

Búsqueda de alternativas farmacológicas en parásitos de *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis* resistentes a la miltefosina

Laura María Chaparro Caballero

Trabajo de Grado para optar por el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora

Patricia Escobar

Doctora en Inmuno Parasitología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2025

### **Dedicatoria**

A mi familia, en especial a mi madre Mariela y mi hermana Angie:

Me siento orgullosa de hacer parte de esta familia de mujeres increíbles, trabajadoras y admirables, de quiénes aprendo continuamente y recibo su amor incondicional.

A ti, padre, porque me enseñaste el valor de la lectura, el papel de un docente y a siempre cuestionar las cosas. Te recordamos con amor.

Mil gracias.

### **Agradecimientos**

A mi madre y mi hermana, porque fueron firmes en su apoyo constante, siempre con palabras de aliento e interés por lo que hago.

A Tatiana, Silvia y Liseth por sus palabras positivas, su valiosa amistad y apoyo incondicional.

A mi directora de tesis, la doctora Patricia, por su entrega, dedicación y guía para el aprendizaje de sus estudiantes.

A mis compañeros de laboratorio, Jorge y a Diana, por sus chistes jocosos sobre la vida investigativa, que hicieron de ella una experiencia más agradable.

A mis compañeros de maestría, con quienes iniciamos este desafío y hemos sabido culminar.

A la Universidad Industrial de Santander y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia, que a través del proyecto con código 2022-0645: Evaluación de la Efectividad y Seguridad Clínica de la Gelofosina como Prototipo de Tratamiento Tópico en Pacientes con Leishmaniasis Cutánea Simple, apoyó el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a todas aquellas personas que aportaron en mi crecimiento tanto profesional como personal a lo largo de estos años.

Gracias a todos.

**Tabla de contenido**

	<b>Pag.</b>
Introducción.....	20
1 Generación de una cepa de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente a 40 $\mu$ M de MTF y comparación de sus características biológicas con la cepa nativa o WT.....	25
1.1 Leishmaniasis: formas clínicas, epidemiología, tratamientos y características moleculares.....	25
1.1.1 Formas clínicas y epidemiología.....	25
1.1.2 Especies de <i>Leishmania</i> implicadas en la LC en Colombia.....	27
1.1.3 Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i> .....	29
1.1.4 Genoma del parásito <i>Leishmania</i> .....	30
1.1.5 Tratamientos para la LC.....	31
1.1.6 Mecanismo de acción de la miltefosina (MTF).....	32
1.1.7 Mecanismo de acción de otros fármacos antileishmania.....	33
1.1.8 Falla terapéutica (FT) en el tratamiento con MTF.....	35
1.1.9 Marcadores moleculares de resistencia a MTF.....	40
1.2 Metodología.....	44
1.2.1 Diseño metodológico.....	44
1.2.2 Parásitos y células.....	44
1.2.3 Fármacos antileishmania.....	45

1.2.4	Generación de parásitos resistentes a MTF (R-MTF) .....	48
1.2.5	Prueba de susceptibilidad de los parásitos a la MTF .....	48
1.2.6	Cinética de crecimiento .....	49
1.2.7	Evaluación de la capacidad de infección de las cepas 40R y WT .....	50
1.2.8	Susceptibilidad cruzada a otros fármacos antileishmania .....	50
1.2.9	Ensayo de toxicidad en células humanas THP-1 .....	51
1.2.10	Marcadores moleculares de resistencia .....	52
1.2.11	PCR convencional. ....	52
1.2.12	RT-qPCR. ....	55
1.2.13	Análisis estadístico .....	55
1.3	Resultados .....	56
1.3.1	Generación de la resistencia a MTF .....	56
1.3.2	Cinética de crecimiento de la cepa WT vs 40R .....	58
1.3.3	Capacidad de infección de las cepas 40R y WT .....	59
1.3.4	Susceptibilidad cruzada con otros fármacos antileishmania .....	61
1.3.4.1	Susceptibilidad cruzada de 40R versus WT .....	61
1.3.4.2	Susceptibilidad cruzada de promastigotes 10R, 20R y 30R versus WT .....	62
1.3.5	Susceptibilidad cruzada de otros fármacos antileishmania en amastigotes intracelulares 40R .....	65
1.3.6	Análisis molecular .....	66

1.3.6.1	Secuenciación .....	66
1.3.6.2	Niveles de expresión de los genes .....	68
1.4	Discusión .....	69
1.5	Conclusiones .....	76
2	Determinación de la estabilidad del fenotipo resistente de los parásitos 40R al quitar la presión del fármaco y en otras formas de vida .....	77
2.1	Fenotipo de resistencia farmacológica (RF) .....	77
2.1.1	Concepto de RF y posibles factores implicados .....	77
2.1.2	Estabilidad del fenotipo resistente a MTF .....	79
2.2	Metodología .....	82
2.2.1	Diseño metodológico .....	82
2.2.2	Parásitos y células .....	82
2.2.3	Fármacos y compuestos .....	83
2.2.4	Prueba de estabilidad de la resistencia en promastigotes sin la presión del fármaco	83
2.2.5	Prueba de estabilidad de la resistencia después de la infección en células THP-1	83
2.2.6	Análisis estadístico .....	84
2.3	Resultados .....	84
2.3.1	Susceptibilidad de los parásitos R-MTF sin la presión del fármaco .....	84

2.3.2	Estabilidad de la resistencia después de la infección en células THP-1.....	88
2.4	Discusión .....	91
2.5	Conclusiones .....	94
3	Determinación del efecto de fármacos/compuestos en la reversión del fenotipo MTF-40R y en la potenciación de la actividad de MTF en parásitos MTF-40R de <i>L. amazonensis</i>	95
3.1	Manejo terapéutico del fenotipo de resistencia a MTF.....	95
3.2	Metodología.....	97
3.2.1	Diseño metodológico.....	97
3.2.2	Parásitos y células.....	100
3.2.3	Compuestos/inhibidores .....	100
3.2.4	Prueba de citotoxicidad compuestos/inhibidores en células Vero y THP-1.	103
3.2.5	Prueba de susceptibilidad de los parásitos a compuestos/inhibidores.....	103
3.2.6	Reversión de la resistencia por compuestos/inhibidores .....	104
3.2.7	Interacción de fármacos.....	105
3.2.8	Análisis estadístico .....	106
3.3	Resultados .....	107
3.3.1	Citotoxicidad de los fármacos/compuestos en células THP-1 y Vero.....	107
3.3.2	Actividad antileishmania de compuestos/inhibidores en las cepas WT y 40R de <i>L. amazonensis</i> .....	109

3.3.3	Reversión de la resistencia / potenciamiento de la actividad .....	112
3.3.4	Interacción de fármacos.....	114
3.4	Discusión .....	120
3.5	Conclusiones.....	123
4	Conclusiones generales .....	124
5	Divulgaciones.....	125
	Referencias .....	126

**Lista de Tablas**

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1</b> <i>Eficacia del tratamiento de la Leishmaniasis del Nuevo Mundo con MTF</i>	36
<b>Tabla 2</b> <i>Características de los fármacos antileishmania</i>	46
<b>Tabla 3</b> <i>Características de cebadores para pruebas moleculares.</i>	53
<b>Tabla 4</b> <i>Niveles de infección de las cepas WT y 40R en las células THP-1 después de diferentes tiempos.</i>	60
<b>Tabla 5</b> <i>Potencia de los fármacos antileishmania en promastigotes de L. amazonensis y en células THP-1</i>	64
<b>Tabla 6</b> <i>Potencia de la PMD y Sb<sup>III</sup> en células THP-1 infectadas con amastigotes de L. amazonensis WT y 40R</i>	66
<b>Tabla 7</b> <i>Características de compuestos candidatos para reversión o potenciamiento de la actividad de MTF en parásitos 40R de L. amazonensis.</i>	101
<b>Tabla 8</b> <i>Detalles del tratamiento de reversión en las cepas 40R y WT de L. amazonensis</i>	105
<b>Tabla 9</b> <i>IS de los fármacos/compuestos en células THP-1 y Vero.</i>	111
<b>Tabla 10</b> <i>Interacción de fármacos en promastigotes de L. amazonensis, cepas WT y 40R, la concentración inhibitoria fraccional (FIC) para cada punto (4:1 a 1:4), el promedio de <math>\Sigma FIC</math>, y el tipo de interacción exhibida.</i>	116

## Lista de Figuras

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1</b> <i>Distribución geográfica de especies de Leishmania en Colombia</i> .....	28
<b>Figura 2</b> <i>Diseño metodológico de la caracterización de las cepas 40R y WT</i> .....	44
<b>Figura 3</b> <i>Tiempo de adaptación a concentraciones crecientes de MTF (0–40 <math>\mu</math>M) y potencia de la MTF en distintos niveles de resistencia de promastigotes de <i>L. amazonensis</i></i> .....	57
<b>Figura 4</b> <i>Cinéticas de crecimiento de la cepa nativa y 40R de <i>L. amazonensis</i></i> .....	58
<b>Figura 5</b> <i>Capacidad de infección de las cepas de <i>L. amazonensis</i> 40R y WT</i> .....	60
<b>Figura 6</b> <i>Susceptibilidad de las cepas WT, 10R, 20R, 30R y 40R a MTF y otros fármacos antileishmania</i> .....	63
<b>Figura 7.</b> <i>Potencia de la PMD y el Sb<sup>III</sup> en amastigotes intracelulares de cepas 40R y WT de <i>L. amazonensis</i></i> .....	65
<b>Figura 8</b> <i>Secuencias del gen mt en las cepas WT y 40R de <i>L. amazonensis</i></i> .....	67
<b>Figura 9</b> <i>Niveles de transcripción de los genes 18S, gapdh, mt y ros3 en las cepas WT y 40R de <i>L. amazonensis</i></i> .....	68
<b>Figura 10</b> <i>Mecanismos de resistencia farmacológica de parásitos de Leishmania</i> .....	77
<b>Figura 11</b> <i>Diseño metodológico del capítulo 2 que evalúa la estabilidad de la resistencia.</i> .....	82
<b>Figura 12</b> <i>Estabilidad de la resistencia en promastigotes R-MTF al quitar la presión del fármaco.</i> .....	87
<b>Figura 13</b> <i>Estabilidad de la resistencia a MTF de cepas con diferentes niveles de resistencia.</i> .....	88

<b>Figura 14</b> <i>Amastigotes intracelulares de L. amazonensis tratados con MTF.</i> .....	90
<b>Figura 15</b> <i>Diseño metodológico del manejo del fenotipo resistente a MTF de L. amazonensis.</i> .....	99
<b>Figura 16</b> <i>Citotoxicidad de fármacos y compuestos en células THP-1 y Vero</i> .....	108
<b>Figura 17</b> <i>Potencia de los fármacos y compuestos en las cepas 40R y WT de L. amazonensis.</i> .....	110
<b>Figura 18</b> <i>Efecto de tratamientos con fármacos/compuestos por 8 y 15 días en las cepas WT y 40R de L. amazonensis</i> .....	114
<b>Figura 19</b> <i>Isobologramas de las cepas 40R y WT de L. amazonensis</i> .....	118

**Lista de abreviaturas y símbolos****A**

ADN: ácido desoxirribonucleico

AmB: anfotericina b

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AQP1: aquagliceroporina

**C**

CCM: curcumina

CDC: Centros para el control y la prevención de enfermedades

CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50

**D**

DMSO: dimetil sulfóxido

DNeasy®: kit comercial para la extracción de ADN

DS: desviación estándar

**E**

ELD: elacridar

**F**

$\sum$ FIC: sumatoria de FIC

FNS: farnesol

FT: falla terapéutica

FIC: concentración inhibitoria fraccional

**G**

*gapdh*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

**I**

IFN $\gamma$ : interferón gamma

IMA: índice de mejoramiento de la actividad

IRD: índice de reducción de dosis

IR: índice de resistencia

IRR: índice de reversión de la resistencia

IS: índice de selectividad

**K**

KTZ: ketoconazol

**L**

*L. amazonensis*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

*L. braziliensis*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*

*L. donovani*: *Leishmania (Leishmania) donovani*

*L. infantum*: *Leishmania (Leishmania) infantum*

*L. major*: *Leishmania (Leishmania) major*

*L. mexicana*: *Leishmania (Leishmania) mexicana*

*L. panamensis*: *Leishmania (Viannia) panamensis*

*L. tropica*: *Leishmania (Leishmania) tropica*

LC: leishmaniasis cutánea

LMC: leishmaniasis mucocutánea

LV: leishmaniasis visceral

## **M**

MSPS: ministerio de salud y protección social

*mt*: proteína transportadora de MTF

MTF: miltefosina

## **N**

NLD: nerolidol

NM: nuevo mundo

NO: óxido nítrico

## **O**

OMS: organización mundial de la salud

## **P**

PBS: fosfato buffer salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMA: forbol 12-miristato-13acetato

PMD: iseationato de pentamidina

PMM: sulfato de paromomicina

POZ: posaconazol

## **Q**

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

## **R**

10R: resistente a 10  $\mu$ M de miltefosina

20R: resistente a 20  $\mu$ M de miltefosina

30R: resistente a 30  $\mu$ M de miltefosina

40R: resistente a 40  $\mu$ M de miltefosina

R-MTF: resistentes a miltefosina

R: resistencia

RF: resistencia farmacológica

ROS: especies reactivas de oxígeno

Ros3: proteína *ros3*

RPMI 1640: medio de cultivo para células

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa

## S

SFBI: suero fetal bovino inactivo

Sb<sup>III</sup>: antimoniato de meglumina trivalente (forma activa)

Schneider: medio de cultivo *Drosophila* de Schneider

SLB: silibina

SNP: polimorfismo de nucleótido único

Sb<sup>V</sup>: antimoniato de meglumina pentavalente (forma inactiva)

## T

tD: tiempo de duplicación

TDR1: reductasa dependiente de tioles I

T<sub>m</sub>: temperatura melting

T(SH)<sub>2</sub>: tripanotiona reducida

TR: tripanotiona reductasa

TS<sub>2</sub>: tripanotiona oxidada

**V**

VM: viejo mundo

VPM: verapamilo

**W**

WT: wild type

### **Lista de unidades**

$\mu\text{M}$ : micromolar

$^{\circ}\text{C}$ : grados Celsius

## Resumen

**Título:** Búsqueda de alternativas farmacológicas en parásitos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* resistentes a la miltefosina<sup>1</sup>

**Autor:** Laura María Chaparro Caballero<sup>2</sup>

**Palabras clave:** *L. (L.) amazonensis*, miltefosina, estabilidad de la resistencia, reversión de la resistencia.

**Introducción:** La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades transmitidas por vectores, causadas por los parásitos *Leishmania*. En Colombia, el tratamiento estándar son los antimoniales pentavalentes (Sb<sup>V</sup>); si hay efectos secundarios, falla terapéutica (FT) o contraindicaciones, se usan alternativas como miltefosina (MTF), entre otras. La MTF es el único medicamento disponible en forma oral, empleado en todas las formas clínicas, pero la FT ha aumentado y podría deberse a factores relacionados con el fármaco, el huésped o el parásito. De este último se han obtenido aislados de pacientes con FT y baja sensibilidad *in vitro*. **Objetivo:** evaluar la actividad de fármacos y compuestos en la reversión del fenotipo de resistencia, o como potenciadores de la actividad de la MTF, en parásitos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* resistentes a MTF (R-MTF). **Metodología:** Primera etapa: se generaron cepas R-MTF (10R, 20R, 30R y 40R) mediante presión selectiva con MTF. La cepa 40R se comparó con la cepa nativa o *wild type* (WT) en cinética de crecimiento, susceptibilidad a MTF y otros fármacos antileishmania, infectividad en células THP-1 y expresión/mutaciones de los genes *mt* y *ros3*. Segunda etapa: se evaluó la estabilidad del fenotipo resistente en las cepas R-MTF retirando la presión de MTF en el cultivo y tras infectar macrófagos. Tercera etapa: en la reversión de la resistencia, se evaluó la potencia de fármacos, compuestos derivados de plantas e inhibidores de receptores frente a las cepas 40R y WT; después se cultivaron a bajas concentraciones de los compuestos por 8 y 15 días, y se calculó la potencia (CI<sub>50</sub>) de la MTF. En el potenciamiento de la actividad de la MTF en la cepa 40R y WT, se determinó la actividad de la MTF + fármacos/compuestos en ensayos de combinación a razón fija, calculando la concentración inhibitoria fraccional (CIF) y el tipo de interacción (sinergia, aditiva o antagónica). **Resultados:** Primera etapa: comparada con la cepa WT, la cepa 40R presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en su crecimiento más lento, incremento de la susceptibilidad de promastigotes a Sb<sup>III</sup> y a PMD, infección *in vitro* normal, resistencia de amastigotes intracelulares a Sb<sup>III</sup>, mutación puntual y mayor expresión del gen *mt*. Segunda etapa: la cepa 40R mantuvo la resistencia después de tres meses en cultivo sin MTF, y después de infectar células THP-1. Tercera etapa: la silibina (SLB) y el posaconazole (POZ) revirtieron el 50% y 70% de la resistencia en 40R, respectivamente; la combinación MTF+POZ mostró actividad sinérgica en 40R en la proporción 3:2. **Conclusión:** la cepa 40R presentó algunas diferencias con la cepa WT en sus características biológicas y mantuvo la resistencia hasta por 3 meses en cultivo sin el fármaco. La SLB y el POZ permiten la reversión de la resistencia a MTF en cepas 40R de *L. amazonensis* actuando como compuestos moduladores.

---

<sup>1</sup>Tesis de maestría

<sup>2</sup>Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Directora: Patricia Escobar PhD.

### Abstract

**Title:** Search for Pharmacological Alternatives in Miltefosine-Resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Parasites<sup>3</sup>

**Autor:** Laura María Chaparro Caballero<sup>4</sup>

**Key words:** *L. (L.) amazonensis*, miltefosine, resistance stability, resistance reversion.

**Introduction:** Leishmaniasis comprises a group of vector-borne diseases caused by *Leishmania* parasites. In Colombia, the standard treatment consists of pentavalent antimonials (Sb<sup>V</sup>); however, in cases of adverse effects, therapeutic failure (TF), or contraindications, alternative treatments such as miltefosine (MTF), among others, are used. MTF is the only orally available drug used across all clinical forms, yet reports of TF have increased and may be associated with factors related to the drug, the host, or the parasite. Regarding the latter, isolates from patients with TF and low *in vitro* susceptibility have been obtained. **Objective:** To evaluate the activity of drugs and compounds in reversing the resistant phenotype, or as enhancers of MTF activity, in miltefosine-resistant (MTF-R) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasites. **Methodology:** First stage: MTF-R strains (10R, 20R, 30R, and 40R) were generated through selective pressure with MTF. The 40R strain was compared with the native or wild-type (WT) strain in growth kinetics, susceptibility to MTF and other antileishmanial drugs, infectivity in THP-1 cells, and expression/mutations in the *mt* and *ros3* genes. Second stage: The stability of the resistant phenotype in the MTF strains was evaluated by removing MTF pressure in culture and after macrophage infection. Third stage: For resistance reversal, the potency of drugs, plant-derived compounds, and receptor inhibitors was assessed against the 40R and WT strains. The strains were then cultured with low concentrations of these compounds for 8 and 15 days, and the MTF potency (IC<sub>50</sub>) was determined. To evaluate the enhancement of MTF activity in the 40R and WT strains, fixed-ratio combination assays (MTF + drugs/compounds) were performed, calculating the fractional inhibitory concentration (FIC) and the type of interaction (synergistic, additive, or antagonistic). **Results:** First stage: Compared with the WT strain, the 40R strain exhibited a significantly altered phenotypic profile ( $p < 0.05$ ), including slower growth, increased susceptibility of promastigotes to Sb<sup>III</sup> and PMD, normal *in vitro* infection, intracellular amastigote resistance to Sb<sup>III</sup>, a point mutation, and higher expression of the *mt* gene. Second stage: The 40R strain-maintained resistance after three months in culture without MTF and after infecting THP-1 cells. Third stage: Silibinin (SLB) and posaconazole (POZ) reversed 50% and 70% of resistance in the 40R strain, respectively; additionally, the MTF+POZ combination showed synergistic activity in 40R at the 3:2 ratio. **Conclusion:** The 40R strain exhibited several differences from the WT strain in its biological characteristics and maintained resistance for up to three months in culture without the drug. SLB and POZ enable the reversal of MTF resistance in 40R strains of *L. amazonensis*, acting as modulatory compounds.

---

<sup>3</sup>Master's Thesis

<sup>4</sup>Faculty of Health. School of Medicine. Director: Patricia Escobar PhD.

## Introducción

La leishmaniasis es una infección de transmisión vectorial que constituye un problema de salud pública importante en la mayoría de los países afectados. En 2023, Colombia fue el tercer país en América con más casos notificados de leishmaniasis cutánea (LC) (4898 casos) (OMS, 2023a) y, a nivel nacional, en el 2024 se registró un incremento en el número de casos de leishmaniasis mucocutánea (LMC) a 102 casos, en comparación con el año anterior 2023 en el cual se reportaron 91 casos (INS, 2023, 2024). Las opciones de tratamiento para la leishmaniasis son limitadas. En la primera línea se administra antimonio de meglumina ( $Sb^V$ , forma inactiva), de eficacia variable, aplicación parenteral dolorosa que puede llevar al abandono del tratamiento, efectos adversos graves y, además, no pueden ser utilizados por un número importante de personas por sus contraindicaciones. En este contexto, la MTF se posicionó como la alternativa terapéutica de elección al ser el primer fármaco registrado para uso oral en la leishmaniasis (MSPS, 2023). No obstante, en los últimos años, se ha reportado disminución de la eficacia en el tratamiento con MTF en todas sus formas clínicas, con registros iniciales del 94% y reportes actuales entre el 66% y 77% (Machado *et al.*, 2021; Mendes *et al.*, 2021; Ware *et al.*, 2021). Diversos factores dependientes de los parásitos, del hospedero o del fármaco, podrían estar implicados en la falla terapéutica (FT) de los pacientes al tratamiento con MTF (Dorlo *et al.*, 2014), dentro de los cuales y ampliamente estudiados en otros modelos biológicos, está la resistencia (R) o baja susceptibilidad de los microorganismos a los fármacos. El fenotipo de resistencia o baja susceptibilidad ha sido observado en aislados clínicos de *Leishmania infantum* tras el tratamiento con MTF (Cojean *et al.*, 2012) y se ha relacionado con la falla terapéutica (FT), lo que sugiere la existencia de resistencia natural (Carnielli *et al.*, 2019). Esta correlación

también se observó en cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) panamensis* aisladas de pacientes de 64 y 10 años con LC, respectivamente (Obonaga *et al.*, 2014).

En relación con la estabilidad de la baja susceptibilidad a la MTF de los parásitos, los resultados no son concluyentes. Se han reportado cepas de *Leishmania major* y *Leishmania donovani* resistentes a MTF (R-MTF) generados *in vitro* por presión selectiva, que conservan la R-MTF entre 11 y 12 meses de cultivo sin MTF, con valores de  $CI_{50}$  menores que la cepa R-MTF en cultivo con el fármaco pero no a los niveles de los parásitos WT (Turner *et al.*, 2015; Vacchina *et al.*, 2016). Sin embargo, parásitos de *Leishmania tropica* resistentes a daunomicina (DNM) y resistencia cruzada a MTF, recuperaron la susceptibilidad al fármaco en un tiempo bastante menor como 45 días (J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Parodi-Talice, *et al.*, 2001).

Los análisis moleculares de las cepas resistentes han mostrado mutaciones y diferencias en la expresión de algunos genes, como *mt*, *ros3*, *abca3*, entre otros, tanto en cepas resistentes mediante presión selectiva *in vitro* como en aislados clínicos obtenidos de lesiones de LC (Obonaga *et al.*, 2014). Esto señala que el parásito podría regular la expresión génica en presencia del medicamento y que es posible simularlo en el laboratorio.

Teniendo en consideración los aspectos positivos de la MTF mencionados anteriormente y el problema de resistencia y FT creciente, se hace necesaria la creación de estrategias que permitan mantener a este fármaco como una alternativa viable para el tratamiento de la leishmaniasis. Esto puede abordarse desde el parásito o desde el fármaco. En el primer caso, algunos estudios han demostrado la reversión de la R-MTF de cepas de *Leishmania tropica* y *Leishmania donovani*, empleando compuestos o fármacos como sesquiterpenos, flavonoides e inhibidores de bombas tipo Pgp (Chiquero *et al.*, 1998; J. M.

Pérez-Victoria *et al.*, 2006; J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Conseil, *et al.*, 2001). Asimismo, se han estudiado fármacos que potencian la acción de la MTF en cepas de *L. (V.) panamensis* como es el caso de posaconazol (POZ) (Fernández *et al.*, 2022).

En consecuencia, es necesario estudiar las características de las cepas de *Leishmania* R-MTF en diferentes escenarios (sin presión del fármaco, en otras formas de vida parasitarias) y encontrar una estrategia terapéutica para la reversión o el potenciamiento de la actividad de la MTF. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar la actividad de fármacos o compuestos en la reversión del fenotipo de resistencia o como potenciadores de la actividad de la MTF en parásitos de *L. (L.) amazonensis* resistentes a la miltefosina. Con este fin, planteamos tres etapas así:

1. La generación y caracterización del fenotipo resistente de los parásitos R-MTF en comparación con las de la cepa nativa (WT).
2. La determinación de la estabilidad del fenotipo resistente de los parásitos R-MTF al retirar la presión del fármaco en los cultivos y en otras formas de vida.
3. La determinación del efecto de fármacos y compuestos sobre la reversión del fenotipo resistente y el potenciamiento de la actividad de la MTF en parásitos R-MTF.

Esta tesis se divide en 3 capítulos que abordan aspectos teóricos y comportamiento de la resistencia a MTF en relación con la cepa nativa y potenciales compuestos para el manejo terapéutico a futuro de cepas R-MTF. En el capítulo 1 se abordará la generación de una cepa de *L. amazonensis* resistente a 40  $\mu$ M de MTF (40R) mediante presión selectiva, un modelo ampliamente empleado para evaluar los marcadores de resistencia y el comportamiento de las cepas resistentes. Para ello, se evaluaron características como la cinética de crecimiento, la susceptibilidad o resistencia cruzada frente a otros fármacos

antileishmania, la infección en células THP-1 y marcadores moleculares de expresión (ARNm) empleando la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR) y de cambios en los genes *mt* y *ros3*, en comparación con la cepa WT. Se han formulado mecanismos empleados por el parásito R-MTF para enfrentar otros fármacos antileishmania, y estos resultados permitieron identificar el fitness del parásito, clave para determinar el riesgo futuro inherente a las resistencias farmacológicas.

En el capítulo 2 se abordan aspectos teóricos de la estabilidad del fenotipo resistente y la posibilidad de la transmisión de la resistencia de la forma de vida extracelular (promastigotes) encontrada en el vector, a la intracelular (amastigotes) encontrada en el hospedero mamífero. Las preguntas que nos hacemos en este capítulo son: ¿la pérdida de susceptibilidad a la MTF inducida en los parásitos resistentes (R-MTF) por presiones selectivas del fármaco en los promastigotes, se mantienen después de retirar la presión del fármaco? ¿Por cuánto tiempo? ¿En amastigotes intracelulares? Para ello, se mantuvieron los parásitos R-MTF en cultivo sin MTF durante tres meses y se determinó el valor de  $CI_{50}$  antes, durante y después del seguimiento. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos con la cepa R-MTF en cultivo con el fármaco y con la cepa WT, lo que permitió evaluar la conservación de la resistencia a MTF en las formas de vida implicadas en el ciclo de vida del parásito.

En el capítulo 3 se abordan conceptos teóricos sobre la reversión y el potenciamiento de la actividad de la MTF. El capítulo contiene la evaluación de distintos fármacos y compuestos como agentes *reversores* de la resistencia, para ello, los parásitos 40R fueron tratados con concentraciones subóptimas de nueve compuestos durante 8 y 15 días. De esta manera, se determinó la potencia de la MTF antes y después de cada tratamiento. Esto permitió identificar los compuestos con mayor potencial de reversión. Adicionalmente, se

evaluaron 10 compuestos en interacción con la MTF, lo que permitió determinar la mejor combinación potenciadora de la MTF en cepas 40R.

Con base en lo anterior, los resultados obtenidos en esta tesis de maestría proporcionan bases importantes para el manejo terapéutico futuro de cepas con susceptibilidad disminuida a MTF, al presentar una caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a MTF, su estabilidad, y la posibilidad de postular fármacos *reversores* de la resistencia a MTF o potenciadores de la MTF.

## **1 Generación de una cepa de *L. (L.) amazonensis* resistente a 40 µM de MTF y comparación de sus características biológicas con la cepa nativa o WT.**

### **1.1 Leishmaniasis: formas clínicas, epidemiología, tratamientos y características moleculares**

#### ***1.1.1 Formas clínicas y epidemiología***

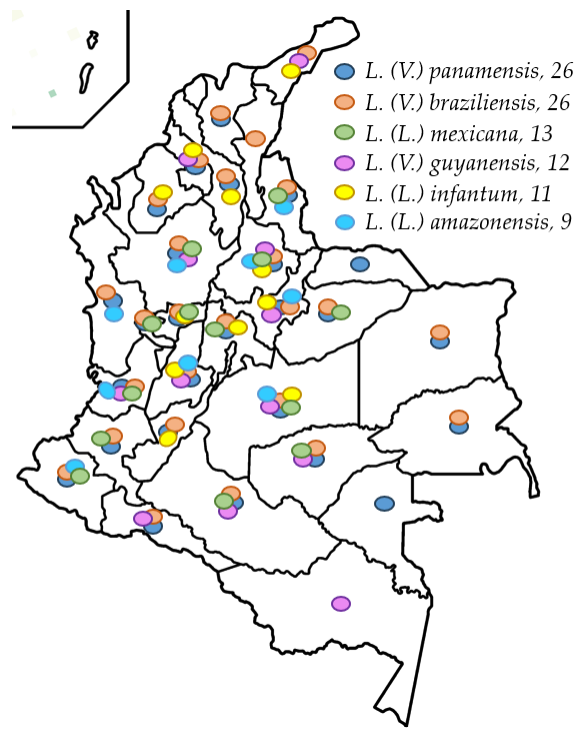
La leishmaniasis son un conjunto de enfermedades desatendidas predominante en países tropicales, subtropicales y del sur de Europa, causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, transmitidos por flebótomos del género *Lutzomyia* en el NM y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (VM). Este tipo de enfermedades se ha relacionado con actividades en zonas rurales, con porcentajes del 68,3% en el 2023; el 67,5% fue en hombres y el 78,4% correspondió a personas del régimen subsidiado en el Sistema General de Seguridad Social en Salud (INS, 2023).

Se reconocen tres formas clínicas en las que la leishmaniasis visceral (LV) es el desenlace más severo de la leishmaniasis y resulta mortal en el 95% de los casos si no se trata, y se presenta principalmente en países como Sudán, Kenia, Brasil e India (OMS, 2023b). Las manifestaciones clínicas de la LV se caracterizan por una marcada hepatoesplenomegalia, acompañada de otros síntomas como fiebre, anemia, pérdida de peso, edema y tos, así como afectación renal como consecuencia de la carga parasitaria, con una respuesta inflamatoria exacerbada, mediada por citoquinas que favorecen la infección por microorganismos oportunistas (Costa *et al.*, 2023). La leishmaniasis mucocutánea (LMC), que ocurre principalmente en Bolivia, Brasil, Etiopía y Perú, se caracteriza por causar destrucción del septum nasal, labios y paladar. La LC es la forma clínica prevalente de la leishmaniasis, de la cual, el 95% de los casos provienen de Asia Central, Latinoamérica y la

cuenca Mediterránea, siendo la República Árabe, Siria, Afganistán, Pakistán y Brasil los países con mayor número de casos (OMS, 2023b). Dentro de la LC se encuentra la LC localizada, la cual puede presentar una o hasta 10 lesiones generalmente en áreas expuestas; la LC diseminada que presenta múltiple lesiones (más de 10) de carácter nodular, acneiformes o placas descamativas, especialmente en miembros inferiores y superiores y con compromiso mucoso en la mitad de los casos; la LC difusa con lesiones tipo pápulas, nódulos o tubérculos no ulcerados, considerada la forma más grave por la gran inhibición de la inmunidad celular específica (OMS, 2023b); y, la LC atípica, una forma de LC no ulcerada, reportada en pacientes con *L. infantum* sin cuadros de LV en quienes se tiene la teoría de que el parásito migra a la piel ocasionando lesiones atípicas (Caballero *et al.*, 2013; Ponce *et al.*, 1991). Es importante mencionar que las lesiones en la LC se generan semanas después de la picadura de la mosquita y se caracterizan por el desarrollo de una pápula que amplía su tamaño hasta formar un nódulo y se ulcera lentamente en los meses posteriores, a diferencia de las lesiones en el VM, en donde estas pueden desarrollar placas hiperqueratóticas o verrugosas (Burza *et al.*, 2018; OMS, 2023b). Así mismo, otra diferencia importante es las especies asociadas a la LC en el NM, las cuales incluyen parásitos del subgénero *Viannia* (generalmente *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y del subgénero *Leishmania* (*L. amazonensis* y *L. mexicana*), mientras que, en el VM se presentan únicamente especies del subgénero *Leishmania* como *L. tropica*, *L. donovani*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. infantum* (MSPS, 2023; OMS, 2023b).

### 1.1.2 *Especies de Leishmania implicadas en la LC en Colombia*

Las especies de *Leishmania* causantes de la LC presentes en Colombia incluyen parásitos de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. En la revisión realizada por (Salgado-Almario *et al.*, 2019), en 86 estudios publicados entre 1985 y 2017, se encontró que la especie comúnmente identificada era *L. panamensis* (39 estudios), seguida de *L. braziliensis* (26), *L. guyanensis* (20), *L. infantum* (15), *L. mexicana* (8), y *L. amazonensis* (6); esta última siendo reportada en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Chocó, Meta, Nariño, Norte de Santander, Santander, Tolima y Valle del Cauca (**Figura 1**). Igualmente, en un trabajo realizado por (Ovalle-Bracho *et al.*, 2019), a partir de 688 muestras clínicas de pacientes tratados en el Centro Dermatológico Lleras Acosta entre 1999 y 2016, 641 con diagnóstico de LC y 47 de LMC, detectaron la presencia de *L. panamensis* (52.9%), *L. braziliensis* (40.7%), *L. guyanensis* (4.8%) y *L. amazonensis* (1.6%). Estudios más recientes en población militar reportaron la identificación de *L. braziliensis* en el 65,09% de los casos, seguida de *L. panamensis* en el 31,13%, *Leishmania naiffi* en el 1,89% y *Leishmania lindenbergi* y *L. infantum* en el 0,9% (Correa-Cárdenas *et al.*, 2020). Otros estudios realizados en flebótomos permitieron determinar la presencia de *L. panamensis* en el municipio La Victoria en el departamento de Caldas, con una tasa de infección del 0,5% (Posada-López *et al.*, 2023) y la presencia de *L. braziliensis* en las localidades de Cinera y Siravita del municipio de Arboledas, Norte de Santander, con una prevalencia en el 63,1% de los mosquitos hembra capturadas (Sandoval-Ramírez *et al.*, 2020).

