

Eficacia, seguridad y efecto inmunomodulador del tratamiento tópico con miltefosina en ratones
con leishmaniasis cutánea resistentes/susceptibles al fármaco

Laura Fernanda Neira Fuentes

Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Director

Patricia Escobar

Doctora en Inmuno Parasitología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A mis hijas, Camila y Catalina:

Con infinito amor y orgullo, dedico esta tesis a ustedes para que, cada día, recuerden lo maravilloso que es ser mujeres y confíen siempre en su inmenso potencial. Que su fuerza, valentía y pasión por la vida sean el impulso que las lleve a alcanzar todo lo que sueñan. Nunca duden de sus capacidades ni de la luz que irradian. Su pasión y constancia son mi inspiración diaria y mi mayor orgullo.

¡Sigán iluminando con su luz y abriendo camino para las que vendrán!

Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia - MINCIENCIAS, por el apoyo económico brindado a través del Programa “Doctorados Nacionales Convocatoria 757 de 2016”, sin el cual hubiese sido imposible la dedicación completa y exclusiva a este estudio doctoral.

A la Universidad Industrial de Santander y al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP que me acogieron, por proporcionar los recursos e infraestructura necesarios para el desarrollo de este trabajo; su orientación y apoyo académico fueron piezas clave en cada etapa de mi formación doctoral.

A mi directora de tesis, por su guía, dedicación y paciencia al brindarme las herramientas teóricas y metodológicas que dieron forma a este proyecto. Su acompañamiento y asesoría constante me permitieron crecer tanto profesional como personalmente.

A mi familia, por creer en mí incondicionalmente y brindarme su apoyo moral y afectivo. Su confianza en mis capacidades y su aliento constante han sido el motor que impulsó mi dedicación diaria.

A mis amigos de la vida y compañeros de posgrado, quienes me inspiraron a perseverar y me acompañaron en momentos de duda y de logro. Su compañía y colaboración hicieron de este proceso académico una experiencia más llevadera y enriquecedora.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de esta tesis. Sus palabras de aliento, su apoyo técnico y su ejemplo de trabajo constante me motivaron a lo largo de este camino.

Tabla de Contenido

Introducción	24
1. Caracterización fisicoquímica, estructural y funcional de un hidrogel de miltefosina para el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea	30
1.1 Tratamientos tópicos: uso tópico de MTF, hidrogeles, potenciadores de la permeación	30
1.1.1 Estrategias terapéuticas en LC	30
1.1.2 Los tratamientos localizados en LC-NM	32
1.1.3 La MTF como una opción de tratamiento tópico en LC.....	36
1.1.4 Tratamientos dérmicos/transdérmicos	39
1.2 Metodología	50
1.2.1 Materiales.....	51
1.2.2 Parásitos	52
1.2.3 Ratones y consideraciones éticas	52
1.2.4 Preparación de hidrogeles de carbopol	52
1.2.5 Caracterización fisicoquímica.....	53
1.2.6 Caracterización estructural.....	55
1.2.7 Caracterización funcional	56
1.2.8 Estabilidad de los hidrogeles a diferentes temperaturas	59
1.2.9 Análisis de resultados	59
1.3 Resultados	60

1.3.1	Caracterización fisicoquímica, comportamiento reológico y estabilidad de los hidrogeles	60
1.3.2	Caracterización estructural: análisis de la morfología y estabilidad de hidrogeles a través de SEM.....	63
1.3.3	Caracterización de micelas de MTF en medios acuosos y su interacción con DMSO y el carbopol: análisis de tamaño, PDI y potencial zeta	67
1.3.4	Evaluación de hidrogeles de Carbopol 940 como sistemas de liberación de fármacos.	68
1.3.5	MTF como potenciador de la permeación	69
1.3.6	Actividad antileishmania	71
1.3.7	Evaluación de la seguridad cutánea (irritación) de hidrogeles	74
1.4	Discusión.....	75
1.5	Conclusiones	83
2.	Efectividad de la miltefosina al ser aplicada tópicamente en un modelo murino de LC infectado con una especie del Nuevo Mundo	99
2.1	Leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo (LC-NM): generalidades.....	99
2.1.1	Uso de ratones BALB/c en el estudio de la LC-NM	104
2.1.2	La MTF como alternativa terapéutica de la LC-NM	106
2.1.3	Relaciones fármaco: actividad dosis-respuesta.....	108
2.2	Metodología	112
2.2.1	Estandarización del modelo experimental	113
2.2.2	Efecto de diferentes dosis de MTF en el tamaño de las lesiones y en la carga parasitaria	120

