chemistry Novel Pentamidine Derivatives: Synthesis, Anti-Tumor Properties and Polynucleotide-Binding Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46.
- Jung, H-J., Suh, S-i., Suh, M-h., Baek, W-k. y Park, J-w. (2011). Pentamidine reduces expression of hypoxia-inducible factor-1 a in du145 and mda- mb-231 cancer cells. *Cancer Letters* 303 (1), 39–46.
- Kaur, G. y Rajput, B. (2014). Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. *Journal of Parasitology Research*.
- Kip, A., Schellens, J., Beijnen, J. y Dorlo, T. (2017). Clinical pharmacokinetics of systemically administered antileishmanial drugs. *Clinical Pharmacokinetics*. doi 10.1007/s40262-017-0570-0.
- Kitagawa, S., Yutani, R., Kodani, R-i. y Teraoka, R. (2016). Results in pharma sciences differences in the rheological properties and mixing compatibility with heparinoid cream of brand name and generic steroidal ointments: the effects of their surfactants. *Results in Pharma Sciences* 6, 7–14.

- Khurana, S., Jain, NK., Bedi, PM. (2013). Nanoemulsion based gel for transdermal delivery of meloxicam: physico-chemical, mechanistic investigation. *Life Sci* 92(6-7), 383-92.
- Larbi, EB., al-Khawajah, A., al-Gindan, Y., Jain, S., Abahusain, A., al-Zayer, A. (1995). A randomized, double-blind, clinical trial of topical clotrimazole versus miconazole for treatment of cutaneous leishmaniasis in the eastern province of Saudi Arabia. *Am J Trop Med Hyg* 52(2),166-8.
- Layegh, P., Pezeshkpoor, F., Soruri, AH., Naviafar, P., Moghiman, T. (2009). Efficacy of cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate (glucantime) for treatment of cutaneous leishmaniasis in children. *Am J Trop Med Hyg* 80(2), 172-5.
- Lecoeur, H., Buffet, P., Morizot, G., Goyard, S., Guigon, G., Milon, G. y Lang, T. (2007). Optimization of topical therapy for *Leishmania major* localized cutaneous leishmaniasis using a reliable C57BL/6 model. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 1(2).
- López, L., Robayo, M., Vargas, M. Y Vélez, I. (2012). Thermotherapy: An Alternative for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *Trials* 13(58), 1–7.
- Maes, L., Andreia, R., Cos, P. y Yardley, V. (2013). Classical Versus Novel Treatment Regimens. *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, 301-319.
- Maibach, H. (2016). Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. San Francisco, USA: Springer-Verlag.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G. y Cascio, A. (2014). Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 12(6).
- Marcano, M. y González, F. (2006). Barrera Cutánea. *Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Caracas. Caracas, Venezuela.*

- Martínez, L. (2013). Guía de antisépticos y desinfectantes. *Instituto Nacional de Gestión Sanitaria*. Madrid, España.
- Mauricio, I., Scho, G., Dujardin, JC., Soteriadou, K., Dedet, JP., Haralambous, C., Pratlong, F., (2007). Evolutionary and geographical history of the leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(22), 9375–80.
- Mayba, J. y Gooderham, M. (2017). A guide to topical vehicle formulations. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 00(0).
- Mcgwire, B. y Satoskar, A. (2013). Review Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med* 107, 7–14.
- Minodier, P. y Parola, P. (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease* 5(3), 150–58.
- Mitropoulos, P., Konidas, P. y Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*. doi:10.1016/j.jaad.2009.06.088.
- Momeni, A. y Aminjavaheri, M. (2003). Treatment of cutaneous leishmaniasis with ketoconazole cream. *Journal of Dermatological Treatment* 14, 26–29
- Mondal, D., Alvar, J., Matlashewski, G. y Arana, B. (2014). Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin b for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in bangladesh : a feasibility study. *The Lancet Global Health* 2 (1).
- Monge-Maillo, B., Lopez, R. (2013). Therapeutic options for Old World cutaneous leishmaniasis and New World cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs* 73, 1889–1920.