**Figura 1** Distribución geográfica de especies de *Leishmania* en Colombia

NOTA: Adaptada de *Distribución geográfica de las especies de Leishmania en Colombia, 1985-2017*. Salgado-Almario, J., Hernández, CA., Ovalle-Bracho, C. 2019. Especie, número de departamentos donde se reportó su identificación.

La especie *L. amazonensis* se emplea comúnmente *in vitro* debido a su facilidad de cultivo en su estadio promastigote. Esta especie está principalmente asociada con presentaciones clínicas de LC, pero se han reportado casos más graves de LMC y LV causados por *L. amazonensis* (Barral et al., 1991; de Souza et al., 2018; Gómez, lo que resalta su importancia epidemiológica en Suramérica. Además, dado que la coinfección entre especies de *Leishmania* no es comúnmente observada, se ha reportado la presencia de *L. amazonensis* en coinfección con *L. guyanensis* en un caso de LC atípica en una paciente de

65 años (Gosch *et al.*, 2018). Asimismo, esta especie se ha empleado en modelo murino de LC en ratones BALB/c para evaluar la eficacia de vacunas como HisAK70 (Martínez-Rodrigo *et al.*, 2019).

### ***1.1.3 Ciclo de vida del parásito Leishmania***

El parásito de *Leishmania* es transmitido por la hembra de la mosquita de la arena perteneciente a la subfamilia Phlebotominae, familia Psychodidae. El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando los macrófagos infectados con amastigotes son ingeridos por la mosquita al alimentarse de un hospedero infectado y, en el intestino del vector los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos; la ubicación del parásito en este órgano depende del subgénero, para las especies pertenecientes al subgénero *Viannia* el desarrollo de los promastigotes ocurre en el intestino posterior, mientras que, en las correspondientes al subgénero *Leishmania* sucede en el intestino medio (CDC, 2024). En este nivel, el parásito presenta reproducción asexual mediante fisión binaria, migra hacia la probóscide transformándose en su estadio infeccioso de promastigote metacíclico y, se aloja allí hasta que el vector se alimenta nuevamente. Cuando esto sucede, la mosquita regurgita cerca de 1000 promastigotes metacíclicos (Sheikh *et al.*, 2020) y los introduce hasta la dermis donde son fagocitados por macrófagos residentes o por otras células fagocíticas, nuevamente transformándose en amastigotes y multiplicándose mediante división simple dentro de la vacuola parasitófora, hasta que finalmente ocurre la lisis del macrófago, facilitando la diseminación e infección de otros macrófagos (CDC, 2024; Esch & Petersen, 2013; MSPS, 2023).

#### 1.1.4 Genoma del parásito *Leishmania*

En el estudio del genoma de *Leishmania*, se ha encontrado que las especies del VM tienen 36 cromosomas y las especies del NM del subgénero *Viannia* tienen un cromosoma menos, debido a la fusión de los cromosomas 20 y 35 (Llanes *et al.*, 2015), y algo similar sucede con las especies del subgénero *Leishmania* como *L. mexicana* con dos cromosomas menos debido a la fusión de los cromosomas 8+29 y 20+36 (Britto *et al.*, 1998). Además, el parásito *Leishmania* presenta una aneuploidía en mosaico, es decir, el número de copias de los cromosomas varía, exhibiendo disomías, trisomías, tetrasomías, polimorfismo de nucleótido único (SNP, siglas en inglés de *single-nucleotide polymorphism*) y variaciones en el número de copias de genes y cromosomas (CNVs, por sus siglas en inglés *chromosome and gene copy number variations*) (Patino *et al.*, 2020). También se ha demostrado la presencia de varios cariotipos dentro de un mismo clon (Imamura *et al.*, 2020; Llanes *et al.*, 2015), lo que puede deberse a procesos adaptativos y de supervivencia que pueden derivar en la resistencia a medicamentos y, por consiguiente, en el difícil manejo de la enfermedad. Otra característica interesante en *Leishmania*, es la abundante pérdida genética observada especialmente en *L. panamensis* y *L. braziliensis*. En comparación con *L. mexicana*, *L. major* y *L. infantum*, las dos especies del subgénero *Viannia* presentan 185 y 195 pseudogenes, respectivamente, lo que indica que son más propensas a la pérdida de genes mediante la duplicación del gen, que se deteriora hasta convertirse en un pseudogen (Llanes *et al.*, 2015). Además de la pérdida genética y contribuyendo más a su diversidad y adaptabilidad, los parásitos de *Leishmania* tienen la capacidad de renovar su genoma en respuesta a cambios ambientales a través de modificaciones en secuencias repetitivas ampliamente distribuidas en el ADN, lo que permite la amplificación o delección de estos segmentos genéticos (Ubeda *et al.*, 2014), contribuyendo a su diversidad y adaptabilidad. Otra particularidad del genoma

de *Leishmania*, es que los genes identificados como codificantes de proteínas, carecen de intrones y en general se organizan en unidades policistrónicas las cuales codifican para proteínas sin relación funcional entre sí (Llanes *et al.*, 2015). Igualmente, la regulación de la expresión génica no siempre es realizada a nivel transcripcional, sino que puede estar regulada a nivel postranscripcional, como lo concluyen Cortazzo da Silva *et al.*, 2022; esto autores reportan que en *Leishmania* aproximadamente en el 70% de los genes relacionados con metacicloogénesis y amastigogénesis, existe una correlación entre el ARNm y la expresión de proteínas y, en el otro 30% no hay correlación, lo que permite inferir que existen mecanismos de regulación postranscripcional en estos tripanosomátidos (Cortazzo da Silva *et al.*, 2022).

### **1.1.5 Tratamientos para la LC**

El tratamiento indicado en la LC en adultos consiste en la administración intramuscular (IM) o endovenosa (EV) de Sb<sup>V</sup> en dosis única diaria de 20 mg/kg/día por 20 días y como segunda línea se encuentran fuertemente recomendada la MTF oral en dosis de 1,5 a 2,5 mg/kg/día durante 28 días. Del mismo modo, aunque con recomendación débil, se realiza la aplicación del isetionato de pentamidina (PMD) IM o EV en dosis de 3 a 4 mg/kg/día en 4 dosis por 5 a 7 días en días alternos o, de anfotericina B (AMB) liposomal intravenosa en dosis de 2 a 3 mg/kg/día hasta dosis acumulada de 60 mg/kg. Tratamientos localizados como la termoterapia se sugieren sean aplicados en casos de pacientes adultos con LC localizada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* o *L. mexicana* así como la aplicación intralesional de Sb<sup>V</sup> en caso de infecciones por *L. braziliensis* o *L. amazonensis* (MSPS, 2023; OPS, 2022).

### **1.1.6 Mecanismo de acción de la miltefosina (MTF)**

La MTF es un medicamento derivado de alquilfosfocolina originalmente desarrollado como anticancerígeno para el cáncer de mama (del Val Gil *et al.*, 2001). Sobre su mecanismo de acción se han descrito tanto efectos directos sobre el parásito como indirectos, como un inmunomodulador. En el parásito se presentan daños en la composición de la membrana plasmática debido a que interfiere en el metabolismo de la fosfatidilcolina, probablemente mediante la acción sobre la fosfatidiletanolamina N-metil transferasa (Lira *et al.*, 2001; Lux *et al.*, 2000). También, interactúa con proteínas de membrana que le permiten su internalización, como la ATPasa tipo P codificada por el gen *mt* que es una flipasa expresada en la membrana plasmática de promastigotes y de amastigotes intracelulares (Mondelaers *et al.*, 2016; J. M. Pérez-Victoria *et al.*, 2006). Igualmente, induce cambios en el potencial de membrana mitocondrial afectando la producción energética y conduciendo a la apoptosis caracterizada por liberación del citocromo c al citoplasma, aumento de la exposición de la fosfatidilserina y fragmentación del ADN (Lira *et al.*, 2001; Mishra & Singh, 2013; Verma *et al.*, 2007); además, induce la alcalinización de los acidocalcisomas provocando la liberación del  $\text{Ca}^{+2}$  acumulado en este organelo afectando la bioenergética del parásito ya que limita la producción y acumulación de pirofosfatos, considerados una alternativa energética clave en tripanosomátidos (Pinto-Martinez *et al.*, 2017).

En relación con los efectos indirectos de la MTF, se encuentra que este fármaco promueve tanto el incremento de la expresión de los receptores de  $\text{IFN}\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma\text{R}\alpha$  y  $\text{IFN}\gamma\text{R}\beta$ ) como la producción de  $\text{IFN}\gamma$ , que trabaja en conjunto con el  $\text{IFN}\gamma$  endógeno para inducir la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible 2 (iNOS2), la cual cataliza la producción de óxido nítrico (NO), responsable de la muerte del parásito. Asimismo, existe una posible interacción directa de la MTF con el inhibidor fosfotirosina fosfatasa-1 (SHP-1)

y, junto con la activación que ejerce el  $\text{IFN}\gamma$  sobre el factor de transducción de señales y activador de transcripción-1 (STAT1), permite la translocación de este factor al interior del núcleo y estimula la respuesta Th1. Esta respuesta Th1 también se ve promovida por la IL12, cuya producción se encuentra aumentada en el tratamiento con MTF (Wadhone *et al.*, 2009).

### ***1.1.7 Mecanismo de acción de otros fármacos antileishmania***

En la primera línea de tratamiento están los antimoniales. En ellos se encuentra el antimonio pentavalente ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) que es la forma inactiva y debe ser reducido hasta su forma activa trivalente ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ). Una parte de esta reducción ocurre en el macrófago, dado que ingresa principalmente el  $\text{Sb}^{\text{III}}$  al parásito a través de la aquaporina 1 (AQP1) y, en menor medida, el  $\text{Sb}^{\text{V}}$ , pero no es claro el mecanismo de ingreso; una vez dentro del parásito, también es reducido a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Esta reducción está mediada por tioles como el glutatión reducido y la tripanotona reducida ( $\text{T}(\text{SH}_2)$ ) (Ferreira *et al.*, 2003), además de provocar el eflujo de estos compuestos e inhibir la tripanotona reductasa (TR), generando una acumulación de la tripanotona oxidada ( $\text{TS}_2$ ) (Wyllie *et al.*, 2004). Estos efectos dejan al parásito de *Leishmania* sin defensas contra las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*). Adicionalmente, se ha reportado la inhibición de las vías catabólicas de la glucosa al interferir con las enzimas glucolíticas y con la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Berman *et al.*, 1987).

La anfotericina B (AmB) es una molécula anfipática, originalmente desarrollada para el tratamiento de infecciones fúngicas, ya que se une al esteroles presente en sus membranas celulares (Gallis *et al.*, 1990). Se ha reportado que la AmB interacciona con el ergosterol de las membranas y lo secuestra, causando inestabilidad en la membrana plasmática, o

interacciona con él hasta formar poros, por los cuales generará la pérdida de iones, causando un desbalance osmótico (Kumari *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2014). Internamente, genera incremento de ROS que causa daño a proteínas, daño en el ADN y apoptosis, además de que se ha reportado el aporte de la interacción de la AmB con el colesterol de las membranas del hospedero, el cual es crucial para la actividad del fármaco, dado que macrófagos con depleción de colesterol causan disminución de la actividad de AmB (Shadab *et al.*, 2017).

El ingreso de la PMD al parásito no está claramente establecido, pero se ha reportado que es un proceso dependiente de energía (Basselin *et al.*, 1996) por lo que sería necesario un transportador específico; además, se ha teorizado la implicación de dos transportadores en cepas nativas pero no en cepas resistentes, siendo un proceso dependiente de iones de  $\text{Na}^+$  (Mukherjee *et al.*, 2006); aunque en cepas de *L. mexicana* se ha reportado el ingreso principalmente por difusión pasiva (Berman *et al.*, 1987). Además, se ha mostrado que la PMD no es metabolizada, sino que, al ingresar, causa inhibición no competitiva del ingreso de aminoácidos e inhibición competitiva de algunos sustratos de la síntesis de poliaminas como arginina, ornitina y putrescina, impactando de manera directa la síntesis de purinas en el parásito (Basselin *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 2006). Finalmente, la PMD se acumula a nivel mitocondrial, lo que disminuye la concentración de PMD en el citoplasma y evita la saturación en el ingreso del fármaco (Mukherjee *et al.*, 2006).

Otro fármaco empleado es la paromomicina (PAR), un aminoglucósido natural, inyectable y de uso tópico, el cual es empleado en el tratamiento de la LV y LC e incluso es útil contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y otros protozoarios (Daga *et al.*, 2021; Davidson *et al.*, 2009). Su mecanismo de acción no ha sido completamente descrito, sin embargo, se ha sugerido su ingreso al parásito a través de endocitosis al unirse al lipofosfoglicano (LPG) presente en las membranas; debido a que el contenido de LPG en

amastigotes es menor, implica que interacciona con otras moléculas además del LPG (Jhingran *et al.*, 2009). Al ingresar al parásito, se ha reportado que su organelo blanco son los ribosomas específicamente el ARN ribosómico 30S, generando una lectura errónea del código genético por la incorporación de aminoácidos incorrectos en las cadenas polipeptídicas, interfiriendo con la síntesis de proteínas (Sundar & Chakravarty, 2008). Adicionalmente, se han reportado efectos sobre el metabolismo de lípidos e incluso sobre la actividad mitocondrial (Maarouf *et al.*, 1997).

Finalmente, sobre el ketoconazol (KTZ) se ha reportado que el ingreso del KTZ al parásito está mediada por la endocitosis. Este fármaco induce cambios en las regiones de dimetil esteroides de la membrana plasmática de promastigotes al inhibir la esterol-14 $\alpha$ -demetilasa, que conlleva a inestabilidad de la membrana plasmática (también conocida como C14 $\alpha$ -demetilasa o CYP51) (Berman *et al.*, 1984; Croft *et al.*, 2006). En amastigotes intracelulares, el parásito logra endocitar el colesterol presente en las membranas de las células hospederas y compensar inicialmente la interrupción de su producción de esteroides (Andrade-Neto *et al.*, 2011). De manera general, el KTZ genera pérdida de la actividad mitocondrial que lleva a su hiperpolarización y a la formación de vacuolas autofágicas, incremento en la cantidad de acidocalcisomas y la muerte por apoptosis (Nunes *et al.*, 2022).

### **1.1.8 Falla terapéutica (FT) en el tratamiento con MTF**

La FT de un determinado fármaco se define como el no cumplimiento de los criterios de cura (eficacia) esperados, los cuales, en la LC, dependen del investigador, de las herramientas de diagnóstico utilizadas y de los tiempos de seguimiento, entre otros factores. Sin embargo, en términos generales, comprende la completa re-epitalización de las lesiones,

sin infiltraciones inflamatorias ni la aparición de nuevas lesiones de LC dentro de los periodos de seguimiento, que oscilan entre 3 y 18 meses en la mayoría de los casos (Bustos *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2021; Mendes *et al.*, 2021). Desde la implementación de la MTF como tratamiento oral para la leishmaniasis, se ha observado disminución y variabilidad de su eficacia la cual, presentaba valores iniciales del 94% hace dos décadas aproximadamente, hasta registros más recientes que fluctúan entre el 66% y el 77%. En la tabla 1 se muestran los ensayos clínicos relevantes del tratamiento con MTF en pacientes con leishmaniasis del NM.

**Tabla 1** Eficacia del tratamiento de la Leishmaniasis del Nuevo Mundo con MTF

No.	Ref.	Especie y país	Esquema de tratamiento	Eficacia
1	(Mendes <i>et al.</i> , 2021)	Brasil <i>L. guyanensis</i>	Grupo 1: 2,5 mg MTF/kg/día, por vía oral, máximo 150 mg por 28 días, más placebo. Grupo 2: misma dosis de MTF, más gel con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) durante 28 días. Grupo 3: meglumina antimonioato (Sb <sup>V</sup> ) 20 mg/kg/día, IV, por 20 días Seguimiento por 180 días postratamiento. Placebo: gel de policarbonil tópico, 2 veces al día durante 28 días, grupo 1.	A 90 días: Grupo 1: 66% Grupo 2: 58% Grupo 3: 52% A 180 días: igual en los primeros dos grupos y en el grupo 3 bajó a 50%.
2	(Ware <i>et al.</i> , 2021)	Estados Unidos <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. infantum</i> <i>L. aethiopica</i>	Grupo único: MTF, con dosificación basada en el peso según las guías de la FDA: 50 mg dos veces al día (30-44 kg) o 50 mg tres veces al día para los	El 77% de los pacientes cumplieron con los criterios de cura.

		<i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	pacientes de peso igual o mayor a 45 kg). No hay grupo tratado con placebo. Los casos de falla terapéutica fueron tratados con otras alternativas terapéuticas.	
3	(Machado et al., 2021)	Brasil <i>L. braziliensis</i>	Grupo 1: 2,5 mg/kg/día, dosis máxima de 150 mg/día por 28 días, más placebo. Grupo 2: misma dosis de MTF más gel con GM-CSF. Grupo control con Sb <sup>V</sup> . Placebo: gel de policarbonato tópico sin GM-CSF, dos veces al día durante 28 días.	A 6 meses: Grupo 1: 76,6% Grupo 2: 75,6% Grupo control: 44,4%
4	(Sampaio et al., 2019)	Brasil	Grupo 1: MTF: 1,3 a 2 mg/kg/día/28 días Grupo 2: Sb <sup>V</sup> , 20 mg/kg/día por 30 días. Evaluación clínica a los 0, 30, 60, 90 y 190 días pt y cada 6 meses por 4 años. Sin placebo.	A 90 días: Grupo 1: 11 de 12 pacientes Grupo 2: 7 de 10 pacientes A 180 días: Grupo 1: 11 de 12 Grupo 2: 9 de 10
5	(Carnielli et al., 2019)	Brazil <i>L. infantum</i> Grupo 1 N=14, Montes Claros Grupo 2 N= 30, Teresina	Grupo 1: niños: 2,5 mg de MTF/kg/día durante 28 días. Adolescentes y adultos recibieron 50 mg dos veces al día. Grupo 2: 2,5 mg/kg/día para niños y 100 mg/día para adultos por 42 días No hacen uso de placebo.	Grupo 1: falla terapéutica en 8 pacientes, todos niños (57%). Eficacia del 43%. Grupo 2: eficacia del 67% en niños y 69% en adultos.
6	(López et al., 2013)	Colombia <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Grupo 1: MTF oral, 50 mg, 3 veces al día durante 28 días. Dosis total por paciente: 4200 mg. Grupo 2: termoterapia. Una sesión a 50 °C sobre la lesión y las áreas cercanas durante 30 seg. El número de aplicaciones	Grupo 1: cura por protocolo del 70% y por intención del 59%. Grupo 2: cura por protocolo del 64% y por

			dependió del tamaño de la lesión. Se administró antibiótico durante 10 días. No hacen uso de placebo.	intención del 58%. Recaídas: del 2,1% con MTF y del 4,1% con termoterapia.
7	(Rubiano <i>et al.</i> , 2012)	Colombia <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Grupo 1: Sb <sup>V</sup> 20 mg/kg/día por vía intramuscular durante 20 días. Grupo 2: 1,8 a 2,5 mg MTF/kg/día durante 28 días, por vía oral. Sin placebo.	N=116 pacientes. Falla terapéutica total en la semana 26: Grupo 1: cura, 28,6%. Grupo 2: cura, 12,7%.
8	(Chrusciak-Talhari <i>et al.</i> , 2011)	Brasil <i>L. guyanensis</i>	Grupo 1: 2,5 mg de MTF/kg/día por 28 días, máx. 150 mg. Pacientes ≤ 14 kg, 30mg/día; ≥ 15 y ≤29 kg, 50 mg/día; ≥30 y ≤45 kg, 100 mg/día; ≥46 kg, 150 mg/día. Grupo 2: Sb <sup>V</sup> 20 mg/kg/día IV por 20 días No hacen uso de placebo.	A 6 meses: Grupo 1: cura, 71,4% Grupo 2: cura, 53,6% Recaídas clínicas en el grupo de MTF del 25% y en el grupo de Sb <sup>V</sup> 42,9%.
9	(I. Vélez <i>et al.</i> , 2010)	Colombia <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i>	Grupo 1: MTF oral, 50 mg, 3 veces al día durante 28 días. Dosis total por paciente: 4200 mg. Grupo 2: Sb <sup>V</sup> , 20 mg/kg/día IM durante 20 días. No hacen uso de placebo.	Grupo 1: cura por protocolo del 69,8% Grupo 2: cura por protocolo del 85,1%
10	(Soto <i>et al.</i> , 2009)	Bolivia	Grupo 1: MTF durante 4 semanas. Grupo 2: grupo 1 que falló. MTF a seis semanas. Grupo 3: MTF durante 6 semanas. Régimen oral de MTF de 2,5 mg/kg/día. No hacen uso de placebo	Grupo 1: 71% tras 12 meses de seguimiento. Tasa de recaída de 29%. Grupo 2: 65%, después de 12 meses de seguimiento.

				Grupo 3: 75%.
11	(Soto <i>et al.</i> , 2007)	Bolivia <i>L. braziliensis</i>	Grupo 1: MTF a dosis de 2,5-3,3 mg/kg/día durante 28 días. Grupo 2: anfotericina B, 1 mg/kg en días alternos, por 45 dosis, IV. No hacen uso de placebo.	Grupo 1: 71% de cura (con más del 90% de disminución de la severidad de la mucosa).
12	(Soto <i>et al.</i> , 2004)	Colombia y Guatemala <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. mexicana</i> .	Grupo 1: 2,5 mg MTF/kg/día para pacientes mayores de 45 kg, 3 cápsulas de 50 mg diarias. Pacientes menores de 45 kg, dos cápsulas diarias (100 mg/día). Placebo: cápsulas de placebo para el tratamiento con MTF por vía oral.	A 6 meses: En Colombia: por protocolo del 91%. En Guatemala: por protocolo, 53 %.
13	(Soto <i>et al.</i> , 2001)	Colombia	Grupo 1: baja dosis: 50 mg, una cápsula diaria, durante 20 días. Grupo 2: 50 mg/día, días 1-7, y 100 mg/día, días 8-20 Grupo 3: 100 mg/día, días 1-7, y 150 mg/día, días 8-20. Grupo 4: 150 mg/día durante 28 días. No hacen uso de placebo.	Grupo 1: 64% Grupo 2: 67% Grupo 3: 100% Grupo 4: 89%  Por protocolo: Grupos 1 y 2 del 66% Grupos 3 y 4 del 94%

Distintos factores dependientes de los parásitos, el hospedero y del fármaco podrían influir en la respuesta variable a la MTF al igual que a otros fármacos. En el parásito, por ejemplo, sus características biológicas inherentes como el mosaico de aneuploidías que presenta, le permitirá regular sus genes a través de una aneuploidía masiva y la formación de episomas extracromosomales, regulados (a la alta o a la baja) en condiciones de estrés o en ambientes con presión de medicamentos, lo que conlleva a una mayor probabilidad de

generación de resistencia, comparadas con algunos parásitos (Obonaga *et al.*, 2014; Valdivia *et al.*, 2022; Vanaerschot *et al.*, 2014). También, la presencia prevalente del virus endosimbionte *Leishmaniavirus 1 (LRV1)* de doble cadena de ARN en los parásitos, en las formas clínicas de leishmaniasis consideradas metastásicas como la LC difusa y la LMC, promueve la inflamación y la persistencia del parásito (Ives *et al.*, 2011) y, se ha relacionado la presencia del virus con diámetros de lesiones más grandes y mayor carga parasitaria (Saberri *et al.*, 2022). Factores del hospedero como su inmunocompetencia, edad (estudios muestran mayor falla terapéutica en niños), dieta (dietas con ausencia de proteína, hierro, vitamina A y zinc aumentan el riesgo de progresión de la infección) y adherencia al tratamiento se asocian con la respuesta al tratamiento con MTF (Carnielli *et al.*, 2019; Castro *et al.*, 2017; Cojean *et al.*, 2012; OMS, 2023b). Por último, las características del fármaco, su estabilidad farmacológica y su farmacocinética (Dorlo *et al.*, 2014); esto último, de no ser adecuado, podría generar dosis subterapéuticas que promuevan la generación de fenotipos resistentes. Es importante tener en cuenta la vida media del fármaco, puesto que, en comparación con los Sb<sup>V</sup> que son eliminados entre el 80% y el 95% por la orina dentro de las 6 horas después de su administración, la vida media de la MTF es más larga y se extiende a aproximadamente 12 horas, lo que podría incrementar el riesgo de generar resistencia en los parásitos (Downing *et al.*, 2011; I. D. Vélez *et al.*, 2009).

### ***1.1.9 Marcadores moleculares de resistencia a MTF***

Definiendo la resistencia a la MTF como la disminución de la sensibilidad del parásito frente al fármaco, la resistencia a la MTF ha sido demostrada tanto en aislados clínicos de pacientes que fallaron al tratamiento con MTF como en cepas resistentes generadas mediante

presión selectiva *in vitro* (Carnielli *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2015). En algunos de estos parásitos, además de la baja susceptibilidad a la MTF, se han identificado marcadores moleculares asociados al fenotipo de resistencia. Uno de ellos es la sobreexpresión del gen *mdr1* de la familia de transportadores ABC, que codifica para una proteína transportadora de eflujo de medicamentos tipo glicoproteína-P (Pgp) dependiente de ATP, que en promastigotes de *L. tropica* resistentes a DMN con resistencia cruzada a MTF, la sobreexpresión de esta proteína se asoció con una menor acumulación del medicamento (J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Parodi-Talice, *et al.*, 2001). Igualmente, el 61% de los aislados clínicos de *L. tropica* obtenidos de pacientes con LC con FT a la MTF presentan mutaciones en el gen *mdr1* (Abadi *et al.*, 2021). De manera contraria, se ha identificado que otro transportador de membrana de la familia ABC codificado por el gen *abca3*, promueve el almacenamiento del medicamento en un aislado clínico de *L. braziliensis* obtenido de un paciente con FT, contribuyendo a un fenotipo de mayor susceptibilidad, demostrando la correlación inversa entre la expresión de este gen y la susceptibilidad a la MTF del aislado (Obonaga *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha demostrado el papel del complejo *mt/ros3* en la resistencia a MTF. Está compuesto por el gen *mt* que codifica una flipasa transportadora de la MTF y el gen *ros3* codificante de la subunidad del transportador *mt*. En promastigotes R-MTF de *L. donovani* con los genotipos *mt +/-* y *-/-* se observó una disminución del ingreso del medicamento con respecto a la WT (genotipo *mt +/+*) (F. J. Pérez-Victoria *et al.*, 2003; J. M. Pérez-Victoria *et al.*, 2006). Además, se han encontrado mutaciones en el gen *mt* asociadas a fenotipos de resistencia en *Leishmania*, como en *L. infantum* aislada de una paciente VIH positiva, quien presentó FT con SbV, AMB y MTF, identificándose un SNP en el gen que se tradujo en la modificación L832F (Cojean *et al.*, 2012). Otros SNP's han sido identificados en cepas R-MTF de *L. donovani* (F. J. Pérez-Victoria *et al.*, 2003), *L. major* (Coelho *et al.*, 2012) y *L.*

*amazonensis* (Coelho *et al.*, 2014). Sin embargo, en algunos aislados clínicos de *L. infantum* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *mt* y *ros3* ni se presentaron SNPs o inserciones/deleciones (Carnielli *et al.*, 2022). Igualmente, en aislados de *L. panamensis* y *L. braziliensis* no hubo correlación estadística entre la expresión del gen *mt* y la susceptibilidad a MTF, aunque algunos parásitos mostraron una expresión disminuida del transportador *mt* en cepas y una pérdida de susceptibilidad a MTF (Obonaga *et al.*, 2014). En aislados clínicos de *L. braziliensis* se demostró un incremento en los niveles de expresión del gen *ros3*, donde la cepa más susceptible presentó 0,5 veces más expresión del gen, aunque no se encontró una correlación significativa entre la sobreexpresión del mRNA de *ros3* y la susceptibilidad a la MTF. Resultados similares fueron encontrados con *L. major* donde la acumulación de transcritos de *ros3* no generó cambios significativos en la susceptibilidad a fármacos (Espada *et al.*, 2021). Estos resultados sugieren que sólo la sobreexpresión de este gen no es suficiente para conferir una mayor susceptibilidad. No obstante, es importante señalar que la deleción del gen *ros3* se correlaciona positivamente con una mayor resistencia al medicamento (Espada *et al.*, 2021).

Adicionalmente, se han demostrado cambios en la expresión de los genes codificantes de proteínas de choque térmico (*hsp*, por sus siglas en inglés), secretadas ubicuamente en la mayoría de las células, las cuales, desempeñan un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo y en la maduración de las proteínas. Se ha vinculado la regulación a la baja del gen *hsp70* (*hspa9b*, isoforma mitocondrial) con la R-MTF en promastigotes de *L. donovani*, así como su regulación a la alta, con el aumento de la sensibilidad a la MTF de las cepas nativas, sin relación con el aumento en el ingreso del medicamento (Vacchina *et al.*, 2016). Del mismo modo, el gen codificante de la proteína citoplasmática *hsp83* implicada en diferenciación celular y virulencia entre otros, fue sobre expresado en una cepa de *L. donovani* aislada de

un paciente con FT a los Sb<sup>V</sup>, que presentó mayor resistencia a MTF al ser comparada con otra cepa aislada de un paciente que sí respondía al tratamiento con Sb<sup>V</sup> (cepa 9551). Esta cepa, al ser transfectada con el gen *hsp83* y tratada posteriormente con MTF, exhibió una resistencia a SbIII 2 veces mayor que la de los parásitos control, así como resistencia cruzada a MTF, protección contra la fragmentación del ADN inducida por el tratamiento con MTF y un aumento del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en comparación con los parásitos 9551 sin transfectar. Este último efecto fue observado con 10  $\mu$ M de MTF, pero con 20  $\mu$ M de MTF la sobreexpresión de *hsp83* causó un descenso del  $\Delta\Psi_m$ , por lo que los autores propusieron que este gen funciona como una respuesta primaria no específica al estrés, hasta que los propios mecanismos de resistencia al medicamento emergen (Vergnes *et al.*, 2007).

Se han descrito otros genes que le permiten sobrellevar el estrés oxidativo causado por la MTF en el parásito, como la sobreexpresión del gen *sir2* (*silent information regulator*) en cepas de *L. donovani*, un regulador silencioso de la información mediante la desacetilación de las histonas y su delección, se ha relacionado con el incremento en la concentración de ROS (Mishra & Singh, 2013; Purkait *et al.*, 2015). Igualmente, el gen de la superóxido dismutasa de hierro (*FeSODA*) hace parte de los sistemas de detoxificación de ROS y posee un rol importante en la resistencia a MTF, ha sido regulado a la alta en parásitos R-MTF de *L. donovani*, actuando como factor protector de la citotoxicidad inducida por la MTF, donde los parásitos con sobreexpresión de *FeSODA* presentan menor exposición de fosfatidilserina (Getachew & Gedamu, 2012; Mishra & Singh, 2013).

## 1.2 Metodología

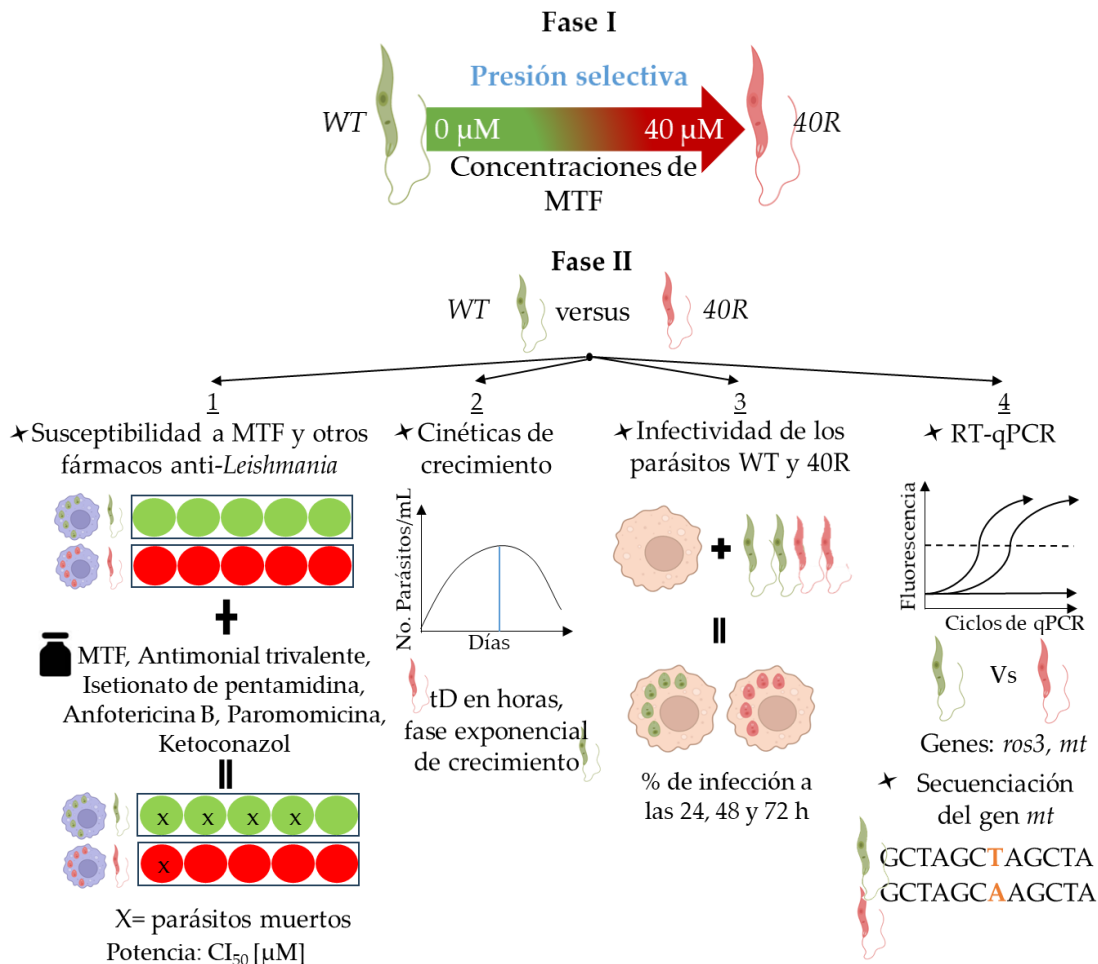
En el presente capítulo se generó la resistencia a 40  $\mu$ M de MTF y posteriormente se compararon sus características biológicas y moleculares con las de la cepa nativa.