2.2.3	Análisis dosis-respuesta de la MTF	124
2.2.4	Eficacia estética y parasitológica	125
2.2.5	Análisis de resultados	125
2.3	Resultados	126
2.3.1	Estandarización del modelo murino de LC.....	126
2.3.2	Efecto de las diferentes dosis de MTF en la reducción de las lesiones y parásitos	135
2.4	Discusión.....	149
2.5	Conclusiones	157
3.	Aspectos inmunológicos, histopatológicos, ultraestructurales e de la leishmaniasis cutánea: evaluación antes, durante y después del tratamiento tópico de miltefosina fMTF.....	176
3.1	Generalidades: respuesta inmune (RI) en LC	176
3.1.1	Heterogeneidad de la LC	181
3.1.2	Patrones histopatológicos de la LC.....	186
3.1.3	Ultraestructura del parásito y de la lesión de LC.....	189
3.1.4	Mecanismo de acción de la MTF: efecto directo y efecto inmunomodulador	192
3.2	Metodología	196
3.2.1	Formulación de miltefosina (fMTF)	197
3.2.2	Grupos experimentales y tratamiento	198
3.2.3	Determinación del tamaño de lesión y la carga parasitaria.....	199
3.2.4	Análisis histopatológico.....	199
3.2.5	Análisis ultraestructural de las biopsias	200
3.2.6	Cuantificación de proteínas y citoquinas	201
3.2.7	Análisis de resultados	203

3.3	Resultados	204
3.3.1	Efecto del tratamiento en la reducción de las lesiones y carga parasitaria en cada tiempo estudiado	204
3.3.2	Características histopatológicas de las biopsias de lesiones antes durante y después del tratamiento tópico con fMTF 0.5%	206
3.3.3	Análisis ultraestructural	213
3.3.4	Cuantificación de citoquinas en los tejidos.....	215
3.4	Discusión.....	216
3.5	Conclusiones.....	223
4.	Resistencia a la miltefosina en <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> : caracterización biológica y molecular en modelos experimentales	246
4.1	Generalidades de resistencia a fármacos (RF) en <i>Leishmania</i>	246
4.1.1	Biomarcadores moleculares de resistencia a fármacos.....	251
4.1.2	Resistencia a la MTF (R-MTF).....	257
4.2	Metodología	261
4.2.1	Medicamentos	263
4.2.2	Parásitos y células	263
4.2.3	Generación de cepas resistentes.....	263
4.2.4	Susceptibilidad/resistencia a la MTF	264
4.2.5	Resistencia cruzada.....	265
4.2.6	Estabilidad de la resistencia.	265
4.2.7	Infectividad <i>in vitro</i>	265
4.2.8	Infectividad <i>in vivo</i>	265

4.2.9	Resistencia de aislados de ratones con LC.	266
4.2.10	Generación de ROS.....	266
4.2.11	Transcripción de marcadores de resistencia por PCR de transcripción inversa (RT-qPCR)	267
4.2.12	Cuantificación y tinción de cuerpos lipídicos	269
4.2.13	Análisis de resultados	270
4.3	Resultados	271
4.3.1	Generación de cepas R-MTF	271
4.3.2	Susceptibilidad de las cepas R-MTF.....	272
4.1.1	Resistencia cruzada.....	277
4.3.3	Estabilidad de la resistencia	277
4.3.4	Infección en células THP-1.....	278
4.3.5	Infección en ratones BALB/c.....	279
4.3.6	Generación de ROS.....	281
4.3.7	Expresión de marcadores de resistencia	282
4.3.8	Cuantificación de cuerpos lipídicos (DL)	284
4.4	Discusión.....	288
4.5	Conclusiones	296
5.	Conclusiones Generales	315
6.	Divulgaciones	319