- Mosleh, IM., Geith, E., Natsheh, L., et al. (2008). Antileishmanial chemotherapy can have adverse effects and may fail to cure patients with cutaneous leishmaniasis (CL). *J Am Acad Dermatol* 58, 617-624.
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P., Sahani, M., Peter, M. y Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 145,1–10.
- Nagelreiter, C., Kratochvilova, E. y Valenta, C. (2015). Dilution of semi-solid creams: influence of various production parameters on rheological properties and skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics* 478(2), 429–38.
- Nagelreiter, C., Raffener, S., Geyerhofer, C., Klang, V. y Valenta, C. (2013). Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisone acetate. *International Journal of Pharmaceutics* 448(1).
- Negrão, R. Rocha, J. y Giorgio, E. (2017). Murine cutaneous leishmaniasis investigated by MALDI mass spectrometry imaging. *Molecular BioSystems*. doi:10.1039/C7MB00411G.
- No, JH. (2016). Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Tropica* 155, 113–23. doi:10.1016/j.actatropica.2015.12.016.
- Obonaga, R., Fernández, O., Rubiano, L., Castro, M., Barrera, M., Gomez, M. (2014). Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by leishmania subgenus viannia species. *Antimicrob. Agents Chemother* 58(1), 144.
- Oliveira, M., Calixto, G., Graminha, M., Cerecetto, H., González, M. y Chorilli, M. (2015). Performance of fluconazole-loaded microemulsions for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *BioMed Research International*. Doi: 10.1155/2015/396894
- Oliveira de Siqueira, LB., da Silva Cardoso, V., Rodrigues, IA., Vazquez-Villa, AL., Dos Santos, EP., da Costa, R., Dos Santos, C., Vermelho, AB, Junior, ER. (2017). Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. *Nanotechnology* 28(6), 065-101. doi: 10.1088/1361-6528/28/6/065101.

- Olliaro, P., Vaillant, M., Arana, B., Grogl, M., Modabber, F., Magill, A., Lapujade, O., Buffet, P. y Alvar, J. (2013). Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3).
- Pace, D. 2014. Leishmaniasis. *Journal of Infection* 69, S10 - S18.
- Pachioni-vasconcelos, J., Gomes, S., Lourenço, F., Cerize, N. (2017). Development and characterization of miltefosine-loaded polymeric micelles for cancer treatment. *Materials Science & Engineering C*. doi:10.1016/j.msec.2017.07.040.
- Pan, M., Heinecke, G., Bernardo, S., Tsui, C., Levitt, J. (2013). Urea: a comprehensive review of the clinical literature. *Dermatol Online J* 19(11), 203-92.
- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M., Kelleher, D. y Reynolds, J. (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 8(1), 14-29. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>
- Pérez, T., Rodríguez, Y., Morales, I., Soler, D. y Martín, N. (2011). Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir del extracto acuoso de rhizophora mangle L. rheological behavior and extensibility of a semi-solid formulation of the aqueous extract of rhizophora mangle L. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 26(2), 75-79.
- Pinto, A., Rodriguez, J., Serrano, X. y Hernandez, B. (2017). Mechanism 1 of action of miltefosine on leishmania donovani involves the impairment of 2 acidocalcisomes function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane ca²⁺ 3 channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01614-17
- Priscilla, E., Gadelha, N., De Oliveira, J., Talhari, C., Moreira, R., Ourives, L., Gontijo, B. y Chrusciak, A. (2015). Patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. *An Bras Dermatol* 90(6), 807-13.
- Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P. y Loiseau, P. (2007). Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1425–30. doi:10.1128/AAC.01123-06.