### 1.2.1 *Diseño metodológico*

Se realizó en dos fases (**Figura 2**). La fase I incluyó los procedimientos para obtener las cepas R-MTF, y la fase II compiló los procedimientos empleados para determinar las diferencias biológicas y moleculares con la cepa WT.

### 1.2.2 *Parásitos y células*

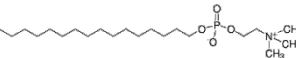
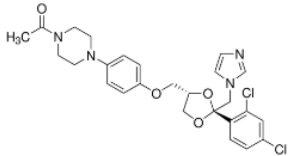
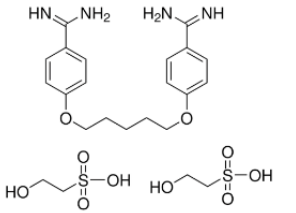
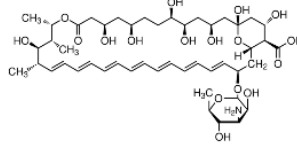
Los promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/LV78) se mantuvieron a 27 °C en medio de cultivo Schneider con 10% de suero fetal bovino inactivo por calor (SFBi). Las células utilizadas fueron THP-1 (ATCC-TIB-202, Rockville, MD, USA), procedentes de sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda. Ellas fueron cultivadas en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI-1640) con 10% de SBFi a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Las células THP-1 fueron diferenciadas a su fenotipo adherente-macrófago cultivándolas con 80 ng/mL de forbol 12-miristato-13acetato (PMA, Sigma-Aldrich) por 72 horas a 37 °C.

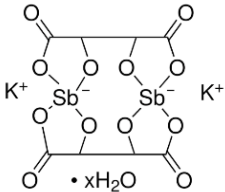
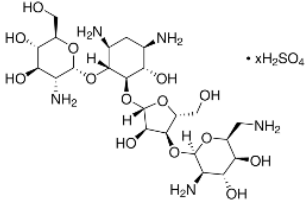
**Figura 2** Diseño metodológico de la caracterización de las cepas 40R y WT

### 1.2.3 Fármacos antileishmania

Los fármacos utilizados fueron la MTF, el KTZ, la AmB, el tartrato de antimonio y potasio ( $Sb^{III}$ ), la sal de isetionato de PMD y la sal de sulfato de PMM. La obtención y más detalles sobre estos fármacos se resumen en la **tabla 2**. Las soluciones stock para la MTF,  $Sb^{III}$  y PMM fueron preparadas pesando de 1 a 3 mg y hasta 1 mL de buffer salino fosfato (PBS, pH 7,0), y almacenadas a  $-4$  °C hasta su uso. Las SS del KTZ, PMD y AmB fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio Schneider sin SFBi para los promastigotes y en RPMI sin SFBi para las células de mamífero, como máximo un día antes.

**Tabla 2** Características de los fármacos antileishmania

Fármaco	Peso molecular (g/mol) pKa LogP	Estado y T°C almacenamiento	Estructura 2D	Solubilidad
Miltefosina (MTF) Goldbio M-750	407,6 1,28 LogP: 2,68	Sólido cristalino -20°C, protegido de la luz.		Sin datos del fabricante. PBS (pH 7,2): 2,5 mg/mL Etanol: 1,25 mg/mL DMSO: 0,8 mg/mL Agua: 10 mg/mL
Ketoconazol (KTZ)	531,43 6,75 LogP: 4,35	Polvo 2-8°C		DMSO; 10% de diclorometano; en agua: 0.087 mg/L
Pentamidina isetianato	592,68 12,13 LogP: 4	Polvo -20°C		Soluble en agua y poco soluble en etanol al 96%.
Anfotericina B	924,08 5,5-10,0 LogP: 0,8	Polvo 2-8°C		DMF: 2-4 mg/mL DMSO: 30-40 mg/mL En agua: insoluble

<p>Tartrato de antimonilo y potasio trihidratado, (Sb<sup>III</sup>)</p> <p>613,83 Pk: ND LogP: -0,08</p>	<p>Polvo Temperatura ambiental.</p>		<p>Soluble en agua, PBS.</p>
<p>Sulfato de Paromomicina (PAR)</p> <p>615,63 Pk: ND LogP: -2,9</p>	<p>Polvo Temperatura ambiente, seco y cerrado.</p>		<p>En PBS. En agua: 50 mg/mL store stock, almacenar entre 2 y 8°C.</p>

NOTA: T: temperatura; ND: no determinado. Estructuras 2D tomadas de <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en>

#### ***1.2.4 Generación de parásitos resistentes a MTF (R-MTF)***

Los parásitos fueron generados a partir de promastigotes mediante presión selectiva del fármaco a través de pases semanales con concentraciones crecientes de MTF a partir de 2,5  $\mu\text{M}$  seguida de 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40  $\mu\text{M}$  (Salazar-Villamizar & Escobar, 2022; Seifert *et al.*, 2003). Mediante revisión microscópica, a medida que su movilidad y densidad fue similar a la WT, se realizaba incremento de la concentración de MTF. Se registró el número de pases realizados hasta que los parásitos se adaptaran a 40  $\mu\text{M}$  de MTF. Igualmente se determinó el tiempo de adaptación de los parásitos a cada concentración de MTF. La cepa WT se mantuvo sin el fármaco durante todo el proceso de generación.

#### ***1.2.5 Prueba de susceptibilidad de los parásitos a la MTF***

Los promastigotes de las cepas R-MTF y WT de tres días de cultivo fueron ajustados a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL. Para esto fueron contados microscópicamente en un hemocitómetro empleando el colorante vital eosina (0,25% p/v, Sigma-Aldrich). Fueron colocados (100  $\mu\text{L}$ ) en placas estériles de 96 pozos y tratados con diluciones seriadas 1:2 o 1:3 de MTF (de 0,1 a 200  $\mu\text{M}$ ) por triplicado cada una durante 72 horas a 27 °C. Los parásitos de control de cada cepa fueron sembrados en las placas, solo con medio de cultivo sin MTF. La inhibición del crecimiento de los parásitos se determinó mediante el método de reducción de la rezasurina (Sigma-Aldrich) (Salazar-Villamizar & Escobar, 2022). Brevemente, se aplicaron 20  $\mu\text{L}$ /pozo de la solución de trabajo de rezasurina (0,12 mg/mL en PBS, pH 7,0), excepto en los pozos de control de medio, que contenían medio de cultivo sin parásitos. Las placas se incubaron durante 24 horas a 27 °C y se leyeron espectrofotométricamente en el lector de microplacas (BioTek Synergy H1, Winooski, VT,

USA) a 570 y 600 nm. Las absorbancias obtenidas en los parásitos con MTF se compararon con las obtenidas con los controles sin MTF (control de parásito, control de medio y control de rezasurina).

Para determinar los porcentajes de inhibición de los parásitos en cada concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%de\ inhibición = \left( 1 - \left( \frac{\%de\ reducción\ parásito\ tratado}{\%de\ reducción\ de\ parásito\ no\ tratado} \right) \right) \times 100$$

en una plantilla de Excel. Para calcular la actividad (potencia) de la MTF se utilizó el software Prism GraphPad 8.0.1 (2018, San Diego, CA). El índice de resistencia (IR) fue calculado comparando los resultados de la actividad inhibitoria de la MTF entre los parásitos R-MTF y la cepa WT ( $CI_{50}$  R-MTF/  $CI_{50}$ -WT). Un IR = 1 indica que ambas cepas mantienen la misma susceptibilidad; IR > 1 indica que la cepa R-MTF es menos susceptible que la cepa WT; y un IR < 1 indica que la cepa MTF-R es más susceptible que la cepa WT.

### 1.2.6 Cinética de crecimiento

Los promastigotes de las cepas R-MTF (10R y 40R) y la WT fueron sembrados en placas de 24 pozos a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL e incubados hasta 11 días a 27°C. Diariamente se contaron los parásitos vivos con eosina, tal como se describió anteriormente. El tiempo de generación (tD) en la fase de crecimiento exponencial fue calculado usando la fórmula  $tD = \frac{t}{3,3 \times (\log_{10} N - \log_{10} N_0)}$ , donde t representó el intervalo de tiempo de crecimiento exponencial,  $N_0$  el número inicial de parásitos y N el conteo del parásito después del intervalo de tiempo (Pelczar JR *et al.*, 1993). Los resultados fueron expresados como tD en horas (h)  $\pm$  desviación estándar, producto de un mínimo de 3

experimentos. Además, se analizó el tiempo de duración de la fase exponencial expresado en horas.

### ***1.2.7 Evaluación de la capacidad de infección de las cepas 40R y WT***

En una placa de 24 pozos se agregó una laminilla circular por pozo. Después, para la transformación de las células THP-1 a su fenotipo adherente, se ajustaron a 600.000 células/mL, agregando 1 mL por pozo, y luego se agregó 1 mL por pozo de PMA a 160 ng/mL (80 ng/mL x 2) en medio RPMI sin SFBi. Las células fueron incubadas por 72 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95% de HR. Posteriormente, se retiró todo el medio de los pozos y se agregó un mL los parásitos de las cepas 40R y WT, según correspondiera, ajustados a un radio de parásito: célula 5:1, es decir, 3x10<sup>6</sup> parásitos/mL y fueron incubados a 32°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de HR. Seguidamente, a las 24 h/48 h/72 h, se retiró todo el medio y se lavó cada pozo con 500 µL de PBS, y esas laminillas redondas se pasaron a otra placa para ser fijadas durante un min con metanol. Por último, fueron teñidas con Giemsa durante 15 min, lavadas con buffer de Giemsa y secadas al aire libre. Se determinaron los porcentajes de infección (número de células infectadas en 300 células) y los rangos de infección (no infectado – NI; de 0–10 amastigotes/célula; de 11–20 amastigotes/célula y >20 amastigotes/célula) por conteo microscópico.

### ***1.2.8 Susceptibilidad cruzada a otros fármacos antileishmania***

Los promastigotes de las cepas 40R y WT de tres días de cultivo fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de KTZ (1,23–100 µM), AmB y PMD (0,12–10 µM) y Sb<sup>III</sup> y PMM (3,70–300 µM) y con medio de cultivo sin fármaco, por triplicado, durante 72 horas a 27°C

y a 32°C. Las células THP-1 infectadas con amastigotes fueron tratados con diluciones 1:3 de los fármacos de PMD (1,85–50 µM) y Sb<sup>III</sup> (11,11–300 µM). El porcentaje de inhibición en promastigotes fue determinado con la prueba de resazurina según lo descrito anteriormente. En amastigotes intracelulares, una vez tratados, se retiró el medio y las células fueron fijadas con metanol absoluto durante 1 min, y posteriormente coloreadas con Giemsa. Los porcentajes de inhibición fueron determinados mediante la fórmula: % de infección =  $\frac{\text{No. células infectadas}}{300 \text{ células}} \times 100$  a través de conteo microscópico. Se calcularon los IR como se mencionó anteriormente.

### 1.2.9 Ensayo de toxicidad en células humanas THP-1

Las células THP-1 (600.000 células/mL) transformadas a su fenotipo adherente con PMA fueron tratadas con cada compuesto en concentraciones como 300, 100, 33.33, 11.11, 3.70 y 1,23 µM por 72 horas a 37°C. Seguidamente, se agregaron 20 µL de 2,5 mg/mL de MTT a cada pozo y después de 4 horas se retiró el medio de los pozos, se agregaron 100 µL de DMSO y se agitó la placa por 5-10 min hasta que los cristales se disolvieron (tonalidades moradas). Las placas se leyeron en el lector de placas a la longitud de onda de 580 nm. Para determinar los porcentajes de citotoxicidad de los fármacos en las células se utilizó la siguiente fórmula: % citotoxicidad =  $(1 - \frac{\% \text{de reducción células tratadas}}{\% \text{de reducción células no tratadas}}) \times 100$  en una plantilla de Excel. Para determinar la actividad (potencia) de la MTF se utilizó el software Prism GraphPad 8.0.1 (2018, San Diego, CA). Posteriormente, los índices de selectividad (IS) fueron calculados relacionando la CC<sub>50</sub> de las células y la CI<sub>50</sub> de los parásitos considerando un IS > 3 como fármaco/compuesto selectivo (Peña & Escobar, 2025).

### ***1.2.10 Marcadores moleculares de resistencia***

Los genes candidatos para la evaluación de la expresión génica fueron *ros3*, *mt*, 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) y *18S*. Adicionalmente, se realizó secuenciación del gen que codifica para la proteína *mt* y explorar mutaciones puntuales.

Los cebadores (*forward* y *reverse*) fueron diseñados en Benchling (2024, USA) y sintetizados por MacroGen (2024, Corea del Sur). Las secuencias y características en cuanto a tamaño (nucleótidos – nt), porcentaje de guanina-citocina (%GC) y temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) se detallan en la **tabla 3**.

### ***1.2.11 PCR convencional.***

Se realizó extracción del ADN de las cepas MTF-R40 y WT empleando el Kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, EE. UU.) y las muestras de ADN fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El gen *mt* tiene una longitud de 3320 pb por lo que fue dividido en 5 fragmentos para ser secuenciado mediante metodología Sanger (**Tabla 3**). Con base en lo anterior, se diseñaron los cebadores para todos los fragmentos con las condiciones propias para PCR convencional (% de guanina-citosina del 40 al 60%, 18 a 22 pb, temperatura de hibridación ( $T_m$ ) entre 50 y  $60^{\circ}\text{C}$ , entre otros); la temperatura de anillamiento de los cebadores fue ajustada con la temperatura de hibridación de la Taq Q5 ADN polimerasa (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase) y las muestras fueron enviadas para ser purificadas y secuenciadas en MacroGen. Finalmente se obtuvieron las secuencias crudas para ser analizadas. Estas secuencias fueron procesadas y analizadas en CodonCode Aligner (Centerville, EE. UU.).

**Tabla 3** Características de cebadores para pruebas moleculares.

Cebadores diseñados para PCR convencional y qPCR			
Genes	Secuencias de cebadores y tamaño (pb)	Características de cebadores	
<i>ros3</i> GenBank: KF993341.1	Expresión: F1 5' GCTACTTTACTGCCTCTGTGGA 3' R1 5' GCTGTCGTTGAATATAGCCAC 3' Amplicón: 164 pb	F: 22 nt 50% GC Tm: 59,8°C	R: 22 nt 50% GC Tm: 59,5°C
	Expresión: F1 5' GAACGACGCTTGCCTTCTGGAT 3' R1 5' GCTGAACATCTCGATGGAGCAC 3' Amplicón: 110 pb	F: 22 nt 54,55% GC Tm: 63,4°C	R: 22 nt 54,55% GC Tm: 61,6°C
<i>mt</i> GenBank: KF993342.1	Gen dividido en 5 fragmentos: Fragmento 1: Amplicón: 901 pb F1 5' CCAAAAAATACTCACACGTGC 3' R1 5' GGTTAGCTTCCACAAGAACATC 3'	F: 22 nt 41% GC Tm: 57°C	R: 22 nt 45% GC Tm: 58°C
	Fragmento 2: Amplicón: 985 pb F2 5' CCACGTTAAAGTACTCGCCATG 3' R2 5' GACCTGTGGTACGAGAAGTTC 3'	F: 22 nt 50% GC Tm: 61°C	R: 21 nt 52% GC Tm: 59°C
	Fragmento 3: Amplicón: 1000 pb F3 5' GCCAGTGAGCATCCAAATGATC 3' R3 5' GTACCGTACTTGAGCTATTT 3'	F: 22 nt 50% GC Tm: 61°C	R: 21 nt 38% GC Tm: 54°C
	Fragmento 4: Amplicón: 813 pb F4 5' CCTTGCTTGAACCTTCATGACGT 3' R4 5' CGTACGTATCAAGAACAGTGAG 3'	F: 22 nt 45% GC Tm: 60°C	R: 22 nt 45% GC Tm: 57°C

	Fragmento 5: Amplicón: 941 pb	F: 22 nt	R: 22 nt
	F5 5' GATTGTCTCAATTTTGCAGAGG 3'	41% GC	50% GC
	R5 5' TTGTCTTCTCCTTCCGTCATCG 3'	Tm: 56°C	Tm: 61°C
<i>gapdh</i> *	Expresión:	F: 22 nt	R: 22 nt
GenBank OL960389.1	F1 5' CGCGAAGAAGGTCGTGATCAGC 3'	59,09% GC	54,55% GC
	R1 5' GTCTCGATGCCGAAGTTCTCCT 3'	Tm: 64°C	Tm: 62,1°C
<i>18S</i> *	Expresión:	F:	R:
GenBank KX011484.1	F1 5' CAAGACGAACTACAGCGAAGGC 3'	22 nt	22 nt
	R1 5' TCATGGGTGTCATCGTTTGCAG 3'	54,55% GC	50% GC
		Tm: 61,8°C	Tm: 61,5°C

NOTA: Se muestran los cebadores empleados para la cuantificación de la expresión genética y secuenciación de marcadores moleculares de resistencia en cepas MTF-R y WT. \**Housekeeping* para qPCR. Tm: temperatura melting. F: forward. R: reverse. Pb: pares de bases. *gapdh*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los genes fueron tomados de la biblioteca de NCBI, 2024.

### ***1.2.12 RT-qPCR.***

Se determinó la expresión relativa de genes *ros3* y *mt*. La extracción de ARN total se realizó con Monarch total RNA Miniprep Kit y para su purificación se realizó tratamiento con DNase I (RNase-free) (New England Biolabs). La evaluación de los niveles de expresión fue ejecutada mediante RT-qPCR, empleando LunaScript® RT SuperMix Kit para la transcripción inversa del ARN. Los cebadores para la qPCR fueron diseñados con las condiciones adecuadas (% GC del 50 al 60%, 18 a 22 pb, Tm entre 59 y 65 °C, entre otros) (**Tabla 3**) y la qPCR fue realizada haciendo uso del kit Luna® Universal qPCR Master Mix según el protocolo del fabricante. La cantidad relativa de la expresión génica fue analizada empleando el programa Maestro CFX de Biorad.

### ***1.2.13 Análisis estadístico***

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado o cuadruplicado. Se realizó un análisis comparativo entre los parásitos de las cepas R-MTF y la cepa WT teniendo en cuenta las cinéticas de crecimiento, susceptibilidad cruzada en promastigotes y amastigotes intracelulares y marcadores moleculares, según correspondiera. Se aplicaron las pruebas de evaluación de distribución normal como Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnoff y posteriormente, los resultados se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1 para Windows aplicando la prueba paramétrica t – Student y ANOVA one-way. Valores de  $p \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

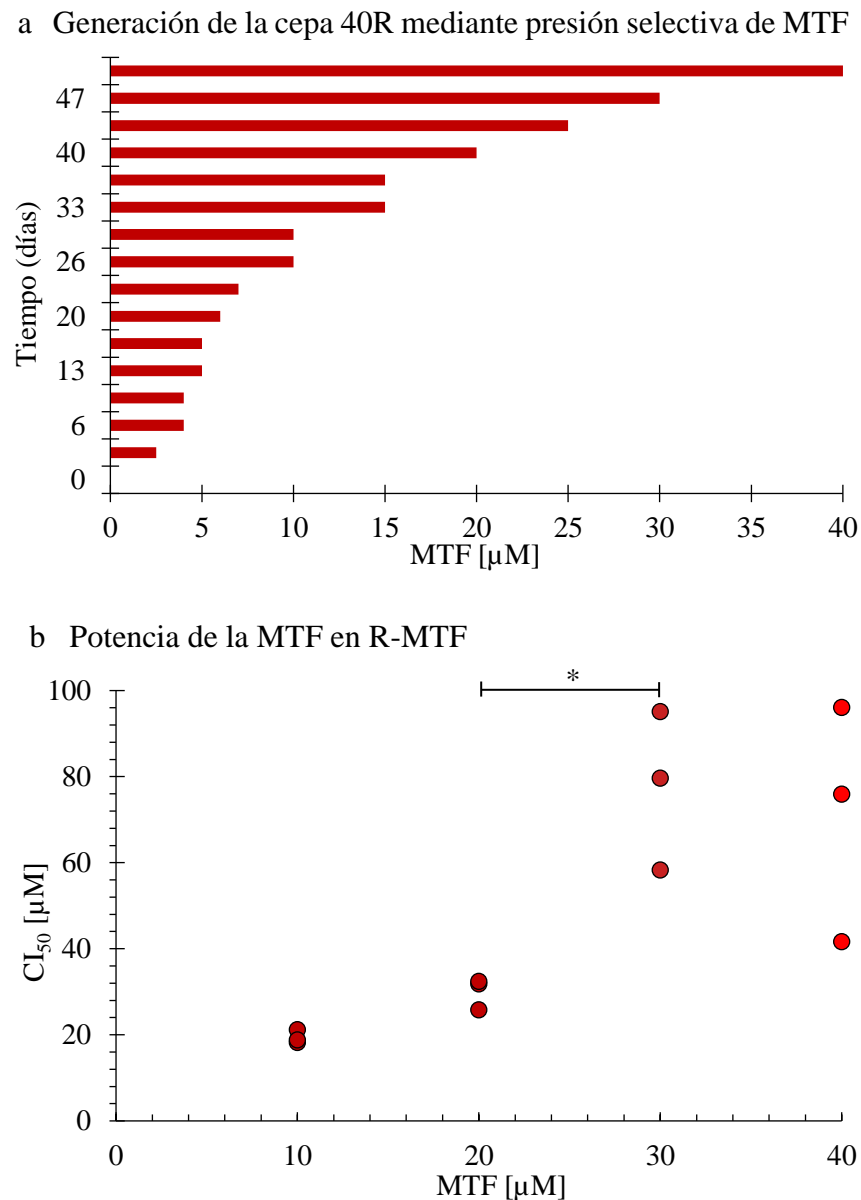
### 1.3 Resultados

#### 1.3.1 Generación de la resistencia a MTF

El cultivo de la cepa WT con concentraciones crecientes de MTF generó cepas de *L. amazonensis* resistentes (R) a 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{M}$  de MTF (R-MTF) (**Figura 3**).

Con relación a la susceptibilidad a MTF de los parásitos sometidos a concentraciones crecientes del fármaco, se observó una disminución de la susceptibilidad (incremento de la resistencia) evidenciado por el incremento de los valores de  $\text{CI}_{50}$  así: con 10  $\mu\text{M}$  de MTF se obtuvo un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $19,41 \pm 1,28 \mu\text{M}$ ; con 20  $\mu\text{M}$  la potencia del fármaco fue  $30,05 \pm 3,00 \mu\text{M}$ ; con 30  $\mu\text{M}$  la  $\text{CI}_{50}$  fue  $77,69 \pm 15,01 \mu\text{M}$ ; y, con 40  $\mu\text{M}$  una  $\text{CI}_{50}$  de  $69,06 \pm 17,75 \mu\text{M}$  (**Figura 3**). Se observaron diferencias estadísticas empleando la prueba ANOVA one-way entre las  $\text{CI}_{50}$  de las cepas 20R - 30R ( $p = 0,0001$ ), pero no entre las cepas 10R-20R y 30R-40R en las que aparentemente no hay diferencias en los niveles de resistencia ( $p > 0,05$ ). Las cepas 20R, 30R y 40R presentaron diferencias estadísticas frente a la cepa WT con valores de  $p = 0,031$ ,  $p = 0,0001$  y  $p = 0,0001$ , respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas entre la cepa WT y 10R ( $p > 0,05$ ).

**Figura 3** Tiempo de adaptación a concentraciones crecientes de MTF (0–40  $\mu\text{M}$ ) y potencia de la MTF en distintos niveles de resistencia de promastigotes de *L. amazonensis*

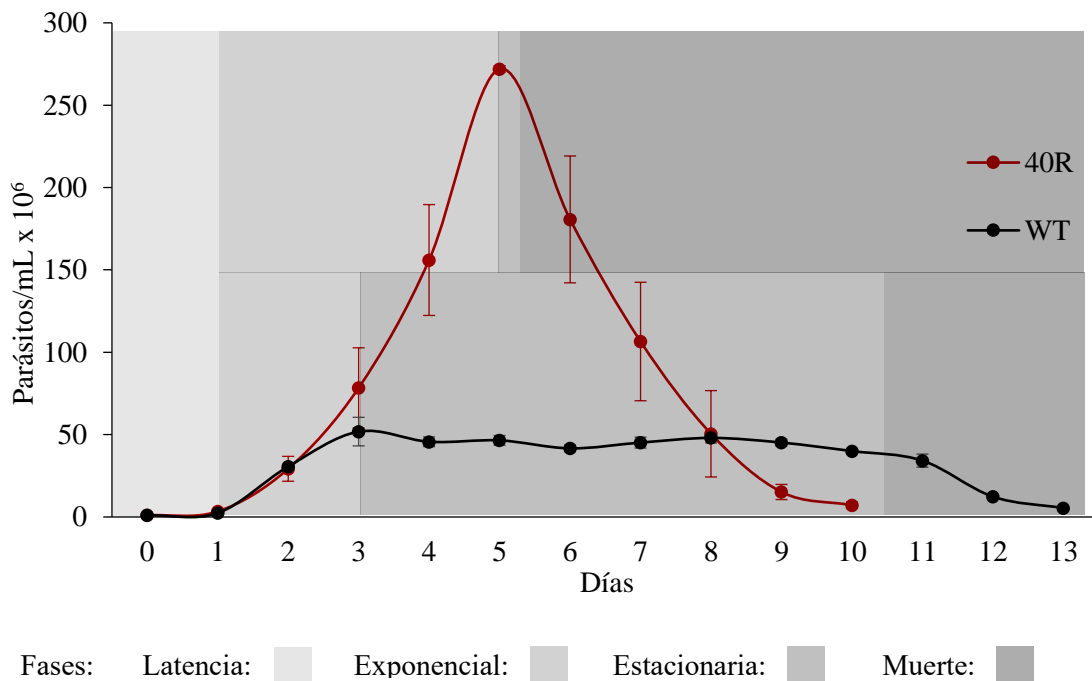


Nota: (a) tiempo de generación frente a las concentraciones crecientes de MTF y (b) potencia ( $\text{CI}_{50}$ ) de la MTF en las cepas 10R, 20R, 30R y 40R. Para determinar las diferencias, se utilizó la prueba ANOVA one-way, considerándose significativo un valor de  $p < 0,05$ . \* = Valor de  $p < 0,05$ . Los datos se obtuvieron de tres réplicas biológicas independientes.

### 1.3.2 Cinética de crecimiento de la cepa WT vs 40R

La fase de latencia de ambas cepas fue de aproximadamente de 24 horas, seguida de una fase de crecimiento exponencial para la cepa WT de 48 horas y una fase estacionaria sostenida hasta el día 11 en donde se inicia su fase de muerte (**Figura 4**). De manera distinta, el crecimiento logarítmico de la cepa 40R presenta una duración de 96 horas, con una fase estacionaria indistinguible a las 24 h, dado que ingresa en fase de muerte acelerada a las 96 horas. Las diferencias en la duración de la fase exponencial fueron significativas ( $p = 0,03$ ), lo que sugiere que la cepa 40R mantiene su crecimiento durante el doble de tiempo que la cepa WT. Adicionalmente, los tD presentaron diferencias significativas de  $13,76 \pm 0,89$  y  $9,23 \pm 2,63$  (horas  $\pm$  DE) para las cepas 40R y WT, respectivamente ( $p = 0,042$ ), lo que indica que la cepa 40R tarda alrededor de 4 horas más en duplicarse durante su fase de crecimiento exponencial.

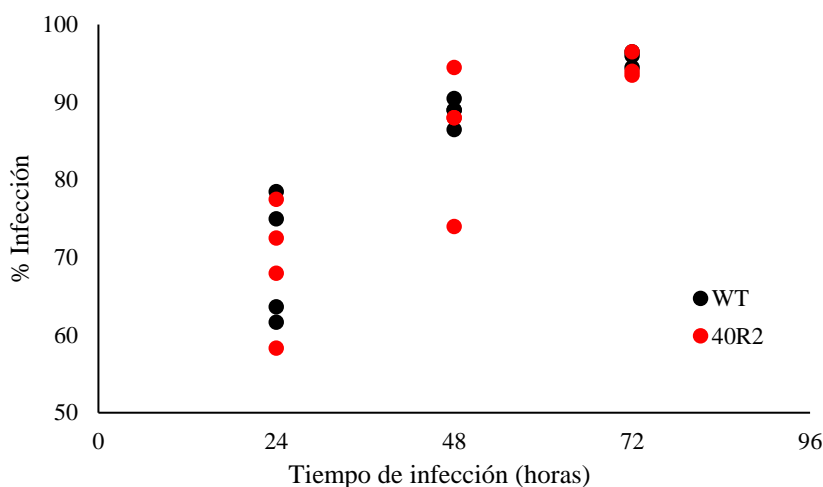
**Figura 4** Cinéticas de crecimiento de la cepa nativa y 40R de *L. amazonensis*.



NOTA: se muestra el promedio del número de parásitos/mL  $\pm$  DE de la cepa 40R (curva roja) y WT (curva negra) en 3 réplicas biológicas. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante la prueba t de Student. Las fases de crecimiento de la cepa 40R (arriba) y de WT (abajo) se muestran en tonos grises.

### ***1.3.3 Capacidad de infección de las cepas 40R y WT***

Los resultados permiten indicar que la resistencia de 40R no afecta la infección por el parásito en células THP-1 en comparación con la cepa nativa. Los porcentajes de infección encontrados a las 24 h son los que presentan la mayor variación (**Figura 5**). A las 48 horas se observa una mayor uniformidad de los datos y, finalmente, a las 72 horas, alcanzan un nivel de infección similar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre las cepas 40R y WT en relación con los tiempos de infección (**Tabla 4**). Adicionalmente, se observó incremento en los niveles de infección por célula en relación con el tiempo, encontrando que a las 72h se obtuvo mayor presencia de amastigotes/célula en las dos cepas y con diferencias significativas ( $p = 0,004$ ) en la subcategoría de 11-20 amastigotes/célula, presentando la cepa WT mayor grado de infección (**Tabla 4**).

**Figura 5** Capacidad de infección de las cepas de *L. amazonensis* 40R y WT

NOTA: la figura muestra los porcentajes de la capacidad de infección total de las cepas WT (negro) y 40R (rojo) a las 24, 48 y 72 horas. Se realizaron 3-4 réplicas biológicas y las diferencias entre grupos (WT vs 40R) se determinaron utilizando la prueba t de Student. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en los porcentajes de infección de ambas cepas, en ninguno de los tiempos evaluados.

**Tabla 4** Niveles de infección de las cepas WT y 40R en las células THP-1 después de diferentes tiempos.

Cepa	Porcentaje del número de amastigotes/célula $\pm$ DE								
	24 h			48 h			72 h		
	1-10	11-20	>20	1-10	11-20	>20	1-10	11-20	>20
WT	90,25	7,66 $\pm$	0,43 $\pm$	66,57 $\pm$	20,46 $\pm$	12,97 $\pm$	56,49 $\pm$	10,95 $\pm$	32,55 $\pm$
	$\pm$ 10,8	7,97	0,61	4,38	3,44	3,73	2,48	2,17*	0,63
40R	89,71 $\pm$	7,54 $\pm$	0,21 $\pm$	71,90 $\pm$	21,58 $\pm$	6,51 $\pm$	58,91 $\pm$	21,06 $\pm$	20,02 $\pm$
	10,29	6,33	0,29	7,85	6,49	3,67	11,46	1,03	10,77

Nota: Las células THP-1 fueron infectadas con las cepas WT y 40R. Después de 24, 48 y 72 h fueron analizadas microscópicamente para calcular el número de amastigotes/célula. Los porcentajes se clasificaron en 1-10, 11-20 y >20 amastigotes/célula. Se aplicó la prueba t de

Student para comparar los porcentajes de infección de WT vs 40R, considerando significativo un valor de  $p < 0,05$ . Se realizaron 3-4 réplicas biológicas.  $*p = 0,004$ , en comparación con la cepa 40R.

### ***1.3.4 Susceptibilidad cruzada con otros fármacos antileishmania***

#### **1.3.4.1 Susceptibilidad cruzada de 40R versus WT**

Se observó un incremento del 900% en los valores de  $CI_{50}$  de MTF los cuales fueron de 7,63 a 69,10  $\mu\text{M}$  en la cepa WT y 40R, respectivamente; y, como se menciona en la sección 1.2.5., un  $IR > 1$  indica que la cepa R-MTF es menos susceptible que la cepa WT y para la MTF el IR fue de 9,06 ( $p = 0,001$ ) señalando un incremento en la resistencia para la cepa 40R (**Figura 6**). En la AmB no se observaron diferencias significativas en los valores  $CI_{50}$  pasando de 0,62 a 0,63  $\mu\text{M}$ , y un IR de 1,00. Por otro lado, la resistencia adquirida a MTF parece interferir con la respuesta frente a los fármacos de PMD y  $Sb^{III}$  causando un decremento significativo en los valores de  $CI_{50}$  de 0,48 a 0,26  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,005$ ) y de 81,52 a 48,00  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,04$ ), con IR de 0,53 y 0,59, respectivamente. El KTZ mantuvo su potencia constante sin importar la resistencia de la 40R, con una potencia en la cepa WT de 5,96  $\mu\text{M}$  y de 6,2  $\mu\text{M}$  para la 40R, al igual que la PMM que presentó valores de 96,16 en WT y de 119,86 en la cepa 40R. Los IR fueron similares e indiferentes: 1,04 y 1,25, respectivamente.

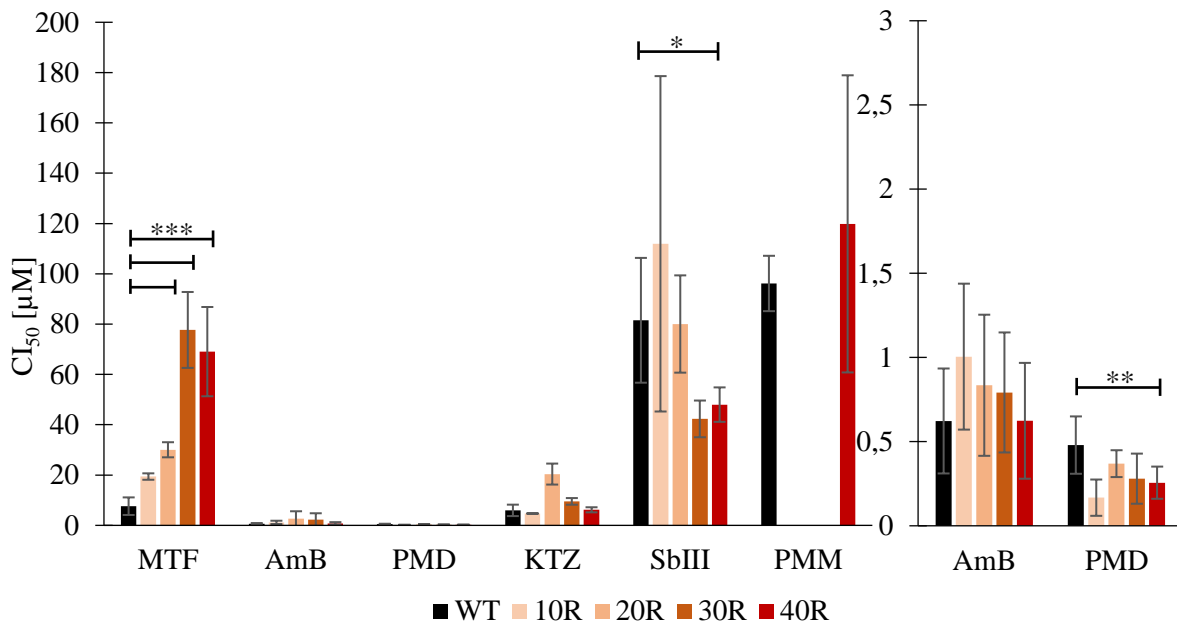
Los IS se consideraron relevantes cuando fueron  $> 3$  dado que indican que la acción del fármaco es selectiva para los parásitos y no sobre las células THP-1 (**Tabla 5**). En ese sentido, los fármacos evaluados presentaron  $IS > 3$  para la cepa WT, a excepción de  $Sb^{III}$  ( $IS = 1,5$ ). En la cepa 40R, además del  $Sb^{III}$ , la MTF y la PMM disminuyen la selectividad ( $IS < 3$ ). La reducción de la selectividad de la MTF para la cepa 40R se espera debido al incremento

de la resistencia del parásito. En contraste, la PMD incrementa su selectividad pasando de un IS de 168,74 a 315,83, indicando una mayor selectividad de este fármaco para los parásitos 40R que para su célula huésped.