Lista de Tablas

Tabla 1 Hidrogeles de uso tópico y su aplicación terapéutica	45
Tabla 2 Composición hidrogeles utilizados	53
Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas/organolépticas y parámetros reológicos de los hidrogeles investigados.....	61
Tabla 4 Actividad antileishmania de 0,5%MTF- y MTF en solución (PBS) en promastigotes de <i>L. amazonensis</i> almacenada en diferentes tiempos y temperaturas	72
Tabla 5 Clasificación taxonómica de parásitos de Leishmania, clasificación subgénero, distribución y sus manifestaciones clínicas en la LC-NM.....	99
Tabla 6 Secuencias de primers utilizados en la técnica de PCR para la amplificación de ADN de <i>Leishmania spp</i>	118
Tabla 7 Grupos experimentales utilizados en el capítulo 2.	122
Tabla 8 Coeficiente de variación (CV) de las réplicas intra-ensayo e inter-ensayos.....	132
Tabla 9 Formulaciones tópicas utilizadas en el tratamiento de la LC.	135
Tabla 10 Eficacia del tratamiento tópico con diferentes concentraciones de MTF en la reducción de lesiones de LC.	138
Tabla 11 Evaluación de la eficacia del tratamiento tópico con diferentes concentraciones de MTF.	146
Tabla 12 Grupos experimentales y tamaño de muestra (n).....	198
Tabla 13 Características e intensidad de las variables histopatológicas estudiadas en lesiones de ratones con LC tratados vía tópica con fMTF.	207

Tabla 14 Características e intensidad de las variables histopatológicas estudiadas en lesiones de ratones con LC tratados vía tópica con el vehículo (sin MTF).....	208
Tabla 15 Biomarcadores moleculares y su impacto en la resistencia a fármacos en <i>Leishmania</i>	253
Tabla 16 primers utilizados.....	268

Lista de Figuras

Figura 1 Características fisicoquímicas de la MTF	37
Figura 2 Estructura de la piel	39
Figura 3 Representación esquemática de las vías de administración tópica de fármacos	41
Figura 4 Mecanismo de espesamiento del carbopol	47
Figura 5 Estructuras químicas de PPP utilizados en formulaciones biomédicas	49
Figura 6 Diseño experimental realizado en el presente capítulo 1	51
Figura 7 Perfil de viscosidad de hidrogeles	62
Figura 8 Microscopia electrónica de barrido	65
Figura 9 Espectrometría de energía de dispersión de rayos X (EDS).....	66
Figura 10 Curvas DLS de MTF soluciones (agua tipo I y DMSO).	67
Figura 11 Perfiles de liberación y flujo de cafeína de hidrogeles de diferentes concentraciones de Carbopol 940.....	68
Figura 12 Permeación de cafeína a través de la piel de ratón a las 24 h vehiculizada en 0,5 MTF-, 10% DMSO- y 1% carbopol-.....	70
Figura 13 Irritación en ratones BALB/c.	74
Figura 14 Ciclo de vida del parásito	103
Figura 15 Curva sigmoideal dosis-respuesta de fármacos.....	110
Figura 16 Diseño metodológico del capítulo 2.....	114
Figura 17 Identificación cepas de parásitos por el método PCR- RFLP.	127
Figura 18 Evolución de las lesiones producidas en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i>	128
Figura 19 Modelo de LC en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i>	129