- Rakotomanga, M., Loiseau, P., Xi, P., F- Cha. (2005). Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2677–86. doi:10.1128/AAC.49.7.2677.
- Riviere, J. y Papich, M. (2001). Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, 175-203.
- Roberts, C., Mcleod, R., Rice, D., Ginger, M., Chance, M. y Goad, J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular & Biochemical Parasitology* 126, 129–142.
- Roberts, W., Berman, J. y Rainey, P. (1995). In Vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1234–39.
- Robledo, S., Puerta, J., Muñoz, D., Guardo, M. y Vélez, I. (2006). Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania* (V.) panamensis en Colombia. *Biomédica*, 26(1).
- Rodríguez, P., Brizuela, A., Muñoz, A., Lara, A. y Sáenz, A. (2011). Queratinización: fisiología cutánea. *Servicio de Dermatología. Hospital Universitario de Caracas, Venezuela* 49(2), 7-11.
- Roma, J. y Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1327–32. doi:10.1128/AAC.01415-06.
- Rosen, J., Landriscina, A., Friedman, A. (2014). Principles and approaches for optimizing therapy with unique topical vehicles. *J Drugs Dermatol* 13(12),1431-5.
- Rotureau, B. y Clyti, E. (2006). Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg / kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in french Guiana. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 100(4), 307–14.
- Roychoudhury, J. y Nahid A. (2008). Sodium stibogluconate: therapeutic use in the management of leishmaniasis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 45,16–22.

- Ruiz, S., Robinson, P. y Valderrama, S. (2011). Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Infectio 15(2)*, 98-107.
- Saboya, M., Castellanos, L., Sanchez, M. y De Fa, F. (2016). Exploring spatial and temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis 10(11)*. doi:10.1371/journal.pntd.0005086.
- Sadeghian, G., Ziaei, H., Bidabadi, L., Baghbaderani, A. (2011). Decreased effect of glucantime in cutaneous leishmaniasis complicated with secondary bacterial infection. *Indian J Dermatol 56(1)*, 37-9.
- Sánchez, L. y Sáenz, E. (2005). antisépticos y desinfectantes, *Dermatología Peruana 15(2)*, 82-103.
- Shakeel, F., Haq, S., y Alanazi, F. (2012). Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. *Expert Opin. Drug Deliv 9(8)*, 953-74.
- Sijbesma, T. y Van Der Weegen, W. (2011). Severe anaphylactic reaction to chlorhexidine during total hip arthroplasty surgery. doi:10.5301/HIP.2011.8644.
- Singh, S. y Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother 10*, 307-15. doi:10.1007/s10156-004-0348-9.
- Sosa, N., Capita, Z., Nieto, J., Nieto, M., Paz, H., Spadafora, C., Grogl, M. (2013). Randomized, Double-Blinded, Phase 2 Trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg 89(3)*, 557-63.
- Soto, J., Arana, B., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J., Diaz, A. y Luz, M. (2016). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Oxford University Press 19*.
- Soto, J., Arana, A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J., Diaz, A. Luz, M. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases 38(9)*, 1266-72.

- Soto-Mancipe, J., Grogl, M. y Berman, J. (1993). Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in colombia. *Clinical Infectious Diseases* 16(3),417–25.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Argawal, D., Rai, M. y Murray, H. (2010). Single-Dose liposomal amphotericin b for visceral leishmaniasis in India. *N engl j med* 362(6).
- Sundar, S. y Goyal, N. (2017). Molecular mechanisms of antimony resistance in leishmania. *Journal of Medical Microbiology* 56, 143–53. doi:10.1099/jmm.0.46841-0.
- Sundar, S., Jha, T., Thakur, C., Bhattacharya, S. y Rai, M. (2006). Oral miltefosine for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100S, S26-S33 doi:10.1016/j.trstmh.2006.02.011.
- Sundar, S. y Singh, A. (2017). Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis : present and future developments. *Cambridge University Press*. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002116>.
- Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Prajapati, A., Singh, A., Ostin, B., Boelaert, M., Dujardin, J. y Chakravarty, J. (2012). Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in india after a decade of use. *Clinical Infectious Diseases* 55(4), 543–50.
- Vásquez, L. (2009). Terapéutica anti-*Leishmania*: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gaceta Medica de Caracas*, 117(2), 93-111.
- Walters, K. (2002). Dermatological and transdermal formulations. New York, USA: Marcel Dekker.
- Williams, A y Barry, B. (2012). Penetration Enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 128–37. doi:10.1016/j.addr.2012.09.032