#### **1.3.4.2 Susceptibilidad cruzada de promastigotes 10R, 20R y 30R versus WT**

La susceptibilidad cruzada a otros fármacos antileishmania de las cepas de resistencia intermedia (10R, 20R y 30R) se evaluó durante su generación. No se observaron diferencias en la susceptibilidad a la AmB entre la WT y las cepas R-MTF, como 10R, 20R, 30R y 40R ( $p > 0,05$ ) (**Figura 6**). Sin embargo, frente a los fármacos PMD,  $Sb^{III}$  y KTZ no se analizaron las diferencias estadísticas debido a que solo se realizaron dos ensayos independientes; por lo tanto, los datos no permitirían realizar una conclusión inferencial. En este sentido, frente al fármaco  $Sb^{III}$ , la cepa 10R presentó un valor de  $CI_{50}$  promedio de  $111,93 \pm 66,67 \mu M$ , la cepa 20R de  $80,05 \pm 19,33 \mu M$  y la cepa 30R de  $42,32 \pm 7,30 \mu M$ . En relación con la PMD, la cepa 10R exhibió un  $CI_{50}$  de  $0,17 \pm 0,11 \mu M$ , la 20R de  $0,37 \pm 0,09 \mu M$  y la 30R de  $0,28 \pm 0,15 \mu M$ . El KTZ exhibió una potencia de  $4,71 \pm 0,16 \mu M$  en la cepa 10R, de  $20,39 \pm 4,17 \mu M$  en la 20R y de  $9,53 \pm 1,32 \mu M$  en la 30R.

**Figura 6** Susceptibilidad de las cepas WT, 10R, 20R, 30R y 40R a MTF y otros fármacos antileishmania



NOTA: (a) Potencia de los fármacos frente a cada una de las cepas R-MTF y WT. (b) Muestra una magnificación de la potencia de AmB y de PMD presentes en la gráfica. Para evaluar las diferencias de todas las cepas R-MTF en comparación con la cepa WT, se aplicó la prueba ANOVA one-way para analizar el fármaco AmB y MTF; la prueba t de Student se aplicó para PMD, PMM, KTZ y  $Sb^{III}$  considerando solo WT y 40R, debido a que en las cepas de resistencia intermedia solo se tenían dos réplicas independientes y con la PMM no se realizaron ensayos. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ . Los niveles de significancia fueron \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

**Tabla 5** Potencia de los fármacos antileishmania en promastigotes de *L. amazonensis* y en células THP-1

Fármacos	MTF	AmB	PMD	KTZ	Sb <sup>III</sup>	PMM	
<b>THP-1: CC<sub>50</sub> ±DE</b>	36,64±2,37	23,67±9,56	80,89±26,79	27,24±8,54	121,97±58,31	300±0	
<b>Promastigotes CI<sub>50</sub> ± DE</b>	<b>WT</b>	7,63±3,50	0,58±0,33	0,48±0,17	5,97±2,27	81,52±24,81	96,16±11,01
	<b>10R</b>	19,41±1,28***	1,19±0,66*	0,17±0,11*	4,71±0,16	111,93±66,67	NR
	<b>20R</b>	30,05±3,00***	2,62±2,98	0,37±0,08	20,39±4,17*	80,05±19,33	NR
	<b>30R</b>	77,69±15,09*	2,32±2,49	0,28±0,15	9,53±1,32	42,33±7,30*	NR
	<b>40R</b>	69,06±17,75***	0,78±0,50	0,26±0,10*	6,16±1,01	48,00±6,85*	119,86±59,06
<b>IS</b>	<b>WT</b>	4,81	38,01	168,74	4,57	1,50	3,12
	<b>10R</b>	1,89	19,92	484,12	5,78	1,09	NR
	<b>20R</b>	1,22	9,03	219,13	1,34	1,52	NR
	<b>30R</b>	0,47	10,18	289,00	2,86	2,88	NR
	<b>40R</b>	0,53	37,95	315,83	4,41	2,54	2,50
<b>IR</b>	<b>10R</b>	2,54	1,61	0,35	0,79	1,37	NR
	<b>20R</b>	3,94	4,21	0,77	3,42	0,98	NR
	<b>30R</b>	10,19	3,73	0,58	1,60	0,52	NR
	<b>40R</b>	9,06	1,00	0,53	1,04	0,59	1,25

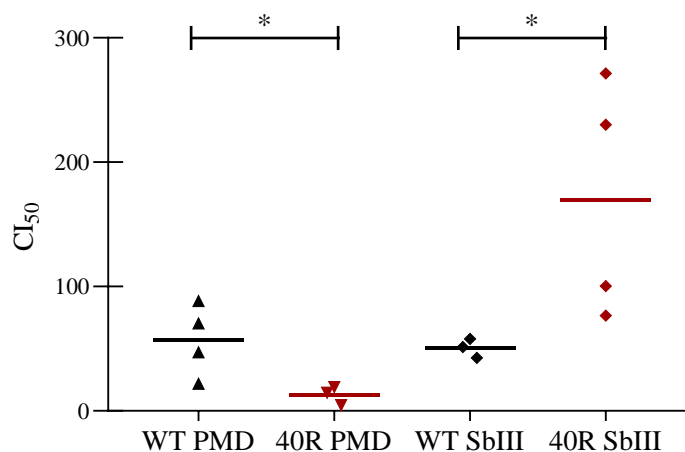
NOTA: Se aplicó la prueba t de Student para evaluar las diferencias entre R-MTF y WT. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

Los niveles de significancia fueron \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ . Los valores de CC<sub>50</sub> y CI<sub>50</sub> se expresan en  $\mu\text{M}$ . CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50; CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50; DE: desviación estándar; IS: índice de selectividad; IR: índice de resistencia. NR: no realizado; MTF: miltefosina; AmB: anfotericina B; PMD: sal de pentamidina; KTZ: ketoconazol; Sb<sup>III</sup>: antimonio trivalente; PMM: paromomicina.

### 1.3.5 Susceptibilidad cruzada de otros fármacos antileishmania en amastigotes intracelulares 40R

La cepa 40R fue estadísticamente más sensible a la PMD que la cepa WT ( $p = 0,026$ ; semejante a lo observado en promastigotes). La cepa 40R presentó una resistencia significativamente mayor que la WT frente al  $Sb^{III}$  ( $p = 0,044$ ) (**Figura 7**). El IS de la PMD en la cepa 40R fue mayor que el de la cepa nativa, con valores de 6,35 y 1,42, respectivamente, lo que indica que la PMD es más selectiva para el parásito R-MTF en comparación con la cepa WT. En contraste, aunque el  $Sb^{III}$  no presentó selectividad en la cepa WT (IS=2,41), fue aún menos selectivo en la cepa R-MTF (IS=0,72) (**Tabla 6**). El IR fue mayor en el  $Sb^{III}$  (3,35) que en la PMD (0,22).

**Figura 7.** Potencia de la PMD y el  $Sb^{III}$  en amastigotes intracelulares de cepas 40R y WT de *L. amazonensis*



NOTA: Se muestran los resultados de 3-4 ensayos biológicos independientes. Se observa la media (línea horizontal) de las  $CI_{50}$  por grupo. Se analizaron las diferencias entre los grupos (WT vs 40R) empleando la prueba t de Student. Nivel de significancia \* ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 6** Potencia de la PMD y Sb<sup>III</sup> en células THP-1 infectadas con amastigotes de *L. amazonensis* WT y 40R

Fármacos [μM]	40R		WT		IR
	CI <sub>50</sub> ± DE	IS	CI <sub>50</sub> ± DE	IS	
PMD	12,7 ± 6,05	6,35*	56,92 ± 24,92	1,42	0,22
Sb <sup>III</sup>	169,635 ± 82,79	0,72*	50,65 ± 6,28	2,41	3,35

NOTA: Se muestran los resultados de 3-4 ensayos biológicos independientes en células THP-1. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student. \* $p \leq 0,05$ , en comparación con la cepa WT. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ . IS: índice de selectividad; IR: índice de resistencia.

### 1.3.6 Análisis molecular

#### 1.3.6.1 Secuenciación

En la secuenciación del gen *mt* solo se tuvieron en cuenta los fragmentos 2, 3, 4 y 5 puesto que los cebadores del fragmento 1 mostraron tener baja especificidad (datos no mostrados). De los cuatro fragmentos secuenciados en doble sentido, se encontró inicialmente una mutación en la cepa 40R en la posición 2235, que pasó de una citosina en la WT a una adenina en la 40R. Esta mutación causó el cambio a un codón de parada en el ARN (UGA) durante la transcripción, generando una proteína truncada de 744 aminoácidos en la cepa 40R, mientras que en la WT corresponde a 1104 aminoácidos (**Figura 8**).

**Figura 8** Secuencias del gen *mt* en las cepas *WT* y *40R* de *L. amazonensis*

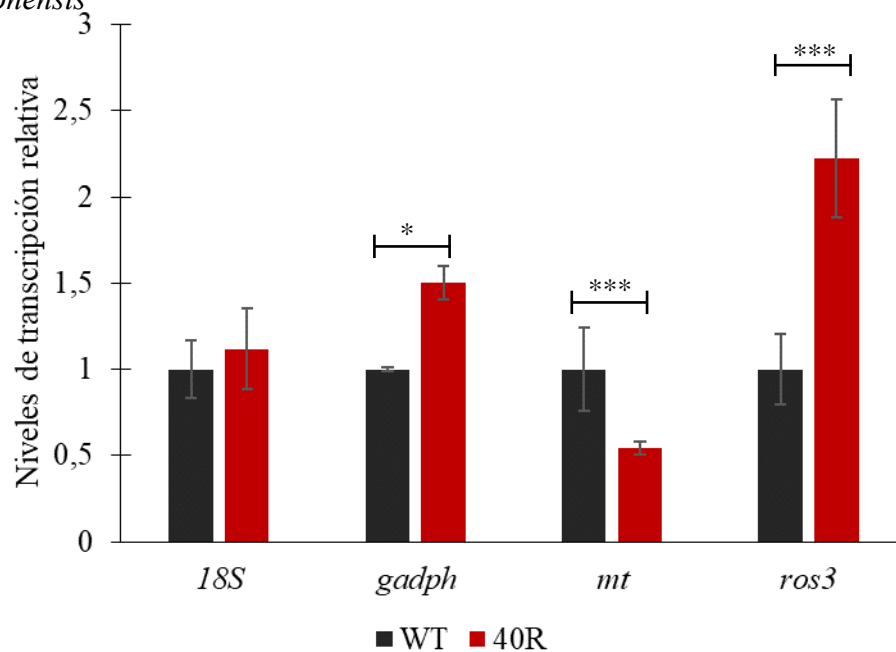
Nota: **a.** corresponde en orden descendente a la secuencia del gen *mt* en NCBI (Gen\_2), seguido de la secuencia forward (WT\_Frag2\_F) y reverse (WT\_Frag2\_R) de la cepa nativa en cultivo, y la secuencia forward (40R\_Frag2\_F) y reverse (40R\_Frag2\_R) de la cepa 40R en cultivo. Se señala la mutación encontrada en la cepa 40R (adenina), que correspondía a una citocina en la WT y en la secuencia registrada en NCBI. La figura **b** muestra los picos claros obtenidos en la secuenciación en orden descendente, de la secuencia forward y reverse

en la cepa WT, y forward y reverse de la cepa 40R. Secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger (Macrogen).

### 1.3.6.2 Niveles de expresión de los genes

Al realizar la qPCR se observó que la expresión del gen *18S* era estable en ambas cepas, pero *gadh* incrementó su expresión de manera significativa en la cepa 40R ( $p = 0,0005$ ), por lo tanto, al tener un solo gen *housekeeping* se decidió realizar una cuantificación relativa ( $\Delta Cq$ ). La cuantificación relativa del gen *mt* mostró una menor expresión en la cepa 40R, con diferencias significativas ( $p = 0,0007$ ); sin embargo, de manera contraria, el nivel de expresión del gen *ros3* fue significativamente mayor en la cepa 40R ( $p = 0,0001$ ) (**Figura 9**).

**Figura 9** Niveles de transcripción de los genes *18S*, *gadh*, *mt* y *ros3* en las cepas WT y 40R de *L. amazonensis*



Nota: los niveles de expresión relativa del gen *18S* ribosomal, *gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *mt* (transportador de miltefosina) y *ros3* (subunidad del transportador de miltefosina) en las cepas WT y 40R de *L. amazonensis* fueron calculados empleando el método Cantidad Relativa ( $\Delta Cq$ ) del programa CFX Maestro de Biorad. Se aplicó una prueba t de Student para analizar los resultados comparando la cepa 40R frente a la WT. Un valor de  $*p \leq 0,05$  fue considerado significativo.

#### 1.4 Discusión

La generación del fenotipo resistente a MTF en *Leishmania* por presión selectiva de fármacos *in vitro* ha probado ser un método eficaz en el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia a MTF. En nuestro trabajo la resistencia a 40  $\mu\text{M}$  de MTF alcanzada en menos de dos meses y 15 pases en promastigotes de *L. amazonensis*, confirma la facilidad en la adquisición de la resistencia a este fármaco. Considerando que el esquema terapéutico en pacientes es de 28 días (MSPS, 2023), abre la posibilidad de la resistencia parasitaria en los pacientes. En este sentido, distintas especies como *L. donovani* y *L. infantum* han sido generadas con presiones de MTF entre 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  (un estudio hasta con 74  $\mu\text{M}$ ) en un tiempo promedio de 3 a 6 meses (Hendrickx *et al.*, 2014; Saboia-Vahia *et al.*, 2022; Seifert *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2016a). Trabajos realizados con *L. amazonensis* para la obtención de una cepa resistente a 40  $\mu\text{M}$  de MTF, muestran tiempos de generación similares al presentado aquí, aproximadamente 2 meses (Neira *et al.*, 2025); otros autores solo reportan la obtención de la resistencia en *L. amazonensis* pero hasta llegar durante su generación a 100  $\mu\text{M}$ , lo que podría indicar un tiempo mayor para su generación (Coelho *et al.*, 2014). De manera general, las investigaciones reportadas muestran la pérdida de la potencia del fármaco (pérdida de susceptibilidad de los parásitos – R) generalmente con una

CI<sub>50</sub> entre  $6,31 \pm 3,4 \mu\text{M}$  y  $19,96 \pm 2,2 \mu\text{M}$  para la cepa WT y, en la cepa R valores de CI<sub>50</sub> de  $30,65 \pm 9,5 \mu\text{M}$  (IR=5) a  $167,36 \pm 16,8 \mu\text{M}$  (IR no reportado) (Coelho *et al.*, 2014; Neira *et al.*, 2025). Nosotros encontramos resultados similares observando un incremento proporcional de la potencia del fármaco en las distintas cepas R-MTF; alcanzándose un IR = 9,06.

Una vez generados los parásitos 40R, fue necesario la realización de estudios de caracterización biológica y molecular comparado estos con los parásitos WT para determinar características diferenciales entre estos. Los cambios encontrados muestran la manera en que el parásito se adapta a las condiciones estresantes impuestas por la MTF y determina el costo que tiene que pagar el parásito para sobrevivir a condiciones adversas. Generalmente estos experimentos se basan en determinar características como crecimiento, infectividad, resistencias cruzadas, metaciclogénesis, entre otras.

El crecimiento de la cepa 40R alcanzó valores superiores (5 veces mayores) sin embargo, tardó 4 horas más en duplicarse durante su fase exponencial que la WT indicando una disminución en la aptitud (fitness) de los promastigotes para proliferar. Este parámetro realizado en condiciones *in vitro*, se refiere a cómo el parásito se multiplica en condiciones que se asemejan a la de los flebótomos. Una vez que los amastigotes son ingeridos por la mosquita, estos se transforman en promastigotes procíclicos, no infectivos y proliferativos, a promastigote metacíclicos inmóviles e infectivos, necesarios para la transmisión de la enfermedad. En nuestro caso, los parásitos mostraron una mayor proliferación, sin embargo, una fase de latencia y de muerte más rápida que los WT, pudiéndose inferir que su fase de infección es más corta que en los parásitos WT. Estos resultados son similares a los reportados en otras cepas de *L. amazonensis* con una fase exponencial iniciada a partir del segundo día y una duración aproximada de 24 h, manteniendo una fase estacionaria

prolongada hasta por 8 días (Mule *et al.*, 2024). Adicionalmente, la infección del vector *Lutzomyia ovallesi* con amastigotes de *L. amazonensis* provenientes de modelo murino mostró que el crecimiento parasitario en sus intestinos resultaba en un tD de 12,19 horas, similar a nuestro resultado (Mule *et al.*, 2024). Las cinéticas de crecimiento de los promastigotes puede ser diferentes dependiendo de la cepa de *Leishmania*, el tiempo de los parásitos con la presión del fármaco, el número de pases y las condiciones ambientales (la temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes). Por ejemplo, promastigotes de *L. infantum* resistentes a 25R crecieron significativamente menos (< 40 millones/mL) que su cepa WT correspondiente (cerca de 80 millones/mL) (Saboia-Vahia *et al.*, 2022), pero promastigotes de *L. major* R-MTF presentaron un crecimiento similar a la WT de aproximadamente 50 millones/mL (Turner *et al.*, 2015). Comprender la cinética (metaciclologénesis), especialmente en los vectores, es crucial para entender la enfermedad, controlar la transmisión de la *Leishmaniasis* y desarrollar tratamientos eficaces. Esto último porque la susceptibilidad a los fármacos incide en el crecimiento de las cepas de *L. braziliensis* dado que cepas sensibles a Glucantime mostraron menor tasa de crecimiento, en comparación con las cepas más resistentes (Spangler *et al.*, 1998). Además de la especie, el fármaco objeto de la resistencia puede influir, influyendo o no en su proliferación, por ejemplo, promastigotes de *L. braziliensis* resistentes a PMD y KTZ presentaron un crecimiento similar a su cepa nativa (Salazar-Villamizar & Escobar, 2022).

En relación con la infectividad en células, encontramos niveles de infección similares entre las dos cepas en cada uno de los tiempos evaluados sugiriendo que el fitness del parásito no se ve afectado en relación con su capacidad de infección. Resultados opuestos se han reportado en amastigotes intracelulares de *L. infantum* R-MTF que mediante presión selectiva mostraron una  $CI_{50} > 20 \mu\text{M}$  e infección a las 24 h significativamente menor que la

cepa WT mostrando además la no infección en ratones BALB/c (Eberhardt *et al.*, 2019). Por otro lado, parásitos de *L. major* resistentes a 40  $\mu$ M de MTF (40R), lograron infectar de manera similar macrófagos murinos a las 24 h pero fueron incapaces de mantener la tasa de infección a las 48 h, mostrando una reducción significativa en comparación con la cepa WT (Turner *et al.*, 2015). Esto se trasladó a la infección en ratones BALB/c, donde la infección con *L. major* 40R mostró demora en la aparición de lesiones y con características atenuadas comparada con la WT (Turner *et al.*, 2015). En nuestro trabajo no evaluamos el efecto de la R-MTF en la infección en ratones.

La resistencia cruzada a otros fármacos disminuye las opciones farmacológicas para los tratamientos de la *Leishmaniasis*. Con relación a la PMD y el Sb<sup>III</sup>, este trabajo se encontró que los promastigotes de la cepa 40R fue significativamente más sensible a la PMD y Sb<sup>III</sup> y que en los amastigotes intracelulares la cepa 40R fue más sensible a la PMD, pero más resistente al Sb<sup>III</sup>. Se han reportado: que pacientes con FT a MTF han fallado al tratamiento con Glucantime (Obonaga *et al.*, 2014); que parásitos aislados de pacientes que son R-antimoniales cursan con resistencias variables a MTF, AmB o PMM (Ghosh *et al.*, 2021); o presentan al tiempo resistencia a MTF y Sb<sup>III</sup> (Srivastava *et al.*, 2017). Los parásitos R-MTF no se comportan siempre de manera similar en relación a sus marcadores moleculares involucrados, lo que podría conllevar por ejemplo, al incremento en la expresión de diversas proteínas transportadoras como la acuaporina1 (AQP1), importante en el ingreso del Sb<sup>III</sup>, disminución de la expresión de bombas de eflujo como PRP1 (*pentamidine resistance protein* 1 o ABCC7) y MDR1 (*P-glycoprotein* (P-gp) o ABCB1) disminuyendo la salida de estos fármacos (Coelho *et al.*, 2007). Sería interesante determinar el rol de estas proteínas para entender el impacto de la R-MTF en la susceptibilidad a otros fármacos. Otra forma de explicar la mayor sensibilidad a PMD y Sb<sup>III</sup> en los promastigotes, o la menor en los

amastigotes intracelulares, es que las vías de señalización de ambos fármacos estén afectadas por la R-MTF. Se ha reportado que en cepas R-MTF de *L. amazonensis* hay una disminución de la tripanotiona reductasa (TR) [enzima dependiente de NADPH que reduce la tripanotiona oxidada ( $TS_2$ ) a tripanotiona reducida ( $T(SH)_2$ )] pero no de los niveles de ROS en comparación con la WT (Neira *et al.*, 2025). Lo anterior podría sugerir que en los parásitos R-MTF, hay una afectación en la TR que no le permite alcanzar los niveles adecuados de la  $T(SH)_2$  por lo que el parásito debe compensar la producción de esta proteína mediante otra vía. Esta vía puede ser la sobreproducción de poliaminas, a través de la ruta arginina-ornitina-putrescina-espermidina (ruta precursora de la  $T(SH)_2$ ). La PMD en cepas nativas compite con algunos sustratos de la síntesis de poliaminas como arginina, ornitina y putrescina, impactando de manera directa esa vía de señalización (Basselin *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 2006). Por su parte, se ha reportado que el  $Sb^{III}$  inhibe la acción de TR y además, provoca el eflujo de la  $T(SH)_2$  y el glutatión, impactando de manera importante el balance redox (Wyllie *et al.*, 2004).

La mayor resistencia al  $Sb^{III}$  en amastigotes intracelulares de cepas 40R, imposibilitaría el tratamiento con antimoniales en los pacientes, pero abre la puerta a terapias con PMD. La disminución de la potencia del  $Sb^{III}$  en formas de vida intracelulares no es comúnmente reportado. En cepas nativas, el  $Sb^{III}$  es más potente en las formas de vida intracelulares debido a la mayor presencia de la enzima reductasa dependiente de tior 1 [TDR1, encargada del paso de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG)], la cual es clave para el manejo del estrés oxidante, por lo que los amastigotes son más sensibles a este fármaco (Denton *et al.*, 2004), tal como se observa en los resultados del presente trabajo. No obstante, el  $Sb^{III}$  en la cepa 40R es menos potente en amastigotes, por lo que sería

interesante determinar el papel de la TDR1 y TR en cepas R-MTF tanto en promastigotes como en amastigotes intracelulares.

Por su parte, los amastigotes intracelulares de la cepa 40R mantienen una mayor susceptibilidad a PMD en comparación con la cepa nativa, es decir, se comporta igual que en promastigotes. Esto refuerza la idea de que las cepas R-MTF pueden estar realizando una compensación del sistema redox a través de la vía de las poliaminas en el caso de la PMD, pero puede estar manejando una ruta distinta frente al  $Sb^{III}$  que pueden implicar la sobreexpresión de bombas de eflujo (Mandal *et al.*, 2009).

En relación con la AmB, los cambios en promastigotes de la composición de la membrana plasmática parecen no afectar de manera importante la concentración del ergosterol en promastigotes puesto que no se reportó resistencia a AmB en las cepas de resistencia intermedia ni en la cepa 40R, apuntando a que no se disminuye dramáticamente el contenido de ergosterol durante la resistencia MTF en las formas de vida extracelulares (Rakotomanga *et al.*, 2005).

En este trabajo, el KTZ no presentó diferencias significativas entre la cepa 40R y WT y la PMM no fue evaluada en la cepa 40R. Sin embargo, se ha reportado el incremento de la potencia de la PMM ( $CI_{50} = 6,93 \pm 0,80 \mu M$ ) en cepas con resistencia a MTF, aunque solo a  $8 \mu M$ , con un IS de  $0,57 \pm 0,15$ , pero sin diferencias significativas (García-Hernández *et al.*, 2012).

En este trabajo se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *mt* ( $p = 0,0005$ ) con menor expresión en la cepa 40R, por lo que la expresión reducida de este transportador podría explicar la resistencia a MTF. Diferentes resultados han sido reportados en relación con esto. En cepas R-MTF de *L. amazonensis* la evaluación de la expresión de *mt* se reportó significativamente disminuida (Neira *et al.*, 2025) y en aislados clínicos de *L.*

*braziliensis* con susceptibilidad disminuida a la MTF se reportaron niveles normales de *mt* (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009). Además, en este trabajo se encontró una mutación en el gen *mt* en la posición 2235, pasando de una citosina en la WT a una adenina en la 40R, que posteriormente causó la traducción de una proteína truncada de 744 aminoácidos, mientras que en la WT corresponde a 1104 aminoácidos. Los niveles de expresión reducida y la proteína truncada derivada del gen *mt* en la cepa 40R pueden explicar parte del mecanismo de resistencia a MTF en *L. amazonensis*, ya que inciden directamente en el ingreso del fármaco al parásito. Otras mutaciones han sido encontradas en esta región, como la G852A en una cepa de *L. amazonensis* resistente a 100  $\mu$ M de MTF (Coelho *et al.*, 2014) y la mutación L832F en aislados de *L. infantum* provenientes de una paciente con múltiples rondas de AmB y MTF y FT recurrente (Cojean *et al.*, 2012). Esta región corresponde a un área entre las secuencias de consenso características de las ATPasas y el quinto dominio transmembrana y cualquier cambio influye en el ingreso del fármaco.

De manera contraria, en este trabajo el gen *ros3* presentó cambios significativos en la expresión, siendo mayores en la cepa 40R. Un resultado similar fue encontrado en una cepa de *L. amazonensis* R-MTF pero sin significancia estadística (Neira *et al.*, 2025). Otros autores han reportado que cepas nativas de *L. braziliensis* muestran una expresión reducida de *ros3* que está relacionado con la baja internalización de la MTF (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009) y su delección parcial o completa en cepas de *L. major* incrementó la resistencia al fármaco 3 y 20 veces más, respectivamente (Espada *et al.*, 2021). No obstante, estos resultados no explican el por qué estaría *ros3* más expresado en cepas R-MTF. Sería interesante poder secuenciar el gen y la proteína para determinar si a pesar de los altos niveles de transcritos de *ros3*, la proteína que expresa no es funcional, confirmando así la regulación nivel postraduccional.

De manera general, la variedad de resultados encontrados en la regulación de expresión génica puede estar relacionada con la especie en algunos casos, pero adicionalmente con las clonas en cada cepa.

En conjunto, nuestros hallazgos además de validar a *L. amazonensis* como un buen modelo experimental para estudiar la resistencia a MTF, también evidencian cómo la resistencia puede incidir en la biología del parásito, desde el crecimiento hasta su susceptibilidad a otros tratamientos. Este nuevo conocimiento es importante para anticipar el manejo de parásitos R-MTF. Más estudios hacen falta para determinar la característica más importante a nivel *in vitro* que permita predecir los casos con posible FT y plantear estrategias de tratamiento alternativo más eficaces.

## 1.5 Conclusiones

En este capítulo se encontró que la cepa 40R parece tener un metabolismo acelerado que le permite un mejor crecimiento que la cepa WT y el mantenimiento de su capacidad de infección en modelos *in vitro*. Además, la facilidad con que se adquiere la resistencia a MTF en cepas de *L. amazonensis* resulta preocupante. Su marcador de expresión representativo fue la mutación puntual en el gen *mt*, sin diferencias en los niveles de ARNm en relación con la cepa nativa y codificando una proteína troncada probablemente no funcional. Adicionalmente, la R-MTF causó una sensibilidad cruzada que podría tener relación con la especie, generando perfiles de susceptibilidades variadas a otros fármacos y en este trabajo la cepa 40R de *L. amazonensis* presentó significativamente mayor sensibilidad de los promastigotes a los fármacos de Sb<sup>III</sup> y PMD, mientras que en amastigotes intracelulares la cepa 40R fue significativamente más resistente a Sb<sup>III</sup>, sugiriendo que las terapias con Sb<sup>III</sup> podrían ser limitadas.

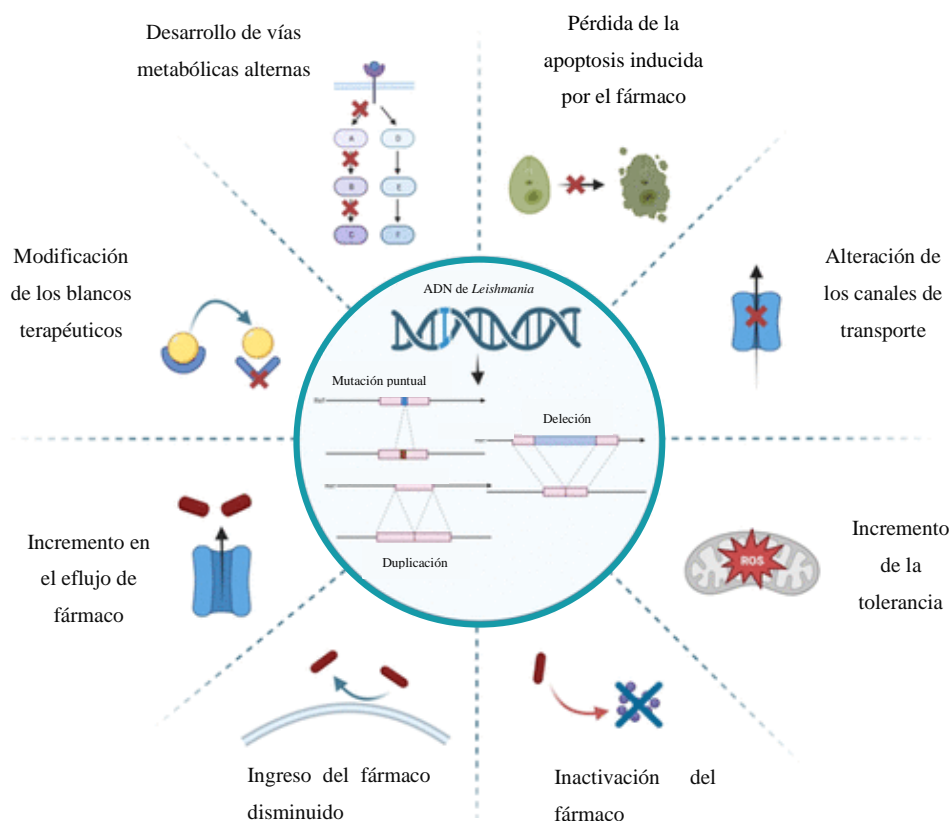
## 2 Determinación de la estabilidad del fenotipo resistente de los parásitos 40R al quitar la presión del fármaco y en otras formas de vida

### 2.1 Fenotipo de resistencia farmacológica (RF)

#### 2.1.1 Concepto de RF y posibles factores implicados

La resistencia farmacológica (RF) incluye la generación (o activación) de varios mecanismos utilizados por los patógenos para adaptarse y sobrevivir a condiciones externas y extremas, como son las de fármacos.

**Figura 10** Mecanismos de resistencia farmacológica de parásitos de *Leishmania*



NOTA: la imagen describe los mecanismos de resistencia farmacológica frecuentemente presentados en los parásitos de *Leishmania*. Tomado y adaptado de (Bharadava *et al.*, 2024).

La RF es un proceso natural en el que los organismos evolucionan para sobrevivir. La RF puede ocurrir innatamente en microorganismos no respondedores (menos o no susceptibles) a un determinado fármaco, ya sea porque son impermeables o carecen del blanco terapéutico. O podría ser adquirida, la cual se asocia con infecciones con plásmidos de resistencia (principalmente en bacterias) o con factores genéticos como la delección, duplicación o mutaciones puntuales en genes que obstruyan su supervivencia. Por ejemplo, en transportadores de entrada del fármaco, en genes involucrados en producción de ROS y, en la sobreexpresión de genes involucrados en la salida de fármacos de los parásitos o en enzimas relacionadas con el blanco terapéutico (expresión de proteínas que degraden, inactiven o modifiquen el efecto tóxico de los fármacos) (Carnielli *et al.*, 2019; Cojean *et al.*, 2012; J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Parodi-Talice, *et al.*, 2001). La RF también puede generarse experimentalmente cuando los patógenos son sometidos *in vitro* a presiones selectivas de uno o varios fármacos (Salazar-Villamizar & Escobar, 2022). En parásitos como *Plasmodium* los niveles de esta RF podrían dividirse en 3 tipos: R-reversible, R-estable y R-permanente. La R-reversible no es hereditaria y se pierde la RF al quitar la presión pero puede aparecer otra vez rápidamente restituyendo la presión del fármaco; la R-estable es "temporalmente" hereditaria incluso sin presión del fármaco, puede pasar algunas generaciones y los cambios epigenéticos pueden "arreglar" temporalmente el genoma 3D alterado y; la R-permanente es hereditaria y la RF no se pierde sin la presión del fármaco, los genes mutados se pueden "arreglar" o fijarse permanentemente a la arquitectura alterada del genoma 3D. Las proteínas mutadas pueden afectar sus propias funciones originales, pero no son tan importantes como los genes mutados en la formación de resistencia permanente a los medicamentos. La aparición de genes mutados probablemente se debe a alteraciones en la

arquitectura del genoma 3D. Además, las líneas resistentes desarrolladas en el laboratorio han mostrado reversión de la resistencia (Li, 2023).