Figura 20 Evaluación de los primers en la amplificación del gen 18S del ADNr de <i>Leishmania</i>	131
Figura 21 Curva estándar para la cuantificación de carga parasitaria por qPCR.....	134
Figura 22 Evolución del tamaño de las lesiones en ratones infectados con <i>L. amazonensis</i>	140
Figura 23 Evaluación de las lesiones, improntas y biopsias en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i>	141
Figura 24 Evaluación de la carga parasitaria post tratamiento	144
Figura 25 Curva dosis-respuesta del tratamiento tópico con MTF.....	147
Figura 26 Análisis de la eficacia de la MTF tópica en ratones BALB/c con LC-NM durante y post tratamiento (p.t.).....	148
Figura 27 Interacciones entre <i>Leishmania</i> y células inmunitarias innatas del huésped mamífero	179
Figura 28 Espectro de la LC causadas por <i>L. braziliensis</i> y <i>L. amazonensis</i>	183
Figura 29 Regulación inmune de macrófagos que contribuyen al espectro de manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea humana.	186
Figura 30 Mecanismo de acción e inmunomodulatorio de la MTF.....	195
Figura 31 Diseño experimental utilizado en este capítulo	197
Figura 32 Evaluación (Dosis 0: D0, Dosis12: D12, Dosis 25: D25 y 60 días p.t.) tratamiento con fMTF 0,5%.....	205
Figura 33 Mapa de calor cambios histopatológicos.....	211
Figura 34 Hallazgos histopatológicos en lesiones de LC producida por <i>L. amazonensis</i> y tratamiento con fMTF	212

Figura 35 Alteraciones ultraestructurales de tejidos infectados con <i>L. amazonensis</i> tratados tópicamente con fMTF 0,5%.	214
Figura 36 Regulación de citoquinas en lesiones de leishmaniasis cutánea (LC) causadas por <i>L. amazonensis</i> en ratones BALB/c.	215
Figura 37 Monitoreo de citoquinas liberadas después del tratamiento tópico con fMTF al 0.5% y vehículo en diferentes intervalos de tiempo.....	218
Figura 38 Mecanismos de resistencia e investigación de nuevos fármacos en <i>Leishmania</i>	248
Figura 39 Mecanismos de acción y resistencia a la MTF.....	260
Figura 40 Diseño experimental empleado en el presente capítulo 4	262
Figura 41 Generación de cepas resistentes a la MTF.	272
Figura 42 Ensayos de susceptibilidad a la MTF in vitro.	276
Figura 43 Potencia (CI50) de pentamidina (PMD), anfotericina B (AmB), ketoconazol (KTZ) en promastigotes de la cepa WT y la 40-R.	277
Figura 44 Infectividad de los parásitos WT y R-40 en células THP-1.	279
Figura 45 Evolución de las lesiones producidas en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i> cepa WT y cepa 40-R.....	280
Figura 46 Producción de radicales ROS en cepas de <i>L. amazonensis</i> WT y resistentes a MTF	281
Figura 47 Niveles de transcripción de los genes <i>fosoda</i> , <i>ros3</i> , <i>mt</i> , <i>txn</i> , <i>spt</i> , <i>lkd</i> y <i>tryp</i>	283
Figura 48 Cuantificación de DL en <i>L. amazonensis</i> parásitos WT y resistentes 40R.	285
Figura 49 LD en <i>L. amazonensis</i> línea 1 y 2, parásitos WT y 40R a través de fluorescencia corporal	287

Listado de abreviaturas y símbolos**A**

ABC: transportadores de unión a ATP

ADN: ácido desoxirribonucleico

AE, AL, ATL: buffers utilizados en la extracción de ADN

ANOVA: análisis de varianza

AQP1: aquagliceroporina

B

BCA: ácido bicinconínico

BODIPY™: sonda fluorescente para cuerpos lipídicos

BSED: back scattered electron detector (detector de electrones retrodispersados)

BsuRI (HaeIII): enzima de restricción

C

CA: consistencia aparente

Carbopol®940: polímero de ácido poliacrílico utilizado en hidrogeles

CEINCI: comité de ética de la UIS

CI₅₀: concentración inhibitoria 50%

CI₉₀: concentración inhibitoria 90%

Ct: ciclo umbral

CV: coeficiente de variación

D

DCF: diclorofluoresceína

DL: cuerpos lipídicos (droplet lipids)

DLS: dispersión de luz dinámica

DMSO: dimetilsulfóxido

Dnapoli: ADN polimerasa I

DNAzol™: reactivo comercial para extracción de ADN

DNeasy®: kit comercial para extracción de ADN

dNTP: desoxirribonucleótidos

DTH: hipersensibilidad de tipo retardado

E

EDX: espectroscopia de rayos X de dispersión de energía

EE: error estándar

ETD: everhart thornley detector (detector Everhart Thornley)

F

FACS: citometría de flujo

FCS: suero bovino fetal

FDA: Food and Drug Administration

FEG: field emission gun (emisor de campo)

FeSOD-A: superóxido dismutasa de hierro-A

fMTF: formulación de miltefosina

FP: bolsillo flagelar

FT: fracaso terapéutico

FT1: transportador de folato 1

G

Giemsa: tinción para microscopía

GSH: glutatión

H

H2DCFDA: diacetato de diclorofluoresceína

H-E: hematoxilina y eosina

HSP70: proteínas de choque térmico 70

I

ICRi: índice de regulación de citoquinas de infección

ICRt: índice de regulación de citoquinas de tratamiento

IC50: concentración inhibitoria 50

IFN γ : interferón gamma

IL: intralesional

IL-10: interleucina 10

IL-4: interleucina 4

IM: intramuscular

IMQ: imiquimod

INF γ : interferón gamma

IR: índice de resistencia

ITS1: espaciador transcrito interno 1

J

Jss: flujo estacionario

K

KMP-11: proteína de membrana kinetoplástida

KTZ: ketoconazol

L

LACK1: quinasa C activada por Leishmania

L-AmB: anfotericina B liposomal

LC: leishmaniasis cutánea

LCD: leishmaniasis cutánea diseminada

LCDA: leishmaniasis cutánea difusa anérgica

LCL: leishmaniasis cutánea localizada

LC-NM: leishmaniasis cutánea del nuevo mundo

LdMT: transportador de MTF de *L. donovani*

LdROS3: subunidad del transportador LdMT

LE: laboratorio de espectroscopía

Lkd: proteína quinasa de cuerpos lipídicos

LM: leishmaniasis mucosa

LRRs: repeticiones ricas en leucina

M

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MDR: transportador de resistencia a múltiples fármacos

ME: microscopía electrónica

MTF: miltefosina

MT: transportador de miltefosina

N

NET: trampas extracelulares de neutrófilos

NK: células asesinas naturales

Ns: no significativo

O

OECD: organización para la cooperación y el desarrollo económicos

P

p.i: post infección

p.t: post tratamiento

P299: proteína 299

PAF: factor activador de plaquetas

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PAR: paromomicina

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP: reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

PDI: índice de polidispersión

PE: fosfatidiletanolamina

PKDL: leishmaniasis dérmica post-kala-azar

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

PMC: sulfato de paromomicina

PMD: isetionato de pentamidina

PMN: polimorfonucleares

PPP: potenciador de la permeación percutánea

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PTP: fosfatasa de proteína tirosina

PTR1: reductasa de pteridina 1

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

R

RI: respuesta inmune

RF: resistencia a fármacos

RID: respuesta inmune dominante

R-MTF: línea resistente de *L. amazonensis* a miltefosina

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

SAOTs: small amplitude oscillation tests

SBF: suero bovino fetal

SbIII: antimonio trivalente

SbV: antimoniales pentavalentes

SC: estrato córneo

SEM: microscopía electrónica de barrido

SKCRP14.1: proteína calpaína pequeña kinetoplástica relacionada

SLF: sistemas de liberación de fármacos

SNP: polimorfismo de nucleótido único

Spt: serina C-palmitoiltransferasa

SSD: solid state detector (detector de estado sólido)

SYBR® Green: tinte fluorescente para Qpcr

T

T[SH]₂: tioles

TBE: tris-borato-EDTA

TBP: proteína de unión a TATA

TDR1: reductasa dependiente de tiones I

TEA: trietanolamina

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TGFβ: factor de crecimiento transformante beta

Th1/Th2: células T helper 1 y 2

THP-1: línea celular humana monocítica

TNFα: factor de necrosis tumoral alfa

TRITRYDB: base de datos de genomas de tripanosomátidos

TRizol: reactivo para extracción de ARN

TryR: tripanotion reductasa

TXNPx: peroxidasa de triparedoxina

U

UEA: unidad experimental en animales

UV: ultravioleta

V

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

W

WT: cepa tipo salvaje (wild-type)

Lista de unidades

% p/v: porcentaje peso/volumen

°C: grados Celsius

cps: centipoise (unidad de viscosidad)

g/mol: gramos por mol (unidad de peso molecular)