*Leishmania* tiene un genoma atípico que muestra variación en la dosis cromosómica entre las especies, falta de intrones (transcribe policistricamente), presencia de una base modificada (base J) y una plasticidad extrema mediante dosificación génica (Borst & Sabatini, 2008; Bussotti *et al.*, 2021). Esta inestabilidad del genoma se presenta como mecanismo de supervivencia en respuesta a condiciones estresantes en donde se inducen cambios en la dosis de genes por modificaciones genómicas ya sea por aneuploidías cromosomales masivas, deleciones o amplificaciones génicas (Moncada-Diaz *et al.*, 2024; Santi & Murta, 2022). Los parásitos de *Leishmania* son expertos en manipular la dosis de genes a través de la aneuploidía masiva (Downing *et al.*, 2011; Mannaert *et al.*, 2012) y la formación de episomas extracromosómicos circulares "cajas de herramientas de emergencia" con varios genes y que pueden ser rápidamente reguladas al alza o a la baja en un entorno estresante (Leprohon *et al.*, 2009). Estas alteraciones pueden modificar los niveles de expresión de ciertos genes y regular la expresión de los transportadores de entrada o salida de fármacos, de los blancos terapéuticos, o enzimas asociadas a la inactivación de fármacos, y también pueden realizar cambios específicos en la secuencia de un gen (polimorfismos de un solo nucleótido SNPs) modificando la estructura o función de las proteínas (Kamran *et al.*, 2023; Laffitte *et al.*, 2016).

### **2.1.2 Estabilidad del fenotipo resistente a MTF**

En cuanto a la estabilidad del fenotipo resistente a MTF en parásitos de *Leishmania* R-MTF, sin la presión del fármaco, en las diferentes formas de vida, después de la infección

en células o con la utilización de algunos compuestos, se han presentado resultados interesantes, aunque controversiales. Estudios iniciales realizados en *L. tropica* resistentes a DNM (CI<sub>50</sub> de 272 µM) mostraron un fenotipo multirresistente (MDR) a MTF y edelfosina (fármaco antineoplásico) con CI<sub>50</sub> de 227,3 µM y 115,2 µM, respectivamente. Después de 45 días de cultivo sin la presión con DMN, los parásitos exhibieron una mayor susceptibilidad a la MTF con valores similares a las WT (CI<sub>50</sub> 2,6 µM) al igual que una disminución de la expresión del transportador tipo-Pgp con respecto a la línea resistente (J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Parodi-Talice, *et al.*, 2001).

Resultados opuestos han sido reportados en otras especies de *Leishmania*. en parásitos de *L. major* R-MTF generados *in vitro* por presión selectiva, al retirar el fármaco el parásito conserva la resistencia hasta después 11 meses, con valores de CI<sub>50</sub> menores que la cepa R-MTF en cultivo con el fármaco, pero sin llegar a ser tan susceptibles a la MTF como la WT (Turner *et al.*, 2015). Otro estudio realizado en una cepa de *L. donovani* R-MTF por presión selectiva, mostró que el parásito conserva la resistencia a la MTF al quitar la presión del fármaco hasta por un año, con CI<sub>50</sub> similares a las obtenidas durante el cultivo con el fármaco (Vacchina *et al.*, 2016).

Sin embargo, el grado de estabilidad de esta resistencia y de las mutaciones subyacentes en condiciones no selectivas sigue siendo poco caracterizado. La estabilidad de la resistencia adquirida a los medicamentos tiene implicaciones fundamentales para nuestra comprensión de la aparición y propagación de brotes de resistencia y para definir estrategias eficientes para combatirlos. La RF, además de la susceptibilidad al fármaco, afecta también la aptitud (*fitness*) del parásito, es decir, su capacidad de sobrevivir, reproducirse y propagarse eficazmente dentro de un huésped. Por lo tanto, la estabilidad de la RF afectaría no solo la eficacia de los fármacos para tratar las infecciones, sino que también podría incrementar la

probabilidad de que las personas contraigan enfermedades graves, presenten discapacidades y mueran.

Adicionalmente, teniendo en consideración la naturaleza dimórfica del parásito *Leishmania*, evaluar la estabilidad de la resistencia en distintas formas de vida e idealmente, tras el paso por sus hospederos invertebrados es importante. En este sentido, en modelos *in vitro* de promastigotes resistentes a 60  $\mu\text{M}$  de MTF de *L. panamensis* con valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $99,4 \pm 2,4 \mu\text{M}$ , casi el doble que la cepa nativa que presentaba una susceptibilidad a MTF de  $56,1 \pm 8,1 \mu\text{M}$ , conservaron la R-MTF al ser transformados a amastigotes intracelulares (Obonaga *et al.*, 2014). De manera similar, la resistencia inducida a 40  $\mu\text{M}$  de MTF en promastigotes de *L. donovani* con un IR = 9,8 conservó su R-MTF al transformarse a su forma intracelular con un IR = 13,2 (Seifert *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando la R-MTF, mediante presión selectiva, ocurrió en amastigotes intracelulares de *L. donovani* resistentes a 20  $\mu\text{M}$  de MTF, la transformación a promastigotes restituyó la susceptibilidad a MTF (Hendrickx *et al.*, 2014).

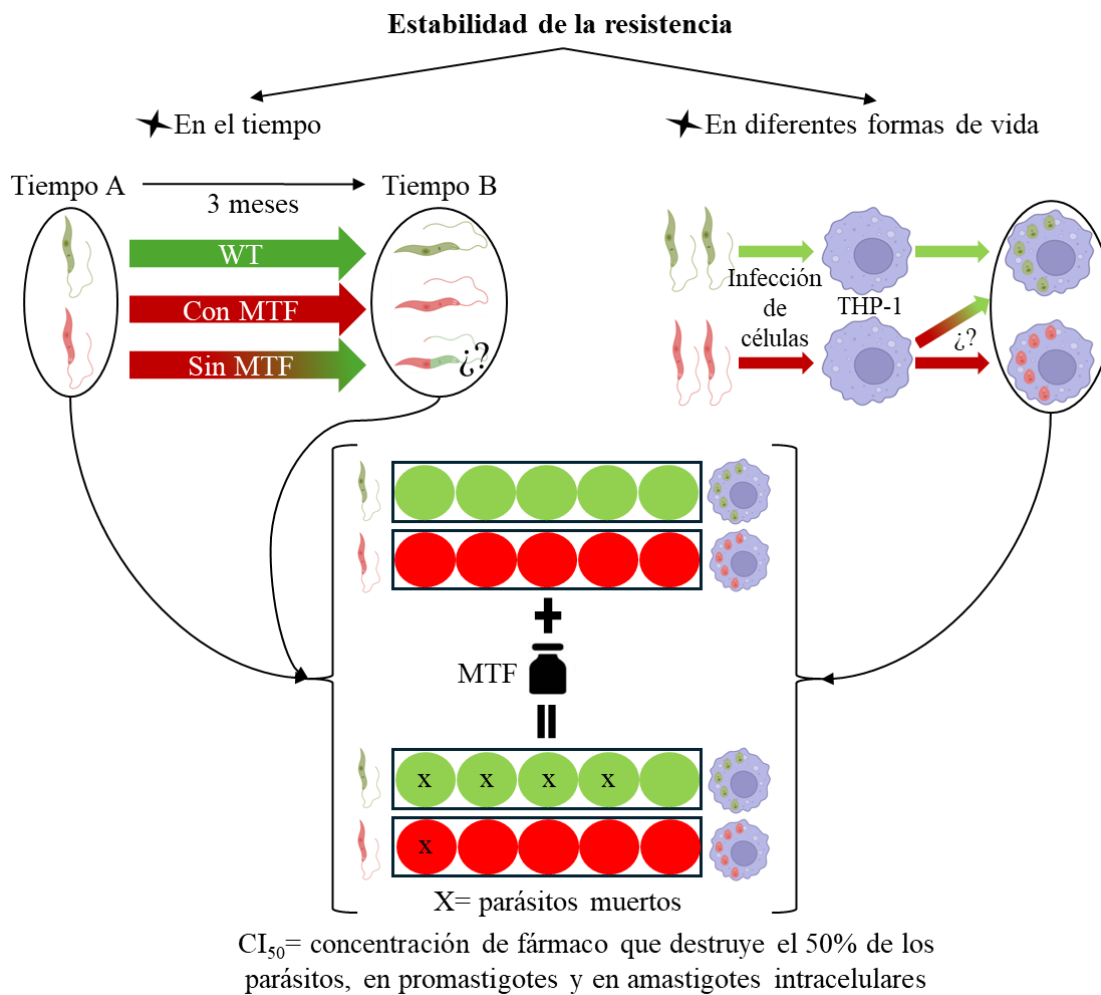
Por otro lado, la conservación de la R-MTF tras su paso por algún hospedero vertebrado o invertebrado también ha sido evaluada y puede simular mejor lo sucedido durante el ciclo de vida del parásito. Se ha reportado, la permanencia de la resistencia después de pasar por hospederos invertebrados *in vitro* en mosquitas de *Lutzomyia* de cepas de *L. infantum* R-MTF aisladas de pacientes puesto que, los valores  $\text{CI}_{50}$  post-infección se mantienen altos aunque estos parásitos exhiben afectación en su capacidad infectiva en las mosquitas y en ratones BALB/c (Van Bockstal *et al.*, 2019, 2020).

## 2.2 Metodología

### 2.2.1 Diseño metodológico

El diseño metodológico del capítulo 2, se observa en la **Figura 11**.

**Figura 11** Diseño metodológico del capítulo 2 que evalúa la estabilidad de la resistencia.



### 2.2.2 Parásitos y células

El mantenimiento de los parásitos y células se realizó como fue descrito anteriormente en la sección 1.2.2. del capítulo anterior.

### **2.2.3 *Fármacos y compuestos***

Se utilizó MTF obtenida en GoldBio (San Luis, Estados Unidos). La MTF se disolvió en PBS (pH 7,0) y el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) en acetona a una concentración de 10.000 ng/mL (stock). La solución de MTF fue utilizada después de preparada.

### **2.2.4 *Prueba de estabilidad de la resistencia en promastigotes sin la presión del fármaco***

Los parásitos resistentes fueron cultivados durante al menos un mes con el fármaco. Posteriormente, se retiró el fármaco y los parásitos resistentes (10R / 20R / 30R y 40R) fueron cultivados en medio de cultivo sin fármaco durante hasta tres meses. La prueba de susceptibilidad de los parásitos a la MTF se realizó antes de retirarla y cada 15 días durante el seguimiento. Como grupo control se utilizaron los parásitos resistentes cultivados con la presión del fármaco. Para el ensayo, ambos grupos fueron tratados con concentraciones seriadas de MTF (400–6,25  $\mu$ M) o sin MTF durante 72 h. El efecto inhibitorio del compuesto sobre los parásitos se determinó mediante el método colorimétrico de reducción de la resazurina, tal como se describió en el capítulo 1. Los resultados se expresaron como  $CI_{50}$  de MTF para cada tiempo (en semanas) sin fármaco. Se determinó el IR tal como se mencionó en el capítulo 1.

### **2.2.5 *Prueba de estabilidad de la resistencia después de la infección en células THP-1***

Las células THP-1 transformadas fueron infectadas con promastigotes 40R y WT en fase estacionaria, en proporción 1:5 de macrófago: parásito por 24 h a 32 °C, 5% de  $CO_2$  y

95% de HR. Posteriormente, fueron tratadas con concentraciones seriadas de MTF (80–2,5  $\mu\text{M}$ ) por 72 h. Por último, fueron fijadas con metanol y teñidas con Giemsa durante 15 min. Se determinaron los porcentajes de infección (número de células infectadas en 300 células) y los rangos de infección (no infectado – NI; de 0–10 amastigotes/célula; de 11–20 amastigotes/célula y >20 amastigotes/célula) por conteo microscópico. La susceptibilidad a la MTF se determinó microscópicamente, calculando los porcentajes de inhibición a partir de los conteos, mediante la fórmula: 
$$= \frac{(\%infección - \%infección\ control)}{-\%infección\ control} \times 100$$
. Los resultados fueron expresados como porcentajes de células infectadas, número de amastigotes/célula y como  $CI_{50}$ .

### **2.2.6 Análisis estadístico**

Se evaluó la normalidad de los datos de estabilidad e infección mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Prism GraphPad 8.0.1, 2018). Se evaluó la igualdad de varianzas o prueba de Levene (Excel, 2010) entre las cepas WT-40R. El comportamiento de las cepas con y sin MTF fue evaluado en RStudio 4.5.0, 2020 (Desarrollo Integrado para R RStudio, PBC, Boston, MA). Las diferencias estadísticas de los ensayos de infección se determinaron a través de la prueba t de Student. Valores de  $p \leq 0,05$ .

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Susceptibilidad de los parásitos R-MTF sin la presión del fármaco**

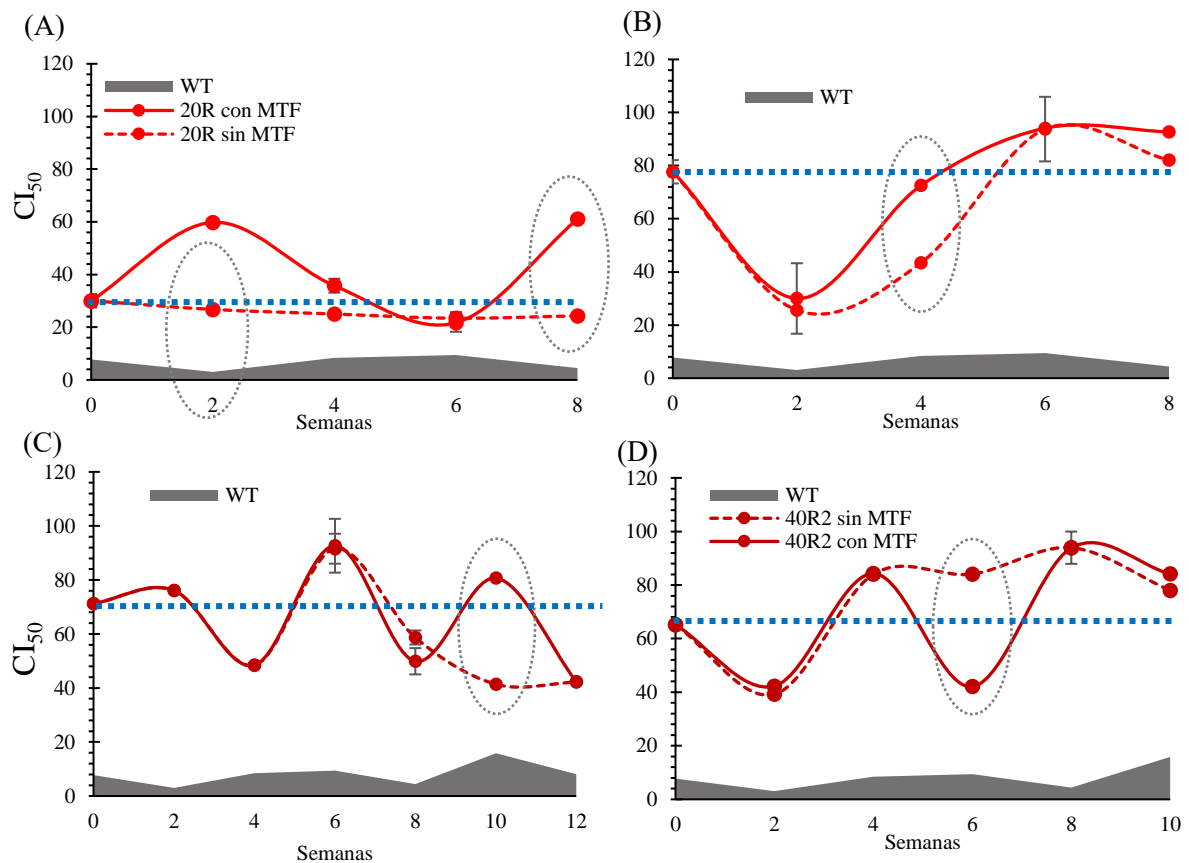
Con relación a la cepa 10R (resistente a 10  $\mu\text{M}$  de MTF), los valores de potencia de la MTF ( $CI_{50} \mu\text{M} \pm \text{DE}$ ) del tiempo 0 a 3 meses sin MTF aumentaron de  $19,41 \pm 1,28 \mu\text{M}$  a  $35,37 \pm 18,00 \mu\text{M}$ , con una diferencia significativa ( $p = 0,024$ ). Dado que la cepa 10R control

(mantenida bajo presión del fármaco) también mostró un aumento inesperado ( $CI_{50}$   $67,40 \pm 23,00$ ,  $p = 0,017$ ) y no se pudo repetir el experimento, este resultado no fue considerado. En la cepa 20R, la potencia inicial de la MTF fue de  $30,05 \pm 3,00 \mu\text{M}$  y al cultivarla sin MTF durante 2 meses bajaron a  $24,88 \pm 1,22 \mu\text{M}$  con un valor de  $p = 0,046$ , indicando un aumento significativo de la susceptibilidad a MTF. Al contrario, la cepa 20R cultivada con MTF mantuvo su susceptibilidad a MTF con una potencia de  $44,59 \pm 16,62 \mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ) (**Figura 12A**). Al comparar el comportamiento de los dos grupos, con y sin MTF, después de 2 meses, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). La cepa 30R cultivada con  $30 \mu\text{M}$  de MTF presentó valores iniciales de  $CI_{50}$  de  $77,69 \pm 15,09 \mu\text{M}$  y después de dos meses en cultivo sin MTF la potencia fue de  $61,28 \pm 27,82 \mu\text{M}$  mientras que en cultivo con MTF la  $CI_{50}$  fue de  $72,33 \pm 25,88 \mu\text{M}$ , siendo similares ( $p > 0,05$  en ambos casos). El análisis de regresión indicó que la cepa 30R sin MTF es 1,3 veces más susceptible que la cepa con MTF, pero sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ) (**Figura 12B**). La cepa 40R1, mantenida con  $40 \mu\text{M}$  de MTF durante un mes, al tiempo 0 y a los 3 meses en medio sin MTF, mostró valores iniciales de  $CI_{50}$  de  $71,23 \pm 22,47 \mu\text{M}$  y pasó a  $59,76 \pm 18,50 \mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ). La cepa 40R1 control (con MTF) presentó un  $CI_{50}$  de  $64,62 \pm 18,93 \mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ) (**Figura 12C**). Al comparar los dos grupos con y sin MTF, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). La cepa 40R2 mantenida con  $40 \mu\text{M}$  de MTF por 11 meses, al tiempo 0 y tres meses sin MTF, mostró valores de  $CI_{50}$   $69,34 \pm 22,43 \mu\text{M}$  y  $75,85 \pm 19,02 \mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ), es decir, el comportamiento de ambas cepas fue similar (**Figura 12D**).

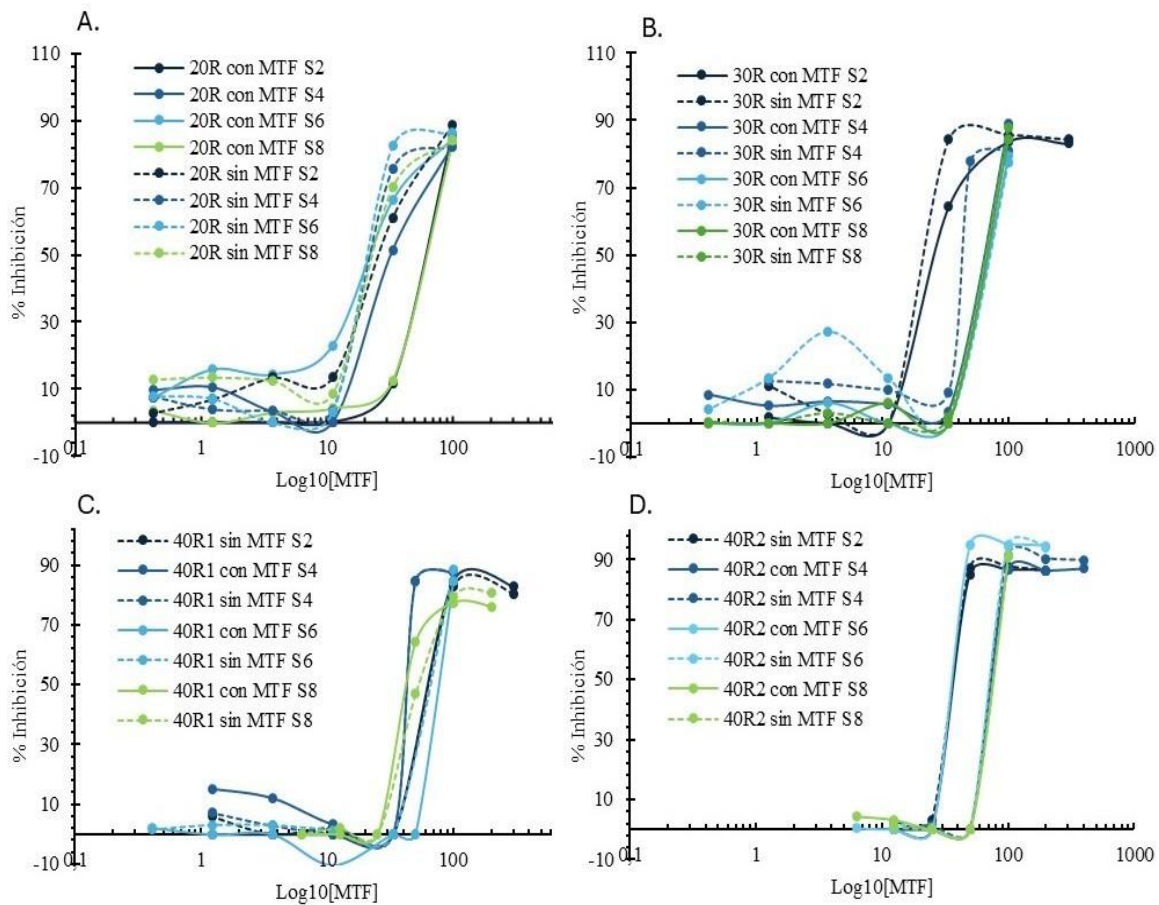
Las diferencias de susceptibilidad a la MTF en las cepas R-MTF cultivadas con y sin fármaco y también en la WT durante el tiempo de seguimiento se muestran en la **Figura 12**. En general, se observan variaciones importantes a lo largo del tiempo; sin embargo, se mantiene su nivel de resistencia frente a la cepa WT. En la cepa 20R, semanas 2 y 8, hay

diferencias significativas ( $p = 0,000$ ) entre las dos condiciones y la cepa sin MTF exhibe un comportamiento más estable (**Figura 12A**). También se observan diferencias en la 30R a la semana 4 ( $p = 0,036$ ), en la 40R1 a la semana 10 ( $p = 0,025$ ) y en la 40R2 a la semana 6 (**Figura 12B-D**). Las diferencias reportadas pueden deberse a factores externos que afectan el crecimiento de los parásitos, dado que no se mantienen constantes en el tiempo, o pueden deberse a la inestabilidad de la resistencia. Esto puede observarse igualmente en la **Figura 13** (porcentajes de inhibición en comparación con el  $\log_{10}$  de las concentraciones de MTF ensayadas).

**Figura 12** Estabilidad de la resistencia en promastigotes R-MTF al quitar la presión del fármaco.



NOTA: Los promastigotes de *L. amazonensis* R-MTF fueron cultivados sin (líneas rojas discontinuas) o con presión del fármaco (líneas rojas continuas). Los valores de la potencia de MTF se expresaron como  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M} \pm \text{DE}$ ). (A) Cepa 20R, seguimiento durante 2 meses; (B) Cepa 30R, seguimiento durante 2 meses; (C) Cepa 40R1, seguimiento durante 3 meses; y (D) Cepa 40R2, seguimiento durante 2,5 meses. El área gris corresponde a valores de  $CI_{50}$  de la MTF en la cepa nativa (WT). La línea azul muestra el valor del día 0. Los óvalos punteados corresponden a zonas de mayor variabilidad. Los resultados son productos de tres ensayos independientes.

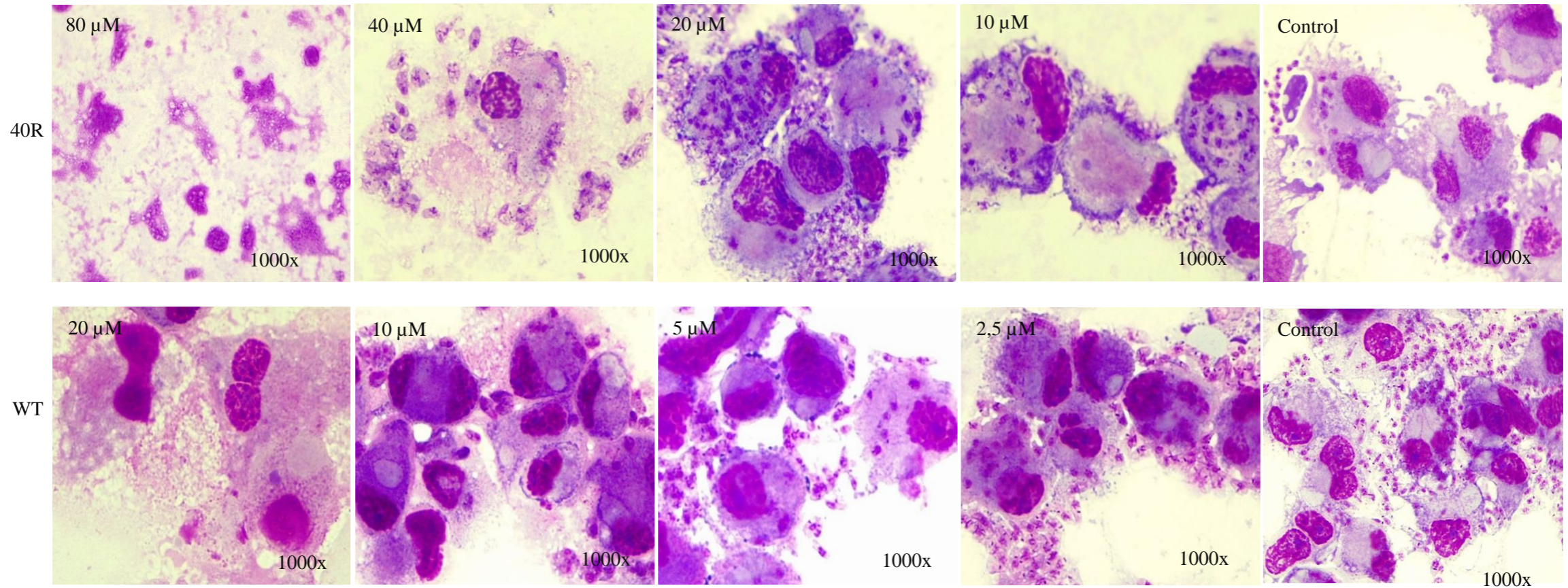
**Figura 13** Estabilidad de la resistencia a MTF de cepas con diferentes niveles de resistencia.

Nota: Ensayos dosis-respuesta (concentración de MTF versus porcentajes de inhibición del parásito) (A) 10R; (B) 20R; (C) 30R; (D) 40R1; y (E) 40R2. Datos provenientes de dos ensayos independientes.

### 2.3.2 Estabilidad de la resistencia después de la infección en células THP-1

La cepa 40R mantuvo la R-MTF después de la infección a células THP-1 diferenciadas. Aunque no fue posible calcular la potencia de la MTF en la cepa 40R debido a la citotoxicidad del fármaco ( $CC_{50} 36,64 \pm 2,37$ , ver capítulo 1) se estima una  $CI_{50} > 40 \mu M$  puesto que, a una concentración de  $40 \mu M$  de MTF, se observó la presencia intacta de

amastigotes con destrucción de las células THP-1 (**Figura 5**). La potencia de la MTF en amastigotes intracelulares de la cepa WT fue de  $8,56 \pm 3,40 \mu\text{M}$ , con un IS de 4,28. En la cepa 40R se estimó un IS de 0,92 o inferior. El IR calculado fue de 4,67. En la **Figura 14** se observa cómo en la WT, el tratamiento con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de MTF destruye los amastigotes, mientras que en la cepa 40R, después del tratamiento con 10-40  $\mu\text{M}$  de MTF aún se observan los parásitos.

**Figura 14** Amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* tratados con MTF.

NOTA: se presentan los resultados de células THP-1 infectadas con promastigotes en fase infectiva de 40R (arriba) y WT (abajo) de *L. amazonensis*. Una vez infectadas, fueron tratados con MTF y posteriormente teñidas con Giemsa. Las fotos corresponden a un aumento de 1000x.

## 2.4 Discusión

En las cepas R-MTF, obtuvimos estabilidad del fenotipo resistente a MTF aun en ausencia del fármaco en cultivo durante los 3 meses de seguimiento, a excepción de la cepa 20R sin MTF, que presentó una reducción significativa en los valores de  $CI_{50}$  al cabo de dos meses de cultivo sin el fármaco. Estos resultados son similares a los obtenidos en cepas de *L. major* R-MTF generados *in vitro* por presión selectiva, al retirar el fármaco el parásito conserva la resistencia hasta después de aproximadamente 11 meses; aunque la potencia de la MTF incrementa, no alcanza a llegar al nivel de la WT, indicando que en 11 meses la resistencia disminuye pero no a los niveles de los parásitos nativos (Turner *et al.*, 2015). Del mismo modo, cepas de *L. donovani* R-MTF sometidas a presión selectiva también conservaron el fenotipo resistente al retirar el fármaco durante hasta un año, sin diferencias significativas en los valores de  $CI_{50}$  respecto al cultivo bajo presión (Vacchina *et al.*, 2016). Lo anterior sugiere que, en algunos casos, la resistencia a MTF puede ser lo suficientemente estable como para mantenerse incluso en ausencia del fármaco, lo que implica una baja presión de reversión por parte del parásito.

En contraste, otras especies, como *L. tropica*, han mostrado una rápida reversión del fenotipo de resistencia al retirar la presión selectiva. Por ejemplo, parásitos resistentes a DNM ( $CI_{50} = 272 \mu\text{M}$ ) con resistencia cruzada a MTF que presentó una potencia de  $227,3 \mu\text{M}$  mientras que en la cepa nativa fue de  $24,7 \mu\text{M}$ , recuperaron la susceptibilidad a ambos fármacos en solo 45 días sin DNM (J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Parodi-Talice, *et al.*, 2001), aún con resistencias mayores a las presentadas en este trabajo. Este comportamiento se ha relacionado con mecanismos específicos de resistencia a DNM en el cual está implicada la sobreexpresión del transportador tipo Pgp y del cual se ha mostrado logra expulsar una gran cantidad de otros fármacos como puromicina, vinblastina y

doxorubicina, todas con un  $IR > 10$  (Chiquero *et al.*, 1998), logrando también causar resistencia a MTF. Sin embargo, las bombas de eflujo no han sido frecuentemente asociadas con la resistencia a MTF como se discutió en el capítulo anterior.

Los resultados mencionados apuntan a que terapias sostenidas con MTF no son ideales en el tratamiento de la leishmaniasis, dado que la resistencia es tan estable en presencia del fármaco y no conlleva un costo de aptitud importante en el parásito que incentive su reversión. Una alternativa, podría ser el tratamiento otros fármacos/compuestos que contrarresten la resistencia a MTF (ver Capítulo 3).

Como se mencionó en el capítulo anterior, la resistencia MTF frecuentemente cursa con mutaciones en el gen *mt* que codifica la proteína transportadora de la MTF en el parásito. En el reporte de una paciente con VIH y LV causada por *L. infantum*, se observó una mutación progresiva en este gen (L832F), la cual se mantuvo durante años de tratamientos repetidos con AmB y MTF. Sin embargo, en el último aislado obtenido después de que la paciente duró tres años sin tratamiento con MTF, se encontró que había revertido la mutación en el ADN a su base nitrogenada nativa, aunque contenía una delección en el gen *ros3* (Cojean *et al.*, 2012; Mondelaers *et al.*, 2016). Esto sugiere que las mutaciones en la R-MTF no son completamente estables al retirar la presión del fármaco y que la reversión es posible al retirar la presión farmacológica, pero conlleva tiempo. Sería interesante evaluar las mutaciones en el ADN de los parásitos 40R mantenidos en cultivo sin MTF, tal que permita correlacionar la reversión de las mutaciones en los genes *mt* y *ros3* y los cambios en la potencia del fármaco que denotan el fenotipo resistente.

Por otro lado, mostramos que la resistencia a MTF adquirida en promastigotes se mantiene al ser transformados a amastigotes intracelulares. Las cepas 40R presentaron  $CI_{50} > 40 \mu M$ , lo que representa más de 4 veces la resistencia observada en la cepa nativa ( $8,56 \pm$

3,40  $\mu\text{M}$ ). Estudios similares en cepas de *L. donovani* R-MTF muestran el incremento de los valores  $\text{CI}_{50}$  frente a MTF en amastigotes intracelulares directamente relacionadas con las concentraciones de la presión selectiva en promastigotes (Shaw *et al.*, 2016b), donde la potencia de la MTF en parásitos 30R fue de  $43,77 \pm 2,05 \mu\text{M}$ , mientras que la cepa nativa obtuvo  $7,77 \pm 0,60 \mu\text{M}$  (Vacchina *et al.*, 2016), similar a los datos obtenidos en este trabajo. Por lo tanto, sin importar el nivel de resistencia adquirido en promastigotes, las formas intracelulares tendrán un fenotipo de resistencia en comparación con la cepa WT.

La estabilidad del fenotipo resistente a MTF en promastigotes y amastigotes intracelulares a nivel *in vitro* es un aspecto importante, pero es preocupante su potencial diseminación entre hospederos. Van Bockstal *et al.*, 2020 demostraron que parásitos R-MTF de *L. infantum* mantienen la resistencia después de pasar por un hospedero invertebrado como *L. longipaldis* ( $\text{CI}_{50} > 40 \mu\text{M}$ ), sugiriendo que este fenotipo puede persistir a lo largo del ciclo de vida del parásito, en condiciones controladas.

En términos de expresión génica, la transformación de promastigotes a amastigotes requiere un ajuste metabólico y de expresión génica amplio, pero la mayoría de los genes continúan expresándose, aunque la variación entre especies es considerable. En *L. major* cerca del 94% de los genes se expresan en ambos estadios del parásito y el porcentaje de expresión diferencial del ARNm entre ambas formas de vida es entre 1,4 y 1,5% (Leifso *et al.*, 2007); mientras que, en *L. amazonensis* es del 85% (8253 genes) de expresión constitutiva y cerca del 15% (1268 genes) de expresión diferencial entre ambos estadios (Aoki *et al.*, 2017). Esto indica que los cambios en el genoma implicados en la resistencia a MTF se pueden heredar de un estadio a otro.

## 2.5 Conclusiones

El comportamiento de las cepas R-MTF cultivadas sin MTF no difiere sustancialmente del observado en las cepas cultivadas con MTF. Al igual que el parámetro de  $CI_{50}$ , los % de inhibición indicaron que la resistencia a MTF se mantiene estable en el tiempo, de manera general, en todos los niveles de resistencia (20R, 30R, 40R1, 40R2) ( $p > 0,05$ ). Además, el fenotipo resistente a MTF es estable tanto en cultivo libre de fármaco como en condiciones intracelulares, lo que podría tener implicaciones significativas para la persistencia y la diseminación de cepas resistentes en entornos clínicos. Este modelo podría ser útil para explorar estrategias terapéuticas que busquen revertir o compensar dicha resistencia.

### **3 Determinación del efecto de fármacos/compuestos en la reversión del fenotipo**

#### **MTF-40R y en la potenciación de la actividad de MTF en parásitos MTF-40R de**

##### *L. amazonensis*

#### **3.1 Manejo terapéutico del fenotipo de resistencia a MTF**

La reversión de la resistencia a MTF empleando otros fármacos/compuestos, permitiría mantener la MTF como alternativa terapéutica. A diferencia de los estudios de interacción de fármacos, en los cuales el parásito es incubado simultáneamente con MTF y el compuesto modulador de la resistencia; en los estudios de reversión solo se administra el compuesto modulador y posteriormente se evalúa la susceptibilidad a la MTF. En este sentido, son pocos los trabajos que reportan este tipo de metodologías, puesto que mantienen al parásito resistente expuesto de forma constante al fármaco que le confiere la resistencia. Se ha estudiado la “reversión” de resistencias inducidas por fármacos, en las cuales, algunos fármacos/compuestos permiten la “reversión” de este fenotipo, como en el modelo de *L. tropica* R-DMN. En esta cepa, algunos sesquiterpenos como el dihidro- $\beta$ -agarofurano aislado de *Crossopetalum tonduzii* y las raíces de *Maytenus macrocarpa* permitieron la “reversión” del fenotipo de R-DMN (J. M. Pérez-Victoria *et al.*, 1999); sin embargo, el cultivo permanecía expuesto a 150  $\mu$ M de DNM por lo que en este trabajo sería considerado una interacción farmacológica. Algo similar sucede con los reportado en relación con un flavonoide derivado del kaempferide, que permitió mayor acumulación de la DMN en los promastigotes resistentes y “revirtió” por completo la resistencia, correlacionado con su unión al dominio de unión nuclear del transportador Pgp (J. M. Pérez-Victoria *et al.*, 1999). En promastigotes R-DMN con resistencia a cruzada a MTF y edelfosina, el sesquiterpeno C-3 también aumentó la acumulación de DMN con valores similares a la WT y disminuyó la resistencia a MTF y edelfosina sin efectos tóxicos en la WT; de otra manera, los co-

tratamientos de MTF/edelfosina con 150  $\mu\text{M}$  de DMN, igualmente aumentaron la sensibilidad a DMN a 100  $\mu\text{M}$  y 60  $\mu\text{M}$ , respectivamente (J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Parodi-Talice, *et al.*, 2001) y un coctel compuesto por 8-(1,1-dimetilalil)-dehidrosilibin [derivado del flavonoide silibina (SLB)], elacridar (ELD), zosuquidar y el sesquiterpeno C-3 permitió la reversión eficiente de la resistencia a los tres fármacos en promastigotes R-DMN (J. M. Pérez-Victoria *et al.*, 2006). Otros fármacos como la sitamaquina y el KTZ que han estado en cultivo junto con la MTF, permitieron la “reversión” de la sensibilidad disminuida a la MTF producto del incremento en la acumulación intracelular del fármaco, como en parásitos de *L. tropica* que sobre expresaban el gen *mdr1* y presentaban sensibilidad disminuida a la MTF con respecto a la WT, logrando la reversión de este fenotipo hasta en un 75% aún en concentraciones tan bajas como 2,5  $\mu\text{M}$  para la primera y más altas de 10  $\mu\text{M}$  para el segundo y con 5  $\mu\text{M}$  de sitamaquina fue del 100% la reversión sin efectos citotóxicos significativos (J. M. Pérez-Victoria *et al.*, 2011).

En relación directa con la interacción de fármacos, se han observado previamente diferentes tipos de interacción con la MTF en otros trabajos. Por ejemplo, se conoce que las interacciones farmacológicas *in vitro* de la MTF con otros fármacos antileishmania como el Sb<sup>V</sup>, la sitamaquina, la PMM y la AmB es aditiva con valores del índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC, por sus siglas en inglés *fractional inhibitory concentrations*) mayores a 0,5 y  $\leq 4$ ; sin embargo, en ensayos *in vivo* en ratones BALB/c infectados con *L. donovani*, se presentó un índice de mejoramiento de la actividad de la MTF hasta de 11,3 con el uso de la AmB (Seifert & Croft, 2006). La amiodarona, un agente antiarrítmico, presentó un sinergismo débil con la MTF con un FIC de 0,74 en promastigotes de *L. mexicana*, una clara interacción sinérgica en amastigotes intracelulares con un valor FIC de 0,49 y el tratamiento combinado de lesiones de LC en la planta de las patas de ratones BALB/c de 20

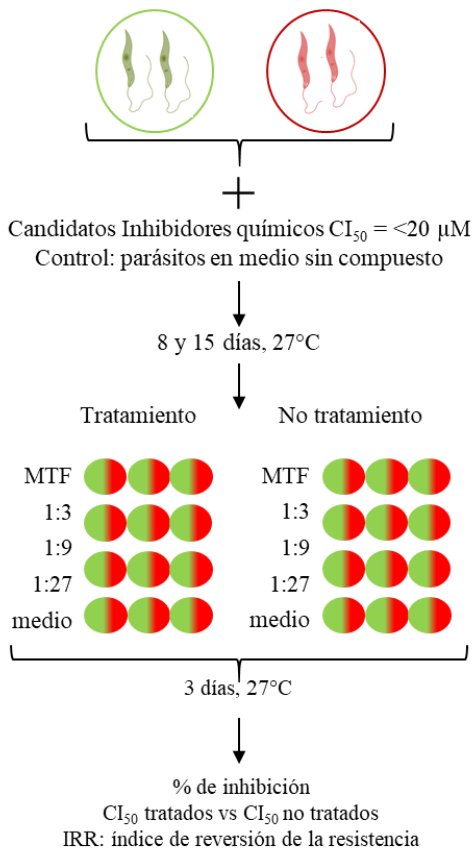
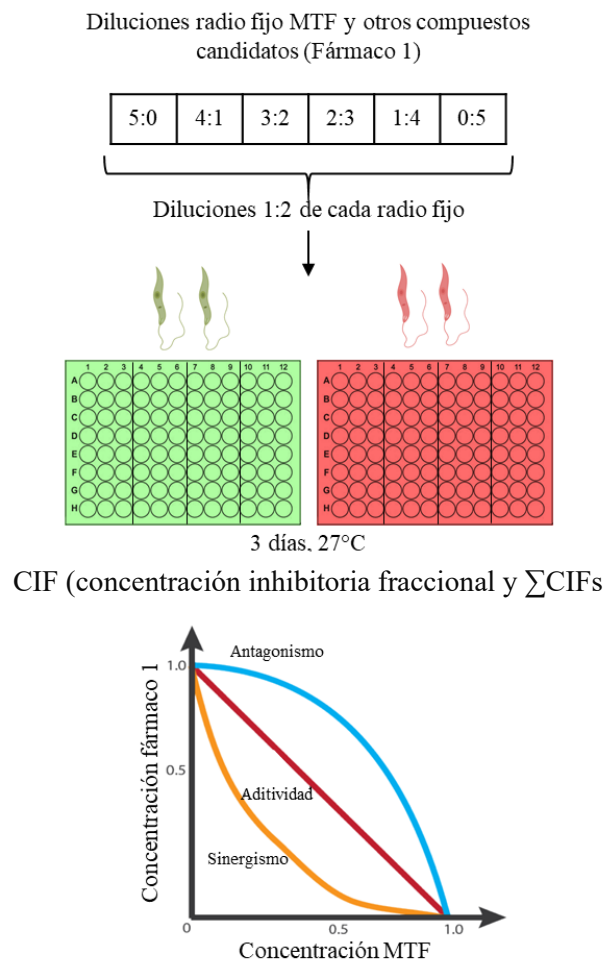
mg/kg/día con 50 mg/kg/día de amiodarona permitieron la cura parasitológica en el 90% de los animales infectados (Serrano-Martín *et al.*, 2009), de igual manera, el efecto aditivo fue registrado en amastigotes intracelulares tratados con MTF y lopinavir (medicamento anti-VIH) tomando un valor FIC de 1,28, reduciendo la carga parasitaria en el bazo y el hígado de ratones BALB/c infectados vía intraperitoneal y tratados oralmente con MTF y lopinavir (Rebello *et al.*, 2019). Medicamentos como el nifuratel usado para tratar infecciones vaginales, ha demostrado sinergia en el tratamiento con MTF en amastigotes axénicos de *L. donovani* usando 1/30 de nifuratel/MTF, disminuyendo el índice de reducción de dosis (IRD) para ambos fármacos de 2 y 3 veces, en orden, lo que reduce sus potenciales efectos tóxicos (Melcon-Fernandez *et al.*, 2023). A su vez, se ha mostrado el efecto sinérgico entre la MTF y los derivados sintéticos de triterpenoides de lupano, la betulina y el ácido betulínico en cepas de *L. infantum* con reducciones de la  $CI_{50}$  a valores de 50,8  $\mu\text{M}$  a 30,1  $\mu\text{M}$  y 28,0  $\mu\text{M}$  en presencia de 2  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{M}$  de MTF (Sousa *et al.*, 2014). Adicionalmente, aislados clínicos de *L. panamensis* con sensibilidad disminuida al fármaco presentaron sinergia con el posaconazol (POZ) donde la combinación fue significativamente más potente que la MTF por sí sola (Fernández *et al.*, 2022).

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Diseño metodológico

Se dividió en dos fases. Para evaluar la reversión de la resistencia, una vez escogidos los compuestos/inhibidores, se determinó su potencia antileishmania ( $CI_{50}$ ) en las cepas 40R y WT. Se retiró la presión de la MTF en el cultivo de parásitos y se cultivaron con compuestos/inhibidores a concentraciones bajas (tercera, quinta, décima y vigésima parte de

la CI50 de cada fármaco) durante 8 y 15 días. Se determinó la potencia de la MTF tras cada periodo de tratamiento. Para los ensayos de interacción de fármacos se utilizó el método de radio fijo, interaccionando la MTF con fármacos como AmB, POZ, SLB, farnesol (FNS), nerolidol (NLD), PMM, ELD, curcumina (CCM), PMD y verapamilo hidrocliclorado (VPM). Se consideró una interacción sinérgica ( $\Sigma\text{FIC} < 1$ ), aditiva o indiferente ( $\Sigma\text{FIC} > 1$  a 4) o antagonista ( $\Sigma\text{FIC} > 4$ ) (ver el detalle del cálculo en el numeral 3.2.7 de este capítulo). Los ensayos anteriores también se realizaron en la cepa WT para identificar si los hallazgos estaban relacionados con el fenómeno de la resistencia o si se observaba el mismo efecto en la cepa nativa (**Figura 15**).

**Figura 15** Diseño metodológico del manejo del fenotipo resistente a MTF de *L. amazonensis***Reversión de la resistencia en R-MTF****Potenciamiento de la actividad de la MTF**

Nota: diseño metodológico del capítulo 3 para la reversión de la resistencia a MTF o potenciamiento de la actividad de la MTF en la cepa 40R de *L. amazonensis*. Como control se emplearon los tratamientos en la cepa nativa o WT.

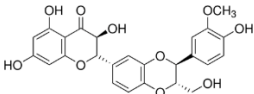
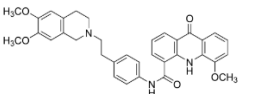
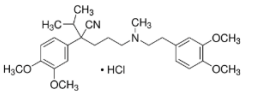
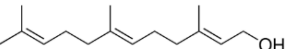
### 3.2.2 *Parásitos y células*

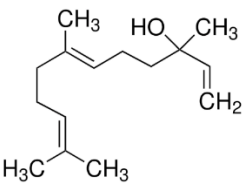
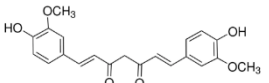
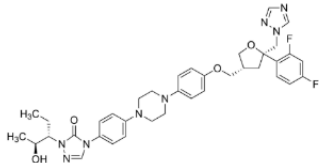
Los promastigotes 40R y WT de *L. amazonensis* se mantuvieron a 27 °C en medio Schneider con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi). Las células Vero (CCL1-81 ATCC) fueron cultivadas en medio DMEM con 10% de SFBi a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Las células THP-1 (ATCC-TIB-202, Rockville, MD, USA), procedentes de sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda, fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de SFBi a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Las células THP-1 fueron transformadas a su fenotipo adherente-macrófago cultivándolas con 80 ng/mL de forbol 12-miristato-13acetato (PMA, Sigma-Aldrich) por 72 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

### 3.2.3 *Compuestos/inhibidores*

La MTF se obtuvo en GoldBio. La AmB, la PMD, la PMM, el POZ, la SLB, el farnesol (FNS), la NLD, la CCM, la ELD y el VPM fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las soluciones stock fueron preparadas en PBS (pH 7,0) para MTF, PMM y VPM y para el resto de los compuestos/inhibidores en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Estas se mantuvieron entre 0 y -4 °C. En la **tabla 7** se presentan algunas de sus características.

**Tabla 7** Características de compuestos candidatos para reversión o potenciamiento de la actividad de MTF en parásitos 40R de *L. amazonensis*.

Compuestos	Peso molecular Log P	Estado	Estructura	Solubilidad	Mecanismo
Silibinina silibina (SLB)	482,44 g/mol 2,35–2,63	Polvo		En 10 mL de etanol, 25 mg de silibina. DMSO: 2-3mg hasta en 500 µL	Inhibe la tripanotona reductasa (Debize da Motta et al., 2025).
Elacridar Ref SML0486 (ELD)	563,64 g/mol 5,46–6,81	Polvo		DMSO: 2 mg/ml (solución tibia) DMSO: 1 mg/ml	Bloquea bombas de eflujo tipo Pgp (J. M. Pérez-Victoria et al., 2006).
Verapamilo hidroclorado (VPM)	491,06 g/mol Verapamilo: 5,04–5,23	Polvo		Metanol: 50 mg/ml Etanol: soluble PBS: 2-3 mg hasta en 500 µL.	Bloquea los canales de calcio (Valiathan et al., 2006).
Farnesol F203 (FNS)	222,37 g/mol 4,16–4,84	Líquido		En agua: 0,00654 g/l a 20°C DMSO: 2-3 mg hasta en 500 µL.	Inhibición Lanosterol 14-demetilasa, arresto en fase G2 y necrosis (Pinheiro et al., 2023; Sharma et al., 2023).

Nerolidol H59605 98%, como mezcla de <i>cis</i> y <i>trans</i> (NLD)	222,37 g/mol XLogP3-AA: 4,6	Líquido		En agua: 0,0141 g/L. DMSO: 2-3 mg hasta en 500 µL.	Inhibe la producción de isoprenoides (Arruda et al., 2005).
Curcumina C1386 (CCM)	368,38 g/mol 3,62–4,12	Polvo		Etanol: 10 mg/mL DMSO: 2-3 mg hasta en 500 µL.	Induce la apoptosis (Basmaciyan et al., 2019; Elamin et al., 2021).
Posaconazol (POZ)	700,8 g/mol 5,41–5,5	Polvo		<1% en agua. DMSO: 2-3 mg hasta 500 µL.	Inhibe esterol-14α-demetilasa (CYP51) que desmetila el lanosterol que dará lugar al ergosterol (Feng et al., 2022).

NOTA: Las características de los fármacos antileishmania fueron mencionadas anteriormente en el capítulo 1. Datos tomados de DrugBank, a excepción del nerolidol tomado de NCBI.

### ***3.2.4 Prueba de citotoxicidad compuestos/inhibidores en células Vero y THP-1***

Las células Vero ( $7 \times 10^4$  células/mL) y las células THP-1 ( $6 \times 10^5$  células/mL) transformadas con PMA fueron tratadas con diluciones seriadas 1:3 de cada compuesto/inhibidor a 300, 100, 33.33, 11.11, 3.70 y 1,23  $\mu\text{M}$ , en placa de 96 pozos. (Tabla 7). Se dejaron células de control en medio DMEM con 5% de SFBi sin compuesto. Después de 72 h de incubación a 37 °C, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de MTT (2 mg/mL, Sigma-Aldrich) a cada pozo y se incubó durante 4 h adicionales. Se retiró el medio suavemente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO a cada pozo y se agitó la placa durante 5 min para permitir que los cristales se disolvieran por completo. Finalmente, la placa fue leída en el lector de placas mencionado en el capítulo 2, a una longitud de onda de 580 nm. Los resultados se expresaron como la concentración citotóxica 50 ( $\text{CC}_{50}$ ). Se consideraron tóxicos los fármacos con  $\text{CC}_{50} < 20 \mu\text{M}$ , medianamente tóxicos de  $>20$  a  $<100 \mu\text{M}$ , no tóxicos con  $\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ .

### ***3.2.5 Prueba de susceptibilidad de los parásitos a compuestos/inhibidores***

Los promastigotes 40R y WT ( $1 \times 10^6$  parásitos/mL) fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de los compuestos/inhibidores mencionados en la tabla 7 de este capítulo, en concentraciones de 300 a 1,23  $\mu\text{M}$  y de 10 a 0,12  $\mu\text{M}$ , según el fármaco/compuesto, durante 72 horas a 27 °C. Los parásitos control fueron sembrados sólo con medio de cultivo. La inhibición del crecimiento del parásito se determinó mediante el método de reducción de rezaurina, con lectura a 570 y 600 nm (Salazar-Villamizar & Escobar, 2022), como se menciona en el capítulo 1. Brevemente, los resultados de actividad de los compuestos/inhibidores se calcularon comparando la absorbancia de los parásitos tratados con la de los controles (sin tratamiento). La  $\text{CI}_{50}$  se calculó a partir de los porcentajes de

inhibición y las concentraciones de los fármacos/compuestos, utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1. Se compararon los resultados entre las cepas 40R y WT, calculando el índice de resistencia (IR) como la razón entre la  $CI_{50}$ -40R y la  $CI_{50}$ -WT. Adicionalmente, se calcularon los IS obteniendo el cociente entre la  $CC_{50}$  del compuesto/inhibidor en las células y la  $CI_{50}$  del compuesto/inhibidor en los parásitos.

### **3.2.6 *Reversión de la resistencia por compuestos/inhibidores***

Una vez determinada la potencia de los fármacos y compuestos en las dos cepas (numeral 3.2.5), los parásitos 40R y WT fueron incubados con concentraciones no tóxicas (**Tabla 8**). Como controles, se sembraron parásitos en medio sin compuestos/inhibidores durante 8 y 15 días, con dos pases semanales. La susceptibilidad de los parásitos a MTF se determinó a los 8 y 15 días de tratamiento mediante el método de la resazurina. Se determinaron la  $CI_{50}$  de la MTF, los porcentajes de inhibición y las diferencias de  $CI_{50}$  respecto al control y entre las cepas 40R y WT. Debido a la alta variabilidad de los valores absolutos de  $CI_{50}$  entre ensayos independientes, se calculó un índice de reversión de resistencia (IRR) o de mejoramiento de la actividad (IMA) para la cepa 40R y WT, respectivamente, ambos calculados como el cociente entre la  $CI_{50}$  del parásito tratado y su control no tratado.  $IRR/IMA < 1$  se consideró como reversión de la resistencia, entre 1 y 4 indiferente y  $> 4$  potenciador de la resistencia. Esto permitió comparar el efecto relativo de cada compuesto sobre la reversión de la resistencia, reduciendo el impacto de la variación entre ensayos.

**Tabla 8** *Detalles del tratamiento de reversión en las cepas 40R y WT de L. amazonensis*

Compuesto	WT	40R
FNS	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
NLD	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
CCM	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
SLB	Los tratamientos con la tercera y la quinta parte provocan la muerte del parásito. Décima parte de CI <sub>50</sub>	Tratamientos con la tercera, quinta y décima parte provocan la muerte del parásito a los 8 o 15 días. Vigésima parte de CI <sub>50</sub>
POZ	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
VPM	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
PMM	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
ELD	Tercera parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>
PMD	Los tratamientos con la tercera parte provocan la muerte del parásito. Quinta parte de CI <sub>50</sub>	Tercera parte de CI <sub>50</sub>

NOTA: Proporción de las CI<sub>50</sub> empleadas en los tratamientos de reversión en las cepas WT y 40R.

### 3.2.7 Interacción de fármacos

La naturaleza de la interacción de MTF (fármaco 2) con compuestos/inhibidores (fármaco 1) mencionados en el numeral 2.3 de este capítulo fue determinada mediante diluciones de proporción fija en promastigotes 40R y WT. Se prepararon las combinaciones de radio fijo entre el fármaco 1: fármaco 2 de (A) 5:0, (B) 4:1, (C) 3:2, (D) 2:3, (E) 1:4, (F) 0:5. La combinación de radio fijo A correspondió al fármaco 1 y la F al fármaco 2 (MTF), de las cuáles se obtuvo la CI<sub>50</sub> de cada fármaco/compuesto. Los promastigotes fueron tratados con diluciones 1:2 de cada combinación de radio fijo durante 72 horas a 27 °C. El porcentaje de inhibición y la CI<sub>50</sub> de cada combinación de radio fijo se calcularon a partir de la relación

entre las concentraciones de cada fármaco y la absorbancia, según lo descrito anteriormente.

Posteriormente, se calcularon los FIC de radio (B, C, D, E) para cada fármaco (1 y 2), así:

- FIC Fármaco 1 radio B:  $\frac{CI_{50} \text{ fármaco 1 radio B}}{CI_{50} \text{ fármaco 1 radio A}}$ , esto se repite para los radios C, D y E (numerador), con las  $CI_{50}$  calculadas para el fármaco 1 (denominador constante). Se obtienen cuatro datos de FIC para el fármaco 1, uno para cada radio (B, C, D, E).
- FIC Fármaco 2 radio B:  $\frac{CI_{50} \text{ fármaco 2 radio B}}{CI_{50} \text{ fármaco 2 radio F}}$ , esto se repite para los radios C, D y E (numerador), con las  $CI_{50}$  calculadas para el fármaco 2 (denominador constante). Se obtienen cuatro datos de FIC para el fármaco 2 (MTF), uno para cada radio (B, C, D, E).

A continuación, se calculó la  $\sum$ FICs para cada radio, según lo descrito por (Salazar-Villamizar & Escobar, 2022), obteniéndose cuatro datos así:

- FIC radio B del fármaco 1 + FIC radio B del fármaco 2.
- FIC radio C del fármaco 1 + FIC radio C del fármaco 2.
- FIC radio D del fármaco 1 + FIC radio D del fármaco 2.
- FIC radio E del fármaco 1 + FIC radio E del fármaco 2.

Por último, se promedió la  $\sum$ FICs. Los resultados fueron expresados con base en el tipo de interacción así: sinérgica ( $\leq 1$ ), indiferente/aditiva ( $>1$  y  $<4$ ) o antagónica ( $\geq 4$ ). Los isobogramas se construyeron relacionando los FIC del fármaco 1 con los del fármaco 2 (MTF). Todas las interacciones son el resultado de tres réplicas biológicas independientes.

### 3.2.8 *Análisis estadístico*

Se analizaron los IRR/IMA de los tratamientos de reversión, primero evaluando la normalidad de los IRR/IMA con la prueba de Shapiro-Wilk (Prism GraphPad 8.0.1) y luego

la igualdad de varianzas (Excel). Se empleó la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas entre el IRR/IMA del tratamiento a los 8 días y el tratamiento a los 15 días, en cada cepa (40R y WT), y entre los tratamientos en ambas cepas. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

En los ensayos de interacción de fármacos, se evaluó la normalidad de la  $\Sigma$ FIC de cada ensayo independiente en las cepas WT y 40R mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Prism GraphPad 8.0.1) y la prueba de igualdad de varianzas (Excel). Se empleó la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas entre la  $\Sigma$ FIC de la cepa WT y la de la cepa 40R. Se aplicó la prueba de ANOVA de una vía para determinar el compuesto más tóxico en las células THP-1 y se empleó el test post hoc de Dunn (Prism GraphPad 8.0.1). Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

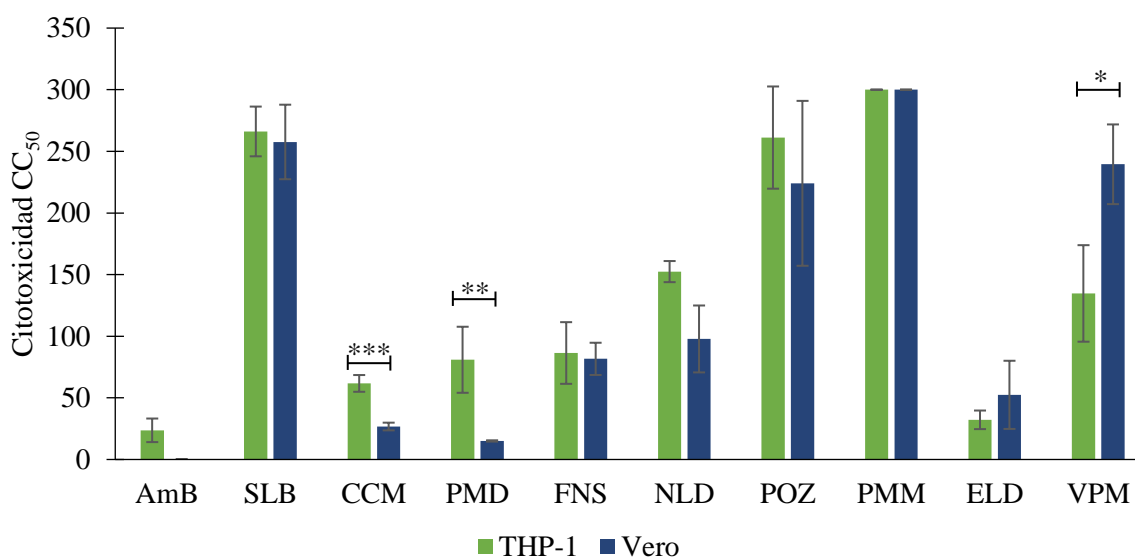
### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Citotoxicidad de los fármacos/compuestos en células THP-1 y Vero

En células THP-1, la AmB presentó una  $CC_{50}$  de  $23,66 \pm 9,56 \mu\text{M}$ ; la SLB de  $266,12 \pm 20,18 \mu\text{M}$ ; la CCM de  $61,72 \pm 6,79 \mu\text{M}$ ; la PMD de  $80,89 \pm 26,79 \mu\text{M}$ ; el FNS de  $86,39 \pm 25,01 \mu\text{M}$ ; el NLD de  $152,43 \pm 8,57 \mu\text{M}$ ; el POZ de  $261,15 \pm 41,47 \mu\text{M}$ ; en la PMM fue  $>300 \mu\text{M}$ ; en ELD de  $32,17 \pm 7,54 \mu\text{M}$  y en VPM de  $134,72 \pm 39,15 \mu\text{M}$ . Los compuestos de SLB, NLD, POZ, PMM y VPM presentaron valores de  $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$  y fueron considerados no citotóxicos. El más tóxico fue la AmB con un valor de  $CC_{50}$  de  $23,66 \pm 9,56 \mu\text{M}$ , presentando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la mayoría de los compuestos, a excepción de ELD, CCM, PMD y FNS. La AmB no fue evaluada en las células Vero.

En células Vero, los compuestos SLB, CCM, PMD, FNS, NLD, POZ, PMM, ELD y VPM presentaron valores de  $CC_{50}$  entre 26,75 y 300  $\mu$ M. Los compuestos POZ, PMM y VPM presentaron  $CC_{50} > 100 \mu$ M y fueron considerados no citotóxicos. La CCM y la PMD fueron significativamente más citotóxicas en células Vero que en células THP-1 ( $p=0,0009$  y  $p=0,008$ , respectivamente), y el VPM fue significativamente más citotóxico en células THP-1 que en células Vero ( $p=0,02$ ) (**Figura 16**).

**Figura 16** Citotoxicidad de fármacos y compuestos en células THP-1 y Vero



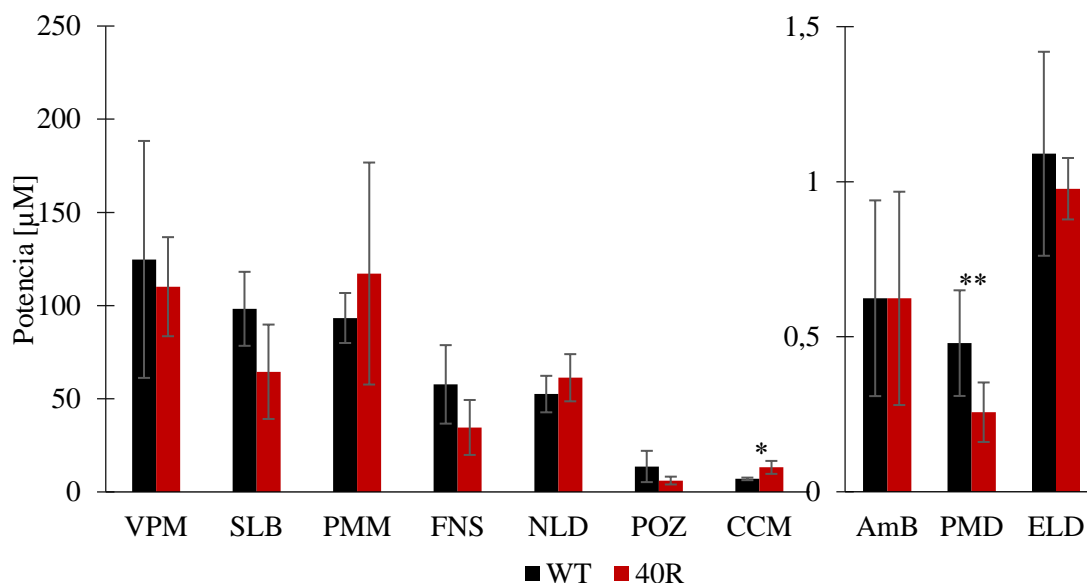
NOTA: la gráfica muestra los promedios de  $CC_{50} \mu$ M  $\pm$  D.E. de compuestos/inhibidores en una línea tumoral (THP-1) y no tumoral (Vero), producto de mínimo 3 ensayos independientes ( $n=3$ ). Las diferencias en la citotoxicidad entre las líneas celulares se calcularon mediante la prueba t de Student. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.3.2 *Actividad antileishmania de compuestos/inhibidores en las cepas WT y 40R de L. amazonensis*

Para las cepas WT y 40R, la potencia ( $CI_{50}$ ) de la AmB fue similar ( $p > 0,05$ ) con valores de  $CI_{50}$   $0,62 \pm 0,32$  y  $0,63 \pm 0,33$   $\mu\text{M}$ , respectivamente (**Figura 17**). De manera similar, el POZ y el ELD mostraron una potencia de  $CI_{50}$   $13,66 \pm 8,40$  y  $6,10 \pm 2,10$   $\mu\text{M}$  para el POZ y de  $1,09 \pm 0,33$  y  $0,98 \pm 0,10$   $\mu\text{M}$  para el ELD, respectivamente, sin diferencias significativas entre WT y 40R ( $p > 0,05$ ).

Los compuestos como el VPM, SLB, PMM, FNS y NLD (**Figura 17**) no resultaron tan potentes en ninguna de las dos cepas, con valores de  $CI_{50}$  superiores a 50  $\mu\text{M}$ . La actividad del VPM no presentó diferencias en su potencia ( $p > 0,05$ ), siendo de  $124,76 \pm 63,58$   $\mu\text{M}$  para la WT y de  $110,13 \pm 26,57$   $\mu\text{M}$  para la 40R. La PMM presentó un comportamiento similar, sin diferencias entre cepas, con valores de  $CI_{50}$  de  $93,33 \pm 13,41$   $\mu\text{M}$  y  $117,19 \pm 59,57$   $\mu\text{M}$ . La SLB presentó una mayor potencia en relación con el VPM y la PMM, con  $CI_{50}$  de  $98,26 \pm 19,85$  para WT y de  $64,48 \pm 25,32$  para 40R, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). El FNS mantuvo su actividad similar en ambas cepas, siendo la  $CI_{50}$  para la WT de  $57,71 \pm 21,06$   $\mu\text{M}$  y para 40R de  $34,59 \pm 14,74$   $\mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ). Asimismo, el NLD presentó una potencia similar en ambas cepas:  $52,50 \pm 9,79$   $\mu\text{M}$  en la cepa WT y  $61,28 \pm 12,66$   $\mu\text{M}$  en la cepa 40R, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

**Figura 17.** Potencia de los fármacos y compuestos en las cepas 40R y WT de *L. amazonensis*.

NOTA: la gráfica muestra la potencia, en  $\mu\text{M}$ , de cada compuesto/inhibidor en las cepas 40R (rojo) y WT (barras negras) de *L. amazonensis*. La gráfica muestra el promedio de al menos 3 ensayos independientes ( $n=3$ ). Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Las diferencias en la citotoxicidad entre cepas se calcularon mediante la prueba t de Student. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

La PMD fue significativamente ( $p = 0,005$ ) más potente en la cepa 40R con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $0,26 \pm 0,1 \mu\text{M}$  en comparación a  $0,48 \pm 0,17 \mu\text{M}$  en la cepa WT (**Figura 17**). Al igual que la PMD, la CCM mostró diferencias en su potencia según la cepa, puesto que fue significativamente ( $p = 0,02$ ) más potente en la cepa WT ( $7,00 \pm 0,69 \mu\text{M}$ ) que en la 40R ( $13,16 \pm 3,48 \mu\text{M}$ ).

Los IS obtenidos para las THP-1 en relación con la cepa WT indicaron que la mayoría de los fármacos/compuestos empleados presentan selección por el parásito (Tabla 9), siendo la PMD el fármaco más selectivo, con un IS de 165,83, seguido del ELD con 29,52, del POZ con 19,12 y del CCM con 8,82. A excepción del VPM con un  $\text{IS} = 0,83$ , los demás

compuestos fueron medianamente selectivos. Los IS para las THP-1 en relación con la cepa 40R mostraron que los fármacos como la PMD y el POZ incrementaron su selectividad a casi el doble, con valores de 315,29 y 42,82, respectivamente (**Tabla 9**). Algunos compuestos incrementaron en menor medida su selectividad, como la SLB, FNS, ELD y VPM, y otros, como la CCM, NDL y PMM, disminuyeron los IS.

Por otro lado, los valores de IS calculados entre las células Vero y WT mostraron que, para la PMD y la CCM, fueron menores que en las THP-1, con IS de 30,83 y 3,82, respectivamente. El compuesto más selectivo en las células Vero frente a WT fue el ELD, con un IS=48,11, y se comportó de manera similar frente a la 40R, con un IS=53,65, aunque el compuesto más selectivo frente a la 40R fue la PMD, con un IS=58,62. La selectividad de la PMM permaneció constante tanto frente a WT como frente a 40R en células Vero (**Tabla 9**).

**Tabla 9** IS de los fármacos/compuestos en células THP-1 y Vero.

Célula (CC <sub>50</sub> ) / Cepa (CI <sub>50</sub> )	IS								
	SLB	CCM	PMD	FNS	NLD	POZ	PMM <sup>+</sup>	ELD	VPM
THP-1/WT	2,71	8,82	165,8 3	1,50	2,90	19,12	3,21	29,52	0,83
THP-1/40R	4,13	4,69	315,2 9	2,50	1,73	42,82	2,56	32,92	1,34
Vero/WT	2,62	3,82	30,83	1,41	1,86	16,41	3,21	48,11	1,47
Vero/40R	4,00	2,03	58,62	2,36	1,11	36,73	2,56	53,65	2,38

NOTA: la tabla muestra los IS de los compuestos y fármacos en células THP-1 y Vero. <sup>+</sup>Los IS de este fármaco son un estimado puesto que su citotoxicidad en células fue >300  $\mu$ M que fue la concentración máxima evaluada para todos los compuestos.

### 3.3.3 *Reversión de la resistencia / potenciamiento de la actividad*

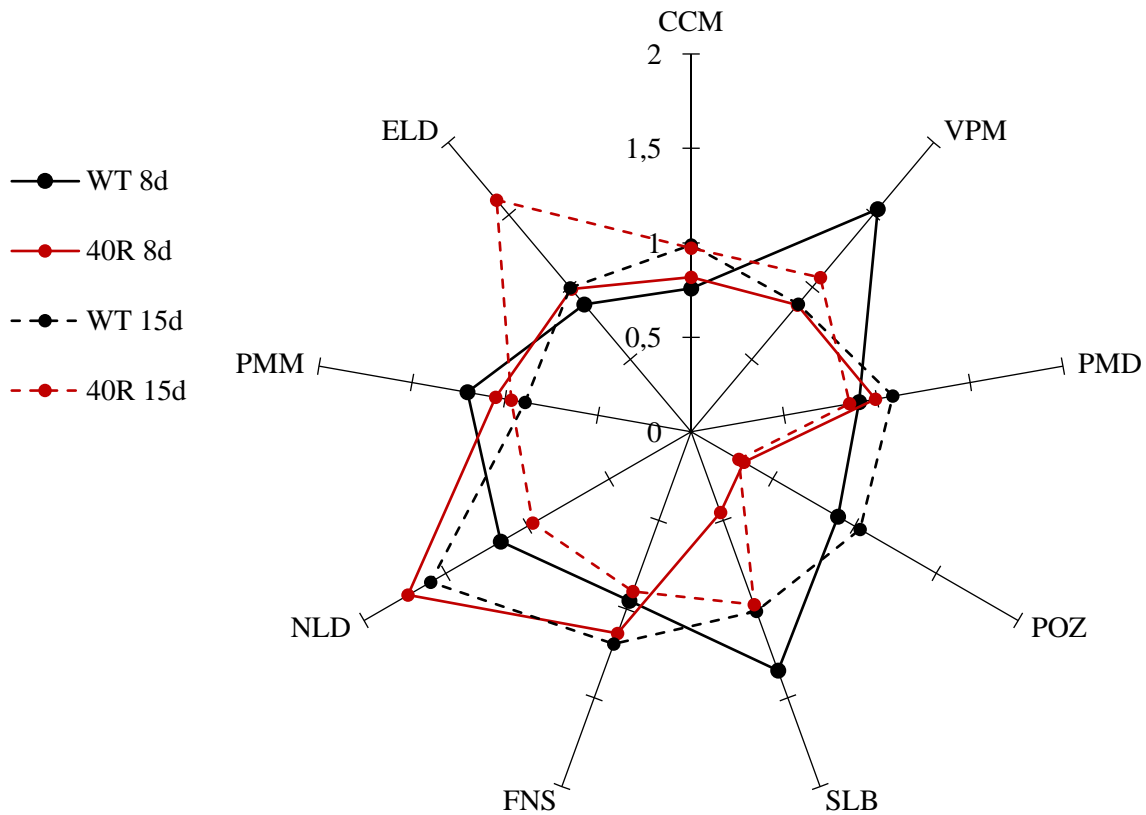
El tratamiento por 8 días con curcumina causó una ligera reversión de la resistencia a MTF con un IRR  $\pm$  DE ( $CI_{50}$  del parásito tratado/control no tratado) de  $0,82 \pm 0,21$  en la cepa 40R, pero ejerció un efecto similar (incremento en la susceptibilidad a MTF) en la cepa WT con un IMA de  $0,76 \pm 0,31$  ( $p > 0,05$ ) (**Figura 18**). Adicionalmente, en el tratamiento con CCM por 15 días, este efecto se ve aún menos con IRR e IMA más cercanos a 1, como  $0,97 \pm 0,10$  y  $0,99 \pm 0,24$ , respectivamente ( $p > 0,05$ ).

El tratamiento con VPM durante 8 días en la cepa 40R exhibió un comportamiento similar al de la CCM, con un IRR de  $0,87 \pm 0,18$  y, a los 15 días, de  $1,07 \pm 0,09$ , y un efecto similar en la cepa WT, con IMA de  $1,53 \pm 1,01$  y  $0,89 \pm 0,19$ , en su orden. No se evidenciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en ninguna temporalidad de tratamiento entre las cepas 40R y WT, lo que indica que el fármaco no ejerce ningún efecto sobre la potencia de la MTF. De igual manera, la PMD no tuvo efecto alguno en ninguna de las dos cepas con IRR/IMA cercanos a 1, similares en todos los tiempos. El FNS generó IRR/IMA a los 8 días de  $1,14 \pm 0,13$  y  $0,95 \pm 0,62$ , y a los 15 días de  $0,90 \pm 0,14$  y  $1,20 \pm 0,15$  en las cepas 40R y WT, respectivamente, lo que indica un efecto nulo en la reversión de la resistencia. El mismo comportamiento se observó en los tratamientos con NLD, PMM y ELD, que no presentaron diferencias importantes en su efecto ni en relación con el tiempo ni con la cepa ( $p > 0,05$ ). Adicionalmente, el NLD parece generar una tendencia al incremento de la resistencia a MTF independientemente de la cepa (**Figura 18**).

En contraste, el POZ exhibió una importante reducción en el IRR en el 8 y 15 día de tratamiento en la cepa 40R de  $0,32 \pm 0,12$  y  $0,29 \pm 0,11$  los cuales difieren totalmente de los IMA en la cepa WT como  $0,90 \pm 0,11$  y  $1,03 \pm 0,35$ , es decir, una reducción de la resistencia cercana al 70% en la cepa 40R y de manera significativa (8 días:  $p = 0,008$ ; 15 días:  $p =$

0,048), respectivamente. Esto indica que el efecto del POZ en el incremento en la susceptibilidad a la MTF, está relacionado con la resistencia a MTF en sí misma, debido a la carencia de actividad en la cepa WT en las dos temporalidades; esto se evidencia en la gráfica al estar dentro del radio de 0,5 para la cepa 40R (**Figura 18**). De manera similar, la SLB se mostró prometedora en el tratamiento de 8 días de la 40R con un IRR de  $0,45 \pm 0,05$ , es decir, una reducción significativa ( $p = 0,0002$ ) del 50% de la resistencia, en comparación con el esquema de 15 días, en el cual el efecto se pierde completamente mostrando un IRR de  $0,97 \pm 0,02$ . Al igual que en el esquema con el POZ, este efecto positivo de reversión de la resistencia es exclusivo de la cepa 40R, puesto que el tratamiento de 8 días con SLB en la WT mostró un IMA de  $1,35 \pm 0,40$  y, a los 15 días, un IMA de  $1,01 \pm 0,09$ . Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en la intervención de 8 días ( $p = 0,036$ ).

**Figura 18** Efecto de tratamientos con fármacos/compuestos por 8 y 15 días en las cepas WT y 40R de *L. amazonensis*



NOTA: la gráfica presenta los IRR/IPA de cada compuesto o fármaco después de 8 (línea continua) y 15 (línea interrumpida) días de tratamiento en las cepas 40R (roja) y WT (negra). Los valores dentro del radio de 0,5 indican una reversión de la resistencia de mínimo del 50%. Los valores en el radio 1 indican un efecto indiferente de la cepa.

### 3.3.4 Interacción de fármacos

La combinación MTF+AmB exhibió una interacción de aditividad (**Figura 6**) con FICs entre 1,59 y 3,02 en la cepa WT y un efecto parecido en la 40R donde mostró FICs entre 1,70 y 2,60. De manera similar, aunque la interacción MTF+PMD mostró un promedio de  $\Sigma$ FIC menor en la cepa 40R en comparación con la WT, continuó siendo una relación

indiferente (FICs entre 1,21 a 2,56 para WT y 0,94 a 1,05 para 40R). El mismo efecto de indiferente se observa en la combinación MTF+PMM con FIC para la cepa WT entre 1,23 y 1,46 y de 1,04 a 1,22 con el mismo comportamiento en ambas cepas. Ninguna de las interacciones mencionadas mostró diferencias entre cepas ( $p > 0,05$ ). De igual manera, el VPM también mostró ser indiferente en combinación con la MTF con  $\sum$ FICs entre 1,20 y 1,32 para la cepa WT y de 1,01 a 1,23 para la cepa 40R; sin embargo, el VPM disminuyó significativamente la tolerancia a MTF de la cepa WT ( $p = 0,04$ ). Las combinaciones de MTF con ELD, FNS o NLD presentaron un comportamiento muy similar con FICs en la cepa WT, entre 1,06 y 1,83, y en la cepa 40R, entre 1,10 y 1,95, lo que indica una interacción indiferente y sin diferencias significativas entre cepas ( $p > 0,05$ ).

La interacción MTF+CCM tampoco se configuró como una combinación prometedora con relaciones de aditividad entre 1,08 y 1,31 y de 1,44 a 1,59 para la cepa WT y 40R, respectivamente, aunque se observaron diferencias ( $p = 0,013$ ) entre las dos cepas, indicando que la interacción MTF+CCM incrementaba significativamente la resistencia a MTF en la cepa 40R.

De manera general, la combinación MTF+SLB mostró aditividad al no presentar FIC promedio  $< 1$  en ambas cepas, pero la proporción 1:4 en la cepa 40R mostró un comportamiento ligeramente sinérgico en dos de los tres ensayos independientes, con valores de 0,94 y 0,84.

Por otro lado, la interacción MTF+POZ exhibió un comportamiento indiferente en la cepa WT con un promedio de  $\sum$ FICs de  $1,40 \pm 0,23$  y en uno de los tres ensayos independientes la  $\sum$ FIC de los fármacos llegó a 2,9; sin embargo, en la cepa 40R esta combinación se mostró medianamente sinérgica (**Figura 19**) con un promedio de  $\sum$ FIC de 0,83 resaltando que en las proporciones de los fármacos de 3:2 se obtuvieron valores de 0,52

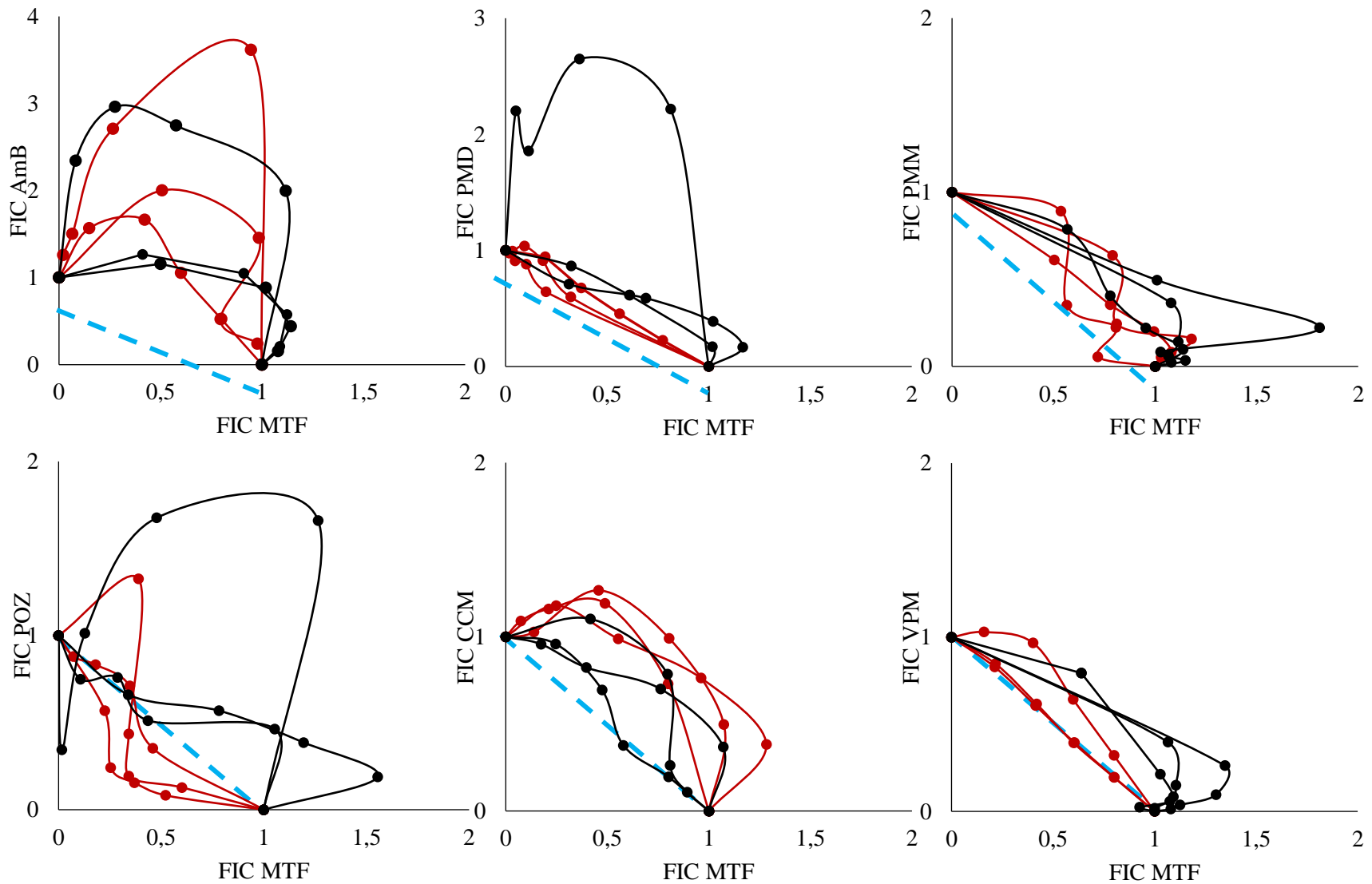
y 0,54 y en el radio 4:1 de 0,60, 0,73 y 0,81 en cada ensayo independiente, respectivamente, indicando que en esas proporciones los fármacos presentan una mejor actividad sinérgica y siendo significativamente más sinérgica en la cepa 40R en la combinación 3:2 ( $p = 0,047$ ). La interacción MTF+POZ fue significativamente sinérgica en la cepa 40R ( $p = 0,025$ ) en comparación con la cepa WT.

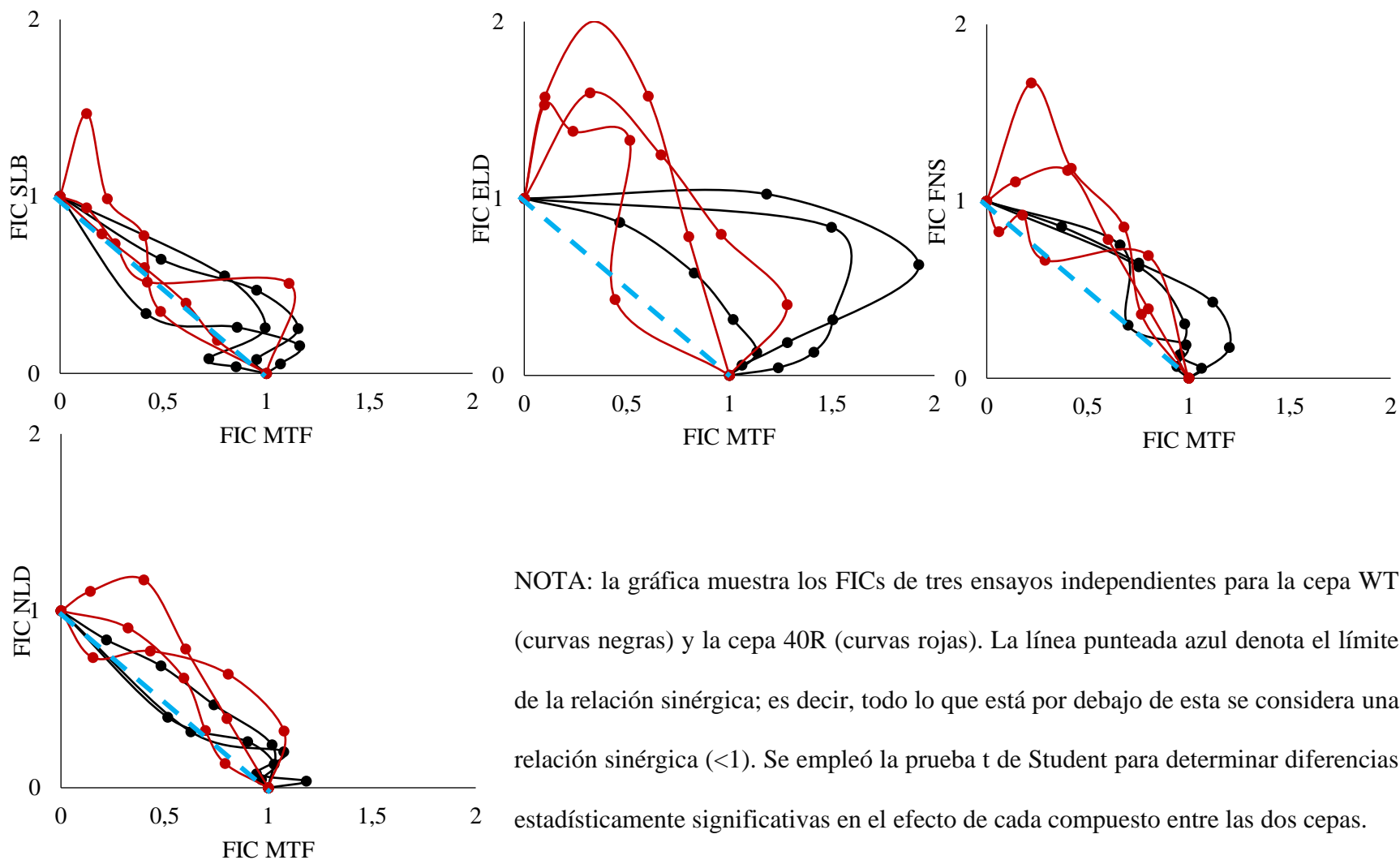
**Tabla 10** Interacción de fármacos en promastigotes de *L. amazonensis*, cepas WT y 40R, la concentración inhibitoria fraccional (FIC) para cada punto (4:1 a 1:4), el promedio de  $\Sigma FIC$ , y el tipo de interacción exhibida.

F2	F1	Exp	FIC de la IC <sub>50</sub>				$\Sigma FIC$ promedio $\pm$ SD	Interacción
			Combinaciones de radio fijo					
			4:1	3:2	2:3	1:4		
MTF	AmB	1	2,42 2,51	3,24 2,44	3,32 1,32	3,11 1,22	3,02 $\pm$ 0,35 1,87 $\pm$ 0,60	Indiferente Indiferente
		2	1,66 1,71	1,90 2,09	1,58 1,65	1,23 1,32	1,59 $\pm$ 0,24 1,69 $\pm$ 0,27	Indiferente Indiferente
		3	1,68 1,28	1,96 1,57	1,70 2,97	1,30 4,56	1,66 $\pm$ 0,24 2,60 $\pm$ 1,30	Indiferente Indiferente
	PMD	1	1,02 1,03	1,28 1,13	1,41 1,09	1,33 0,92	1,26 $\pm$ 0,15 1,04 $\pm$ 0,08	Indiferente Indiferente
		2	2,25 0,99	1,97 0,95	3,01 0,98	3,03 0,84	2,57 $\pm$ 0,47 0,94 $\pm$ 0,06	Indiferente Indiferente
		3	1,19 1,14	1,22 1,05	1,22 1,01	1,19 1,00	1,21 $\pm$ 0,02 1,05 $\pm$ 0,05	Indiferente Indiferente
	PMM	1	1,50 1,43	2,03 1,05	1,11 1,34	1,18 1,08	1,46 $\pm$ 0,36 1,22 $\pm$ 0,16	Indiferente Indiferente
		2	1,44 1,43	1,25 0,92	1,12 1,03	1,10 0,77	1,23 $\pm$ 0,13 1,04 $\pm$ 0,24	Indiferente Indiferente
		3	1,35 1,11	1,18 1,13	1,17 1,19	1,23 1,16	1,24 $\pm$ 0,07 1,15 $\pm$ 0,03	Indiferente Indiferente
	POZ*	1	0,86 0,79	1,05 0,49	0,95 0,52	1,52 0,60	1,09 $\pm$ 0,25 0,60 $\pm$ 0,12	Indiferente Sinérgica
		2	1,00 1,71	1,35 0,78	1,58 0,53	1,74 0,73	1,42 $\pm$ 0,28 0,94 $\pm$ 0,46	Indiferente Indiferente
		3	0,36 0,95	1,14 1,01	2,15 1,06	2,92 0,81	1,39 $\pm$ 0,23 0,96 $\pm$ 0,09	Indiferente Indiferente
CCM	1	1,13	1,22	1,46	1,44	1,31 $\pm$ 0,14	Indiferente	

**		1,17	1,3	1,68	1,53	1,44±0,19	Indiferente
	2	1,52	1,58	1,07	1,00	1,29±0,26	Indiferente
		1,43	1,54	1,72	1,66	1,59±0,11	Indiferente
	3	1,20	1,17	0,95	1,00	1,08±0,11	Indiferente
		1,17	1,72	1,80	1,57	1,56±0,24	Indiferente
VPM	1	1,46	1,25	1,13	0,95	1,20±0,19	Indiferente
		1,19	1,37	1,24	1,12	1,23±0,09	Indiferente
	2	1,61	1,40	1,16	1,09	1,31±0,20	Indiferente
		1,06	1,04	0,99	1,00	1,02±0,03	Indiferente
	3	1,43	1,43	1,24	1,18	1,32±0,11	Indiferente
		1,04	1,02	1,00	1,00	1,01±0,02	Indiferente
SLB	1	0,75	1,12	1,32	1,12	1,08±0,20	Indiferente
		1,06	1,00	0,94	1,62	1,15±0,27	Indiferente
	2	1,3	1,25	0,80	0,89	1,07±0,23	Indiferente
		0,99	1,01	1,01	0,95	0,99±0,02	Indiferente
	3	1,13	1,42	1,41	1,03	1,25±0,17	Indiferente
		1,60	1,22	1,18	0,84	1,21±0,27	Indiferente
ELD	1	2,21	2,55	1,47	1,12	1,83±0,57	Indiferente
		1,63	1,62	1,84	0,87	1,49±0,37	Indiferente
	2	2,33	1,82	1,54	1,28	1,74±0,39	Indiferente
		1,67	2,34	2,18	1,58	1,95±0,32	Indiferente
	3	1,33	1,41	1,33	1,26	1,33±0,05	Indiferente
		1,92	1,91	1,76	1,68	1,82±0,10	Indiferente
FNS	1	1,41	1,00	1,17	1,01	1,15±0,17	Indiferente
		1,89	1,60	1,53	1,13	1,54±0,27	Indiferente
	2	1,38	1,29	1,09	1,12	1,22±0,12	Indiferente
		1,2	1,57	1,38	1,19	1,35±0,15	Indiferente
	3	1,23	1,40	1,55	1,37	1,39±0,11	Indiferente
		0,89	1,10	0,95	1,49	1,11±0,23	Indiferente
NLD	1	0,91	1,16	1,16	1,01	1,06±0,10	Indiferente
		1,23	1,21	1,02	0,93	1,10±0,13	Indiferente
	2	0,94	1,28	1,02	1,22	1,12±0,14	Indiferente
		1,25	1,57	1,38	1,19	1,35±0,15	Indiferente
	3	1,06	1,17	1,21	1,26	1,17±0,07	Indiferente
		0,89	1,20	1,45	1,40	1,23±0,22	Indiferente

NOTA: interacciones farmacológicas de la MTF con otros fármacos/compuestos para el manejo de cepas 40R, observados en rojo. Los resultados de los tratamientos en WT se observan en negro. F: fármaco. \*Diferencias estadísticas del tratamiento entre las cepas 40R (rojo) y WT (negro), p=0,025. \*\*Diferencias estadísticas del tratamiento entre las cepas 40R y WT, p=0,013.

**Figura 19** Isobogramas de las cepas 40R y WT de *L. amazonensis*



NOTA: la gráfica muestra los FICs de tres ensayos independientes para la cepa WT (curvas negras) y la cepa 40R (curvas rojas). La línea punteada azul denota el límite de la relación sinérgica; es decir, todo lo que está por debajo de esta se considera una relación sinérgica ( $<1$ ). Se empleó la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas en el efecto de cada compuesto entre las dos cepas.

### 3.4 Discusión

En este trabajo, SLB y el POZ demostraron su capacidad para revertir el fenotipo resistente a la MTF. En particular, en la cepa 40R la SLB logró disminuir significativamente ( $p = 0,0002$ ) la resistencia en un 50% a los 8 días de tratamiento en comparación con los 15 días, aunque este efecto desapareció a los 15 días. Este incremento en la susceptibilidad a MTF fue exclusivo de la cepa 40R ( $p = 0,036$ ). Sin embargo, el tratamiento individual de cepas resistentes con SLB no se ha reportado. Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento de *L. infantum* con concentraciones de SLB  $> 400 \mu\text{M}$  indujo la producción significativa de ROS después de 72 horas de tratamiento en comparación con la cepa sin tratamiento pero que tenía un valor de su  $\text{CI}_{50}$  en los parásitos de  $416,7 \mu\text{M}$ , es decir, similar a la concentración del tratamiento ( $400 \mu\text{M}$ ), siendo esta producción significativa de ROS atribuida a la inhibición de la TR (Debize da Motta *et al.*, 2025). Sin embargo, las concentraciones empleadas en este trabajo fueron entre 10 y 20 veces menores en comparación a la  $\text{CI}_{50}$  de la SLB en cada cepa. Se emplearon  $7,9 \mu\text{M}$  para la cepa WT y  $2,8 \mu\text{M}$  para la cepa 40R, mientras que la potencia de la SLB fue de  $78,76 \mu\text{M}$  y  $56,97 \mu\text{M}$ , respectivamente. Como se plantea en capítulos anteriores, se ha mostrado que en cepas R-MTF se inhibe la TR (Neira Fuentes, 2025), por lo que el ataque de esta enzima a través de dos vías podría llevar al parásito 40R al colapso del sistema de defensa frente a ROS, incrementando la susceptibilidad a MTF. Por ello, la SLB no produce un efecto similar en la cepa WT, ya que esta no tendría compromiso del sistema de detoxificación de ROS. No obstante, se debe evaluar si la inhibición de la enzima por la SLB ocurre a concentraciones tan bajas como las empleadas en este trabajo y si se mantiene con el tiempo o si el parásito logra evadir de alguna forma este mecanismo de acción, dado que su efecto se desvanece a los 15 días de tratamiento.

Por otro lado, el compuesto más prometedor fue el POZ, con una reversión de hasta el 70% de la resistencia a los 8 y 15 días de tratamiento, sin diferencias entre ambos esquemas. Esta reducción solo se presentó en la cepa 40R, siendo estadísticamente distinta en comparación con la cepa WT a los 8 ( $p = 0,0079$ ) y 15 días ( $p = 0,046$ ) de tratamiento. El POZ inhibe a la esterol-14 $\alpha$ -demetilasa (también conocida como CYP51) la cual tiene como función la desmetilación del lanosterol, que dará lugar al ergosterol, componente importante de las membranas celulares. Se ha reportado el incremento de lanosterol en las membranas plasmáticas de parásitos de *Leishmania* tratados con POZ (Feng *et al.*, 2022), lo cual promueve una desorganización de la fase líquida e incide negativamente en la formación del dominio lipídico en las membranas (Cournia *et al.*, 2007), es por ello que evolutivamente la membrana plasmática contiene ergosterol en lugar de lanosterol. Sin embargo, autores como Rakotomanga *et al.*, 2005 no encontraron presencia de ergosterol en las membranas mitocondriales de cepas nativas de *L. donovani* pero sí en cepas R-MTF, lo que podría sugerir que el POZ también puede actuar a nivel mitocondrial. Con base en esto, el hecho de que este efecto solo se observe en la cepa 40R sugiere que la membrana ya presenta un desequilibrio en la síntesis de ergosterol que podría ser exacerbado por el tratamiento con POZ, lo que comprometería aún más su integridad e incrementaría la susceptibilidad a ese fármaco.

Además de su rol como compuesto *reversor* de la resistencia, el POZ también mostró un comportamiento sinérgico con la MTF en la cepa 40R y fue significativamente distinto de la relación de aditividad observada en la cepa WT ( $p = 0,025$ ), lo que resalta que la combinación 3:2 fue significativamente sinérgica en la cepa 40R ( $p = 0,047$ ). Estudios similares han sido reportados en casos clínicos aislados de *L. panamensis* que presentaban sensibilidad disminuida al fármaco y fueron tratados con MTF+POZ, que resultó

significativamente más potente que la MTF por sí sola (Fernández *et al.*, 2022). Esto podría sugerir que el POZ actúa sobre los mecanismos de resistencia asociados al fenotipo de resistencia a MTF. Además, puede estar relacionado con las vías de síntesis de ergosterol, estables en la cepa nativa y distintas de lo que sucede en la cepa 40R. Sería interesante determinar el papel de marcadores como *mt*, *ros3* y bombas de eflujo en el tratamiento combinado de MTF+POZ, o incluso del POZ por sí solo, para identificar si el POZ también interfiere con los mecanismos específicos de resistencia a MTF.

A pesar de su efecto como agente de reversión, la SLB no mostró un efecto sinérgico con la MTF en ninguna de las dos cepas, lo que podría sugerir que el mecanismo de acción podría tener mayor relación con el pretratamiento sostenido y no con la administración en combinación con cepas de *L. amazonensis*. Sin embargo, se había reportado su actividad sinérgica con DNM en cepas de *L. infantum* MDR (multirresistente) resistentes a DNM, MTF y edelfosina (J. M. Pérez-Victoria, Pérez-Victoria, Conseil, et al., 2001). Derivados de la SLB con mayor afinidad por la proteína transportadora tipo Pgp, fueron empleados en combinación con 150  $\mu$ M de DNM causando inhibición del crecimiento en más del 95% y con un efecto tóxico leve en la cepa nativa. Asimismo, en parásitos de *L. tropica* MDR, el tratamiento combinado de 150  $\mu$ M de DNM con un cóctel compuesto por 8-(1,1-dimetilalil)-dehidrosilibin (derivado del flavonoide SLB), ELD, zosuquidar y un sesquiterpeno permitió manejar la resistencia a los tres fármacos (J. M. Pérez-Victoria et al., 2006). Esto puede sugerir que el efecto de la SLB varía según la especie y el fármaco empleado en combinación con ella.

En contraposición, en este trabajo, el tratamiento con ELD en los parásitos 40R no ocasionó la reversión del fenotipo resistente y, por el contrario, el tratamiento de 15 días pareció aumentar la resistencia a MTF, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Este

compuesto tampoco mostró sinergia con la MTF en ninguna de las dos cepas. No obstante, se había mostrado que el tratamiento con ELD y 150  $\mu\text{M}$  de DNM “revertía” el fenotipo de MDR probablemente porque este compuesto es inhibidor de las bombas tipo Pgp y de manera general, aunque se han publicado excepciones (J. M. Pérez-Victoria et al., 2006) la resistencia a MTF en *Leishmania* está mayormente relacionada con el ingreso del fármaco más que en su eflujo.

En conjunto, tanto la SLB como el POZ pueden revertir el fenotipo de resistencia a MTF mediante pretratamientos, pero mediante mecanismos distintos. Es probable que la SLB incremente significativamente el estrés oxidativo en cepas que tienen daños en su defensa antioxidante; mientras que el POZ altera la composición lipídica de la membrana, debilitando aún más la integridad estructural en cepas R-MTF. La ausencia de este efecto en cepas nativas refuerza la hipótesis de que estas estrategias son efectivas cuando ya existen alteraciones propias de la resistencia, en este caso, a MTF. Estos hallazgos son importantes porque sugieren la posibilidad de terapias combinadas contra parásitos con resistencias emergentes.

### 3.5 Conclusiones

La SLB se configuró como un agente *reversor* de la resistencia a MTF, pero no como potenciador de la actividad de la MTF. Por otro lado, el POZ se comportó como un potente reversor de la resistencia y de igual manera, potenciador de la actividad de la MTF en cepas 40R. Al tener efecto solo en la cepa 40R, sugiere que la acción de estos compuestos probablemente está relacionada con los mecanismos de resistencia a MTF.

#### 4 Conclusiones generales

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los parásitos de *L. amazonensis* pueden desarrollar un fenotipo de resistencia a la MTF mediante presión selectiva *in vitro*, con características fenotípicas y alteraciones genéticas implicadas en dicha resistencia, que incluyen crecimiento más lento, mayor susceptibilidad a Sb<sup>III</sup> y PMD, y mutaciones en el gen *mt*. Este fenotipo de resistencia a MTF se mantiene al retirar el fármaco de MTF del cultivo durante tres meses y tras la infección en células THP-1, lo que indica una resistencia estable.

No obstante, se identificaron dos alternativas para el manejo terapéutico de la cepa 40R de *L. amazonensis*. Entre los compuestos analizados, la SLB y el POZ exhibieron un comportamiento positivo en la reducción de la resistencia a MTF del 50% y del 70%, respectivamente, y de manera exclusiva para la cepa 40R. Adicionalmente, el POZ presentó un efecto sinérgico con la MTF específica de la cepa 40R, acentuado en la combinación 3:2. Esto sugiere que sus mecanismos *reversores* de la R-MTF y/o potenciadores de la actividad de la MTF, están posiblemente relacionados con los mecanismos de resistencia a la MTF.

Estos hallazgos establecen la posibilidad de emplear combinaciones terapéuticas específicas de cepas resistentes o compuestos modulares de la resistencia, que se configuran como herramientas para el manejo de la resistencia a MTF en *Leishmania*.

En conjunto, estos resultados postulan dos compuestos como *reversores* de la R-MTF y/o potenciadores de la actividad de la MTF en cepas de *L. amazonensis*: la SLB y el POZ.

## 5 Divulgaciones

XXVII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología, XII Congreso de la Sociedad Argentina de Protozoología (FLAP 2024). Buenos Aires, Argentina. Póster: Research of miltefosine drug interactions on miltefosine-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasites.

### Referencias

- Abadi, M. F. S., Moradabadi, A., Vahidi, R., Shojaepour, S., Rostami, S., Rad, I., & Dabiri, S. (2021). High resolution melting analysis and detection of *Leishmania* resistance: The role of multi drug resistance 1 gene. *Genes and Environment*, 43(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s41021-021-00210-5>
- Andrade-Neto, V. V., Cicco, N. N. T., Cunha-Junior, E. F., Canto-Cavalheiro, M. M., Atella, G. C., & Torres-Santos, E. C. (2011). The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Tropica*, 119(2–3), 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.001>
- Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Müller, K. E., Nerland, A. H., & Floeter-Winter, L. M. (2017). RNA-seq transcriptional profiling of *Leishmania amazonensis* reveals an arginase-dependent gene expression regulation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), e0006026. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006026>
- Arruda, D. C., D’Alexandri, F. L., Katzin, A. M., & Uliana, S. R. B. (2005). Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1679–1687. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005>
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Jesus, A. R. de, Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E. M., & Johnson, W. D. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.536>
- Basmacıyan, L., Azas, N., & Casanova, M. (2019). A potential acetyltransferase involved in *Leishmania major* metacaspase-dependent cell death. *Parasites & Vectors*, 12(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3526-4>
- Basselin, M., Badet-Denisot, M.-A., Lawrence, F., & Robert-Gero, M. (1997). Effects of Pentamidine on Polyamine Level and Biosynthesis in Wild-Type, Pentamidine-Treated, and Pentamidine-

- Resistant *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 85(3), 274–282.  
<https://doi.org/10.1006/expr.1996.4131>
- Basselin, M., Lawrence, F., & Robert-Gero, M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochemical Journal*, 315(2), 631–634. <https://doi.org/10.1042/bj3150631>
- Berman, J. D., Gallalee, J. V., & Hansen, B. D. (1987). *Leishmania mexicana*: Uptake of sodium stibogluconate (Pentostam) and pentamidine by parasite and macrophages. *Experimental Parasitology*, 64(1), 127–131. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90018-X)
- Berman, J. D., Holz, G. G., & Beach, D. H. (1984). Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 12(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90039-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90039-2)
- Bharadava, K., Upadhyay, T. K., Kaushal, R. S., Ahmad, I., Alraey, Y., Siddiqui, S., & Saeed, M. (2024). Genomic Insight of *Leishmania* Parasite: In-Depth Review of Drug Resistance Mechanisms and Genetic Mutations. *ACS Omega*, 9(11), 12500–12514. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09400>
- Borst, P., & Sabatini, R. (2008). Base J: Discovery, Biosynthesis, and Possible Functions. *Annual Review of Microbiology*, 62(Volume 62, 2008), 235–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162750>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Bussotti, G., Piel, L., Pescher, P., Domagalska, M. A., Rajan, K. S., Cohen-Chalamish, S., Doniger, T., Hiregange, D.-G., Myler, P. J., Unger, R., Michaeli, S., & Späth, G. F. (2021). Genome instability drives epistatic adaptation in the human pathogen *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(51), e2113744118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113744118>

- Bustos, M. F. G., Barrio, A., Prieto, G. G., Raspi, E. M. de, Cimino, R. O., Cardozo, R. M., Parada, L. A., Yeo, M., Soto, J., Uncos, D. A., Parodi, C., & Basombrío, M. A. (2014). *In Vivo* Antileishmanial Efficacy of Miltefosine Against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Journal of Parasitology*, *100*(6), 840–847. <https://doi.org/10.1645/13-376.1>
- Caballero, A., Pinto, C., Oddone, V., Sanchez, G., Paula, N., Almeida, F., & Roselino, A. (2013). Atypical Tegumentary Leishmaniasis by *L. Infantum (Chagasi)*. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, *46*, 61–68.
- Carnielli, J. B. T., Dave, A., Romano, A., Forrester, S., Faria, P. R. de, Monti-Rocha, R., Costa, C. H. N., Dietze, R., Graham, I. A., & Mottram, J. C. (2022). 3'Nucleotidase/nuclease is required for *Leishmania infantum* clinical isolate susceptibility to miltefosine. *eBioMedicine*, *86*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104378>
- Carnielli, J. B. T., Monti-Rocha, R., Costa, D. L., Molina Sesana, A., Pansini, L. N. N., Segatto, M., Mottram, J. C., Costa, C. H. N., Carvalho, S. F. G., & Dietze, R. (2019). Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *101*(4), 789–794. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0949>
- Castro, M. del M., Cossio, A., Velasco, C., & Osorio, L. (2017). Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(4), e0005515. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005515>
- CDC, C. for D. C. and P. (2024, junio 5). CDC - DPDX—Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- Chiquero, M. J., Pérez-Victoria, J. M., O'Valle, F., González-Ros, J. M., del Moral, R. G., Ferragut, J. A., Castanys, S., & Gamarro, F. (1998). Altered Drug Membrane Permeability in a Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* Line. *Biochemical Pharmacology*, *55*(2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00385-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00385-7)

- Chrusciak-Talhari, A., Dietze, R., Chrusciak Talhari, C., da Silva, R. M., Gadelha Yamashita, E. P., de Oliveira Penna, G., Lima Machado, P. R., & Talhari, S. (2011). Randomized Controlled Clinical Trial to Assess Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 255–260. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0155>
- Coelho, A. C., Boisvert, S., Mukherjee, A., Leprohon, P., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2012). Multiple mutations in teterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001512>
- Coelho, A. C., Messier, N., Ouellette, M., & Cotrim, P. C. (2007). Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3030–3032. <https://doi.org/10.1128/AAC.00404-07>
- Coelho, A. C., Trinconi, C. T., Costa, C. H. N., & Uliana, S. R. B. (2014). *In Vitro* and *In Vivo* Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2999. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002999>
- Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P. M., & Matheron, S. (2012). *Leishmania* Resistance to Miltefosine Associated with Genetic Marker. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 704–706. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110841>
- Correa-Cárdenas, C. A., Pérez, J., Patino, L. H., Ramírez, J. D., Duque, M. C., Romero, Y., Cantillo-Barraza, O., Rodríguez, O., Alvarado, M. T., Cruz, C., & Méndez, C. (2020). Distribution, treatment outcome and genetic diversity of *Leishmania* species in military personnel from Colombia with cutaneous leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 938. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05529-y>

- Cortazzo da Silva, L., Aoki, J. I., & Floeter-Winter, L. M. (2022). Finding Correlations Between mRNA and Protein Levels in *Leishmania* Development: Is There a Discrepancy? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.852902>
- Costa, C. H. N., Chang, K.-P., Costa, D. L., & Cunha, F. V. M. (2023). From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, *12*(7), 969. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969>
- Cournia, Z., Ullmann, G. M., & Smith, J. C. (2007). Differential Effects of Cholesterol, Ergosterol and Lanosterol on a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Membrane: A Molecular Dynamics Simulation Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, *111*(7), 1786–1801. <https://doi.org/10.1021/jp065172i>
- Croft, S., Sundar, S., & Fairlamb, A. (2006). Drug resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev. Clinical microbiology reviews*, *19*, 111–126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- Daga, M., Rohatgi, I., & Mishra, R. (2021). Leishmaniasis. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, *25*, S166–S170. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23844>
- Davidson, R. N., den Boer, M., & Ritmeijer, K. (2009). Paromomycin. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *103*(7), 653–660. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.09.008>
- de Souza, C. S. F., Calabrese, K. S., Abreu-Silva, A. L., Carvalho, L. O. P., Cardoso, F. de O., Dorval, M. E. M. C., Oshiro, E. T., Quaresma, P. F., Gontijo, C. M. F., Pacheco, R. S., Rossi, M. I. D., da Costa, S. C. G., & Zaverucha do Valle, T. (2018). *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: Histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. *Histology and Histopathology*, *33*(7), 705–716. <https://doi.org/10.14670/HH-11-965>
- Debize da Motta, N., Gervazoni Ferreira de Oliveira, L., Soares da Fonseca, M., Domingos Inacio Filho, J., & de Almeida-Amaral, E. E. (2025). *In Vitro* Leishmanicidal Effect of Silibinin:

- Disrupting Redox Balance via Trypanothione Reductase Inhibition. *ACS Omega*, *10*(25), 27262–27271. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c02606>
- del Val Gil, J. M., López Bañeres, M. F., Rebollo López, F. J., Utrillas Martínez, A. C., & Minguillón Serrano, A. (2001). Cáncer de mama y mastectomía. Estado actual. *Cirugía Española*, *69*(1), 56–65. [https://doi.org/10.1016/S0009-739X\(01\)71687-9](https://doi.org/10.1016/S0009-739X(01)71687-9)
- Denton, H., McGREGOR, J. C., & Coombs, G. H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemical Journal*, *381*(Pt 2), 405–412. <https://doi.org/10.1042/BJ20040283>
- Dorlo, T. P. C., Rijal, S., Ostyn, B., de Vries, P. J., Singh, R., Bhattarai, N., Uranw, S., Dujardin, J.-C., Boelaert, M., Beijnen, J. H., & Huitema, A. D. R. (2014). Failure of Miltefosine in Visceral Leishmaniasis Is Associated With Low Drug Exposure. *The Journal of Infectious Diseases*, *210*(1), 146–153. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu039>
- Downing, T., Imamura, H., Decuypere, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., Hilley, J. D., Doncker, S. de, Maes, I., Mottram, J. C., Quail, M. A., Rijal, S., Sanders, M., Schönian, G., Stark, O., Sundar, S., Vanaerschot, M., Hertz-Fowler, C., Dujardin, J.-C., & Berriman, M. (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Research*, *21*(12), 2143–2156. <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>
- Eberhardt, E., Bulté, D., Van Bockstal, L., Van den Kerkhof, M., Cos, P., Delputte, P., Hendrickx, S., Maes, L., & Caljon, G. (2019). Miltefosine enhances the fitness of a non-virulent drug-resistant *Leishmania infantum* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(2), 395–406. <https://doi.org/10.1093/jac/dky450>
- Elamin, M., Al-Olayan, E., Abdel-Gaber, R., & Yehia, R. S. (2021). Anti-proliferative and apoptosis induction activities of curcumin on *Leishmania major*. *Revista Argentina De Microbiología*, *53*(3), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.08.004>

- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/cmr.00067-12>
- Espada, C. R., Albuquerque-Wendt, A., Hornillos, V., Gluenz, E., Coelho, A. C., & Uliana, S. R. B. (2021). Ros3 (Lem3p/CDC50) Gene Dosage Is Implicated in Miltefosine Susceptibility in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Clinical Isolates and in *Leishmania (Leishmania) major*. *ACS Infectious Diseases*, 7(4), 849–858. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00857>
- Feng, M., Jin, Y., Yang, S., Joachim, A. M., Ning, Y., Mori-Quiroz, L. M., Fromm, J., Perera, C., Zhang, K., Werbovetz, K. A., & Wang, M. Z. (2022). Sterol profiling of *Leishmania* parasites using a new HPLC-tandem mass spectrometry-based method and antifungal azoles as chemical probes reveals a key intermediate sterol that supports a branched ergosterol biosynthetic pathway. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 20, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2022.07.003>
- Fernández, O. L., Rosales-Chilama, M., Quintero, N., Travi, B. L., Wetzel, D. M., Gómez, M. A., & Saravia, N. G. (2022). Potency and Preclinical Evidence of Synergy of Oral Azole Drugs and Miltefosine in an *Ex Vivo* Model of *Leishmania (Viannia) panamensis* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(1), e01425-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.01425-21>
- Ferreira, C. dos S., Martins, P. S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., & Frézard, F. (2003). Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 16(3), 441–446. <https://doi.org/10.1023/a:1022823605068>
- Gallis, H. A., Drew, R. H., & Pickard, W. W. (1990). Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(2), 308–329. <https://doi.org/10.1093/clinids/12.2.308>

- García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S., & Gamarro, F. (2012). *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1974. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001974>
- Getachew, F., & Gedamu, L. (2012). *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 183(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.01.005>
- Ghosh, S., Biswas, S., Mukherjee, S., Pal, A., Saxena, A., Sundar, S., Dujardin, J.-C., Das, S., Roy, S., Mukhopadhyay, R., & Mukherjee, B. (2021). A Novel Bioimpedance-Based Detection of Miltefosine Susceptibility Among Clinical *Leishmania donovani* Isolates of the Indian Subcontinent Exhibiting Resistance to Multiple Drugs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768830>
- Gomez Porto, V. B. G., Carvalho, L. B., Buzo, B. F., Litvoc, M. N., Santos, A. C. S., Rocci, R. A., Soares, S. R. C., Zampieri, R. A., Duarte, M. I. S., & Lindoso, J. A. L. (2022). Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 64, e51. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202264051>
- Gosch, C. S., Resende, B. S., Amorim, C. B., Marques, C. P., Pereira, L. I. de A., Pinto, S. A., Uliana, S. R. B., Coelho, A. C., Ribeiro-Dias, F., & Dorta, M. L. (2018). *Case Report: Atypical Cutaneous Leishmaniasis in a Patient with Mixed Leishmania guyanensis and Leishmania amazonensis Infection*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0760>
- Hendrickx, S., Boulet, G., Mondelaers, A., Dujardin, J. C., Rijal, S., Lachaud, L., Cos, P., Delputte, P., & Maes, L. (2014). Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Parasitology Research*, 113(5), 1875–1881. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3835-7>

- Imamura, H., Monsieurs, P., Jara, M., Sanders, M., Maes, I., Vanaerschot, M., Berriman, M., Cotton, J. A., Dujardin, J.-C., & Domagalska, M. A. (2020). Evaluation of whole genome amplification and bioinformatic methods for the characterization of *Leishmania* genomes at a single cell level. *Scientific Reports*, *10*(1), 15043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71882-2>
- INS, I. N. de S. (2023). *Informe de evento 2023 Leishmaniasis*. Instituto Nacional de Salud - Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. <https://doi.org/10.33610/infoeventos.57>
- INS, I. N. de S. (2024). *Informe de evento Leishmaniasis 2024*. Instituto Nacional de Salud - Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. <https://doi.org/10.33610/infoeventos.57>
- Ives, A., Ronet, C., Prevel, F., Ruzzante, G., Fuertes-Marraco, S., Schutz, F., Zangger, H., Revaz-Breton, M., Lye, L.-F., Hickerson, S. M., Beverley, S. M., Acha-Orbea, H., Launois, P., Fasel, N., & Masina, S. (2011). *Leishmania* RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. *Science*, *331*(6018), 775–778. <https://doi.org/10.1126/science.1199326>
- Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2009). Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, *164*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.007>
- Kamran, M., Bhattacharjee, R., Das, S., Mukherjee, S., & Ali, N. (2023). The paradigm of intracellular parasite survival and drug resistance in leishmanial parasite through genome plasticity and epigenetics: Perception and future perspective. *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1001973>
- Kumari, S., Kumar, V., Tiwari, R. K., Ravidas, V., Pandey, K., & Kumar, A. (2022). Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. *Acta Tropica*, *235*, 106661. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106661>

- Laffitte, M.-C. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research*, 5, 2350. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9218.1>
- Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A., & McMaster, W. R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.11.009>
- Leprohon, P., Légaré, D., Raymond, F., Madore, É., Hardiman, G., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2009). Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Research*, 37(5), 1387–1399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1069>
- Li, G.-D. (2023). Drug Resistance in Malaria Parasites: Does “Specific Antidrug Substance” Exist? *Open Access Library Journal*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.4236/oalib.1109691>
- Lira, R., Contreras, L. M., Rita, R. M. S., & Urbina, J. A. (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: Potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 537–546. <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.537>
- Llanes, A., Restrepo, C. M., Vecchio, G. D., Anguizola, F. J., & Lleonart, R. (2015). The genome of *Leishmania panamensis*: Insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus. *Scientific Reports*, 5(1), 8550. <https://doi.org/10.1038/srep08550>
- López, L., Cruz, C., Godoy, G., M. Robledo, S., & D. Vélez, I. (2013). Thermotherapy effective and safer than miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55, 197–204. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000300011>
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., & Opperdoes, F. R. (2000). Ether–lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether–lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular*

- and Biochemical Parasitology*, 111(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00278-4)
- Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P. X., & Robert-Gero, M. (1997). *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, 232(2), 339–348. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3500>
- Machado, P. R. L., Prates, F. V. O., Boaventura, V., Lago, T., Guimarães, L. H., Schriefer, A., Corte, T. W. F., Penna, G., Barral, A., Barral-Netto, M., & Carvalho, E. M. (2021). A Double-blind, Randomized Trial to Evaluate Miltefosine and Topical Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), e2465–e2469. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1337>
- Mandal, G., Sarkar, A., Saha, P., Singh, N., Sundar, S., & Chatterjee, M. (2009). Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 46(1), 86–92.
- Mannaert, A., Downing, T., Imamura, H., & Dujardin, J.-C. (2012). Adaptive mechanisms in pathogens: Universal aneuploidy in *Leishmania*. 28(9). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.06.003>
- Martínez-Rodrigo, A., S. Dias, D., Ribeiro, P. A. F., Roatt, B. M., Mas, A., Carrión, J., Coelho, E. A. F., & Domínguez-Bernal, G. (2019). Immunization with the HisAK70 DNA Vaccine Induces Resistance against *Leishmania Amazonensis* Infection in BALB/c Mice. *Vaccines*, 7(4), 183. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040183>
- Melcon-Fernandez, E., Galli, G., García-Estrada, C., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., & Pérez-Pertejo, Y. (2023). Miltefosine and Nifuratel Combination: A Promising Therapy for the Treatment of *Leishmania donovani* Visceral Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms24021635>

- Mendes, L., Guerra, J. O., Costa, B., Silva, A. S. da, Guerra, M. das G. B., Ortiz, J., Doria, S. S., Silva, G. V. da, de Jesus, D. V., Barral-Netto, M., Penna, G., Carvalho, E. M., & Machado, P. R. L. (2021). Association of miltefosine with granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: A randomized and controlled trial. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, *103*, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.183>
- Mishra, J., & Singh, S. (2013). Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. *Experimental Parasitology*, *135*(2), 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.004>
- Moncada-Diaz, M. J., Rodríguez-Almonacid, C. C., Quiceno-Giraldo, E., Khuong, F. T. H., Muskus, C., & Karamysheva, Z. N. (2024). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Leishmania* spp. *Pathogens*, *13*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens13100835>
- Mondelaers, A., Sanchez-Cañete, M. P., Hendrickx, S., Eberhardt, E., Garcia-Hernandez, R., Lachaud, L., Cotton, J., Sanders, M., Cuypers, B., Imamura, H., Dujardin, J.-C., Delputte, P., Cos, P., Caljon, G., Gamarro, F., Castanys, S., & Maes, L. (2016). Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PLOS ONE*, *11*(4), e0154101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154101>
- MSPS, M. de S. y P. S. (2023). Lineamientos de atención clínica integral para Leishmaniasis en Colombia. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf>
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*.

- Molecular and Biochemical Parasitology*, 145(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.016>
- Mule, S. N., Saad, J. S., Sauter, I. P., Fernandes, L. R., de Oliveira, G. S., Quina, D., Tano, F. T., Brandt-Almeida, D., Padrón, G., Stolf, B. S., Larsen, M. R., Cortez, M., & Palmisano, G. (2024). The protein map of the protozoan parasite *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum* during growth phase transition and temperature stress. *Journal of Proteomics*, 295, 105088.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2024.105088>
- Neira Fuentes, L. (2025). *Eficacia, seguridad y efecto inmunomodulador del tratamiento tópico con miltefosina en ratones con leishmaniasis cutánea resistentes/susceptibles al fármaco* [Universidad Industrial de Santander]. <https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/45162>
- Nunes, D. C. de O. S., Costa, M. S., Bispo-da-Silva, L. B., Ferro, E. A. V., Zóia, M. A. P., Goulart, L. R., Rodrigues, R. S., Rodrigues, V. de M., & Yoneyama, K. A. G. (2022). Mitochondrial dysfunction on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induced by ketoconazole: Insights into drug mode of action. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210157.  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760210157>
- Obonaga, R., Fernández, O. L., Valderrama, L., Rubiano, L. C., Castro, M. del M., Barrera, M. C., Gomez, M. A., & Gore Saravia, N. (2014). Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* Subgenus *Viannia* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 144–152. <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>
- OMS, O. M. de la S. (2023a). *Leishmaniasis GHO*. The Global Health Observatory.  
<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>
- OMS, O. M. de la S. (2023b, enero 12). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

- OPS, O. P. de la S. (2022). *Directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. Segunda edición* (Second). Pan American Health Organization. <https://doi.org/10.37774/9789275325032>
- Ovalle-Bracho, C., Londoño-Barbosa, D., Salgado-Almario, J., & González, C. (2019). Evaluating the spatial distribution of *Leishmania* parasites in Colombia from clinical samples and human isolates (1999 to 2016). *PLOS ONE*, *14*(3), e0214124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214124>
- Pelczar JR, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (1993). *Microbiology* (5th ed.). Tata McGraw-Hill.
- Peña, D. P., & Escobar, P. (2025). La Medicina Tradicional y el reposicionamiento de Fármacos como Estrategias Terapéuticas en Leishmaniasis. *Acta Biológica Colombiana*, *30*(1), Article 1. <https://doi.org/10.15446/abc.v30n1.112313>
- Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M., & Castanys, S. (2003). Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(50), 49965–49971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308352200>
- Pérez-Victoria, J. M., Bavchvarov, B. I., Torrecillas, I. R., Martínez-García, M., López-Martín, C., Campillo, M., Castanys, S., & Gamarro, F. (2011). Sitamaquine Overcomes ABC-Mediated Resistance to Miltefosine and Antimony in *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(8), 3838–3844. <https://doi.org/10.1128/AAC.00065-11>
- Pérez-Victoria, J. M., Chiquero, M. J., Conseil, G., Dayan, G., Di Pietro, A., Barron, D., Castanys, S., & Gamarro, F. (1999). Correlation between the Affinity of Flavonoids Binding to the Cytosolic Site of *Leishmania tropica* Multidrug Transporter and Their Efficiency To Revert Parasite Resistance to Daunomycin. *Biochemistry*, *38*(6), 1736–1743. <https://doi.org/10.1021/bi982455v>
- Pérez-Victoria, J. M., Cortés-Selva, F., Parodi-Talice, A., Bavchvarov, B. I., Pérez-Victoria, F. J., Muñoz-Martínez, F., Maitrejean, M., Costi, M. P., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S., &

- Gamarro, F. (2006). Combination of Suboptimal Doses of Inhibitors Targeting Different Domains of LtrMDR1 Efficiently Overcomes Resistance of *Leishmania* spp. To Miltefosine by Inhibiting Drug Efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(9), 3102–3110. <https://doi.org/10.1128/AAC.00423-06>
- Pérez-Victoria, J. M., Pérez-Victoria, F. J., Conseil, G., Maitrejean, M., Comte, G., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S., & Gamarro, F. (2001). High-Affinity Binding of Silybin Derivatives to the Nucleotide-Binding Domain of a *Leishmania tropica* P-Glycoprotein-Like Transporter and Chemosensitization of a Multidrug-Resistant Parasite to Daunomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(2), 439–446. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.439-446.2001>
- Pérez-Victoria, J. M., Pérez-Victoria, F. J., Parodi-Talice, A., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Castanys, S., & Gamarro, F. (2001). Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(9), 2468. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2468-2474.2001>
- Pinheiro, L. S., Andrade-Neto, V. V., Mantuano-Barradas, M., Pereira, E. C., Barbosa, R. C. F., de Oliveira, M. C. C., Menna-Barreto, R. F. S., Cunha-Júnior, E. F., & Torres-Santos, E. C. (2023). Biological effects of trans, trans-farnesol in *Leishmania amazonensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1221246>
- Pinto-Martinez, A. K., Rodriguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernandez-Rodriguez, V., & Benaim, G. (2017). Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(1), 10.1128/aac.01614-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01614-17>
- Ponce, C., Ponce, E., Cruz, A., Kreutzer, R., Pratt, D. M., & Neva, F. (1991). *Leishmania donovani chagasi*: New clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *The Lancet*, *337*(8733), 67–70. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90734-7](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90734-7)

- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Posada-López, L., Velez-Mira, A., Cantillo, O., Castillo-Castañeda, A., Ramírez, J. D., Galati, E. A. B., & Galvis-Ovallos, F. (2023). Ecological interactions of sand flies, hosts, and *Leishmania panamensis* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *17*(5), e0011316. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011316>
- Purkait, B., Singh, R., Wasnik, K., Das, S., Kumar, A., Paine, M., Dikhit, M., Singh, D., Sardar, A. H., Ghosh, A. K., & Das, P. (2015). Up-regulation of silent information regulator 2 (Sir2) is associated with amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(5), 1343–1356. <https://doi.org/10.1093/jac/dku534>
- Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M., & Loiseau, P. M. (2005). Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(7), 2677–2686. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2677-2686.2005>
- Rebello, K. M., Andrade-Neto, V. V., Gomes, C. R. B., de Souza, M. V. N., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., Torres-Santos, E. C., & d'Avila-Levy, C. M. (2019). Miltefosine-Lopinavir Combination Therapy Against *Leishmania infantum* Infection: *In vitro* and *in vivo* Approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00229>
- Rubiano, L. C., Miranda, M. C., Muvdi Arenas, S., Montero, L. M., Rodríguez-Barraquer, I., Garcerant, D., Prager, M., Osorio, L., Rojas, M. X., Pérez, M., Nicholls, R. S., & Gore Saravia, N. (2012). Noninferiority of Miltefosine Versus Meglumine Antimoniate for

- Cutaneous Leishmaniasis in Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(4), 684–692.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jir816>
- Saberi, R., Fakhar, M., Hajjarian, H., Abbaszadeh Afshar, M. J., Mohebali, M., Hezarjaribi, H. Z., Moghadam, Y., & Sharbatkhori, M. (2022). *Leishmania* RNA virus 2 (LRV2) exacerbates dermal lesions caused by *Leishmania major* and comparatively unresponsive to meglumine antimoniate treatment. *Experimental Parasitology*, 241, 108340.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108340>
- Saboia-Vahia, L., Cuervo, P., Wiśniewski, J. R., Dias-Lopes, G., Pinho, N., Padrón, G., de Pilla Varotti, F., & Murta, S. M. F. (2022). In-Depth Quantitative Proteomics Characterization of *In Vitro* Selected Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum*. *Proteomes*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/proteomes10020010>
- Salazar-Villamizar, M. E., & Escobar, P. (2022). *In vitro* selection of ketoconazole-pentamidine-resistant *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Experimental Parasitology*, 233, 108206.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108206>
- Salgado-Almario, J., Hernández, C. A., & Ovalle, C. E. (2019). Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. *Biomédica*, 39(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312>
- Sampaio, R. N. R., Silva, J. S. F. e, Paula, C. D. R. de, Porto, C., Motta, J. de O. C. da, Pereira, L. I. de A., Martins, S. S., Barroso, D. H., Freire, G. S. M., & Gomes, C. M. (2019). A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52, e20180292. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0292-2018>
- Sánchez-Cañete, M. P., Carvalho, L., Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., & Castanys, S. (2009). Low Plasma Membrane Expression of the Miltefosine Transport Complex Renders *Leishmania braziliensis* Refractory to the Drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1305–1313. <https://doi.org/10.1128/aac.01694-08>

- Sandoval-Ramírez, C. M., Hernández, C., Teherán, A. A., Gutierrez-Marin, R., Martínez-Vega, R. A., Morales, D., Hoyos-Lopez, R., Araque-Mogollón, A., & Ramírez, J. D. (2020). Complex ecological interactions across a focus of cutaneous leishmaniasis in Eastern Colombia: Novel description of *Leishmania* species, hosts and phlebotomine fauna. *Royal Society Open Science*, 7(7), 200266. <https://doi.org/10.1098/rsos.200266>
- Santi, A. M. M., & Murta, S. M. F. (2022). Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of *Leishmania* spp. In Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.826287>
- Seifert, K., & Croft, S. L. (2006). *In Vitro* and *In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 73–79. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.73-79.2006>
- Seifert, K., Matu, S., Javier Pérez-Victoria, F., Castanys, S., Gamarro, F., & Croft, S. L. (2003). Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(4), 380–387. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00125-0)
- Seifert, K., Pérez-Victoria, F. J., Stettler, M., Sánchez-Cañete, M. P., Castanys, S., Gamarro, F., & Croft, S. L. (2007). Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(3), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.007>
- Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martinez, J. C., Mendoza-León, A., & Benaim, G. (2009). Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5108–5113. <https://doi.org/10.1128/AAC.00505-09>

- Shadab, M., Jha, B., Asad, M., Deepthi, M., Kamran, M., & Ali, N. (2017). Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with Kalsome<sup>TM</sup>10, a new liposomal amphotericin B. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171306>
- Sharma, H., Sehgal, R., Shekhar, N., Shoeran, G., Kaur, U., & Medhi, B. (2023). Antiparasitic effect of Farnesol against *Leishmania major*: A rationale from *in vitro* and *in silico* investigations. *PLOS ONE*, *18*(11), e0293290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293290>
- Shaw, C. D., Lonchamp, J., Downing, T., Imamura, H., Freeman, T. M., Cotton, J. A., Sanders, M., Blackburn, G., Dujardin, J. C., Rijal, S., Khanal, B., Illingworth, C. J. R., Coombs, G. H., & Carter, K. C. (2016a). In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: Genomic and metabolomic characterization. *Molecular Microbiology*, *99*(6), 1134–1148. <https://doi.org/10.1111/mmi.13291>
- Shaw, C. D., Lonchamp, J., Downing, T., Imamura, H., Freeman, T. M., Cotton, J. A., Sanders, M., Blackburn, G., Dujardin, J. C., Rijal, S., Khanal, B., Illingworth, C. J. R., Coombs, G. H., & Carter, K. C. (2016b). *In vitro* selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: Genomic and metabolomic characterization. *Molecular Microbiology*, *99*(6), 1134–1148. <https://doi.org/10.1111/mmi.13291>
- Sheikh, S., Amir, A., Amir, B., & Amir, A. (2020). *Leishmaniasis*. *Parasitology and Microbiology Research*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90680>
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J., & Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(9), 1266–1272. <https://doi.org/10.1086/383321>
- Soto, J., Rea, J., Valderrama, M., Toledo, J., Valda, L., Ardiles, J., & Berman, J. (2009). Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *81*(3), 387–389.

- Soto, J., Toledo, J., Gutierrez, P., Nicholls, R. S., Padilla, J., Engel, J., Fischer, C., Voss, A., & Berman, J. (2001). Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. *Clinical Infectious Diseases*, *33*(7), e57–e61. <https://doi.org/10.1086/322689>
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gómez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J., & Berman, J. (2007). Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, *44*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1086/510588>
- Sousa, M. C., Varandas, R., Santos, R. C., Santos-Rosa, M., Alves, V., & Salvador, J. A. R. (2014). Antileishmanial Activity of Semisynthetic Lupane Triterpenoids Betulin and Betulinic Acid Derivatives: Synergistic Effects with Miltefosine. *PLOS ONE*, *9*(3), e89939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089939>
- Spangler, E., Moreira, A., Anacleto, C., & Petrillo-Peixoto, M. L. (1998). Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: Use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitology Research*, *84*(9), 720–726. <https://doi.org/10.1007/s004360050476>
- Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., & Singh, S. (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2008). Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *17*(5), 787–794. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.5.787>
- Turner, K. G., Vacchina, P., Robles-Murguía, M., Wadsworth, M., McDowell, M. A., & Morales, M. A. (2015). Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine-Resistant *Leishmania major*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(7), e0003948. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003948>
- Ubeda, J.-M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2014). Genome-Wide

- Stochastic Adaptive DNA Amplification at Direct and Inverted DNA Repeats in the Parasite *Leishmania*. *PLOS Biology*, 12(5), e1001868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001868>
- Vacchina, P., Norris-Mullins, B., Abengózar, M. A., Viamontes, C. G., Sarro, J., Stephens, M. T., Pfrender, M. E., Rivas, L., & Morales, M. A. (2016). Genomic Appraisal of the Multifactorial Basis for *In Vitro* Acquisition of Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4089–4100. <https://doi.org/10.1128/aac.00478-16>
- Valdivia, H. O., Roatt, B. M., Baptista, R. de P., Ottino, J., Coqueiro-dos-Santos, A., Sanders, M. J., Reis, A. B., Cotton, J. A., & Bartholomeu, D. C. (2022). Replacement of *Leishmania (Leishmania) infantum* Populations in an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.900084>
- Valiathan, R., Dubey, M. L., Mahajan, R. C., & Malla, N. (2006). *Leishmania donovani*: Effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Experimental Parasitology*, 114(2), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.02.015>
- Van Bockstal, L., Bulté, D., Hendrickx, S., Sadlova, J., Volf, P., Maes, L., & Caljon, G. (2020). Impact of clinically acquired miltefosine resistance by *Leishmania infantum* on mouse and sand fly infection. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 13, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.04.004>
- Van Bockstal, L., Sádlová, J., Suau, H. A., Hendrickx, S., Meneses, C., Kamhawi, S., Volf, P., Maes, L., & Caljon, G. (2019). Impaired development of a miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strain in the sand fly vectors *Phlebotomus perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.09.003>

- Vanaerschot, M., Huijben, S., Van den Broeck, F., & Dujardin, J.-C. (2014). Drug resistance in vectorborne parasites: Multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(1), 41–55. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12032>
- Vélez, I. D., Colmenares, L. M., & Muñoz, C. A. (2009). Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 51(4), 231–236. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652009000400011>
- Vélez, I., López, L., Sánchez, X., Mestra, L., Rojas, C., & Rodríguez, E. (2010). *Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0060>
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., & Ouellette, M. (2007). A Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in *Leishmania donovani* Clinical Field Isolates by Modulating Drug-induced Programmed Cell Death \*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(1), 88–101. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600319-MCP200>
- Verma, N. K., Singh, G., & Dey, C. S. (2007). Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Experimental Parasitology*, 116(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.10.007>
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S., & Saha, B. (2009). Miltefosine Promotes IFN- $\gamma$ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response1. *The Journal of Immunology*, 182(11), 7146–7154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803859>
- Ware, J. M., O'Connell, E. M., Brown, T., Wetzler, L., Talaat, K. R., Nutman, T. B., & Nash, T. E. (2021). Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), e2457–e2562. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1238>

- Wyllie, S., Cunningham, M. L., & Fairlamb, A. H. (2004). Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39925–39932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405635200>
- Xu, W., Hsu, F.-F., Baykal, E., Huang, J., & Zhang, K. (2014). Sterol Biosynthesis Is Required for Heat Resistance but Not Extracellular Survival in *Leishmania*. *PLOS Pathogens*, 10(10), e1004427. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004427>