G*: módulo complejo o dinámico

G': módulo elástico o de almacenamiento

G'': módulo viscoso o de pérdida

Hz: hertz (unidad de frecuencia)

kPa: kilopascal (unidad de presión)

LogP: logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua

mg/kg: miligramos por kilogramo

mg/mL: miligramos por mililitro

mM: milimolar (concentración molar)

mV: milivoltios

nm: nanómetros

R²: coeficiente de correlación

Tc: límite de esfuerzo

UA: unidades arbitrarias

µg/cm²/h: microgramos por centímetro cuadrado por hora (flujo)

Resumen

Título: Eficacia, seguridad y efecto inmunomodulador del tratamiento tópico con miltefosina en ratones con leishmaniasis cutánea resistentes/susceptibles al fármaco.¹

Autor: Laura Fernanda Neira Fuentes ²

Palabras Clave: Dosis-respuesta, Histopatología, Inmunomodulación, Leishmaniasis cutánea, Miltefosina, Resistencia, Toxicidad, Tratamiento tópico.

Introducción: La leishmaniasis cutánea (LC) en América Latina representa un problema de salud pública debido a la heterogeneidad de la enfermedad, los riesgos de diseminación y los inconvenientes de los pocos tratamientos existentes. La reformulación de la miltefosina (MTF), utilizada en cápsulas orales a formulaciones tópicas constituye una opción a corto plazo. **Objetivo:** diseñar una formulación conteniendo MTF para uso tópico y evaluar su eficacia, seguridad y el efecto inmunomodulatorio. Complementariamente, se generaron y caracterizaron cepas resistentes al fármaco. **Metodología:** se prepararon hidrogeles de MTF(p/v%) y se determinaron sus propiedades fisicoquímicas, estructurales, reológicas y funcionales evaluando color, consistencia, pH, viscosidad, porosidad, tamaño de partículas, capacidad de liberación de compuestos. La actividad antileishmania se evaluó *in vitro* y en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*. Se determinó la citotoxicidad e irritación/corrosión en piel de ratón. El efecto inmunomodulador se evaluó *in situ* determinando la liberación de citoquinas. Se realizaron análisis histopatológicos y ultraestructurales. Se generaron cepas resistentes por presión selectiva del fármaco y se caracterizaron según su índice de resistencia, infectividad, expresión de marcadores genéticos, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y cuantificación de cuerpos lipídicos. **Resultados:** Los hidrogeles fueron transparentes, incoloros, con pH entre 5,84–7,56, y estructura reticulada porosa, siendo estables hasta 11 meses a 4 y 25°C. Los hidrogeles al 0,5%, 1,0% y 1,5% mostraron un efecto dosis respuesta en su eficacia estética y parasitológica con valores de CE₅₀ de 4,45 mM y 4,92 mM respectivamente. Se observó papilomatosis temporal, aumento de mastocitos, células gigantes y granulomas, y disminución del infiltrado inflamatorio y parásitos. Ultraestructuralmente se notaron macrófagos sin parásitos y vacuolas con material electrodensito. Se disminuyó la liberación de IL-4, TNF α y VEGF. Las cepas resistentes se generaron en 8 semanas con índices de resistencia de 5 a 8 en promastigotes, amastigotes y aislados de ratones. Se encontraron niveles de transcripción heterogéneos de varios genes, disminución en la producción de ROS y variación en la concentración de cuerpos lipídicos. **Conclusión:** la formulación tópica de MTF es una alternativa prometedora y segura para el tratamiento de la LC con potencial para ser evaluada en ensayos clínicos en humanos.

¹ Tesis doctoral

² Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Directora: Patricia Escobar Ph.D.

Abstract

Title: Efficacy, safety, and immunomodulatory effect of topical treatment with miltefosine in mice with drug-resistant/susceptible cutaneous leishmaniasis.³

Author: Laura Fernanda Neira Fuentes⁴

Key Words: Dose-response, Histopathology, Immunomodulation, Cutaneous leishmaniasis, Miltefosine, Resistance, Toxicity, Topical treatment

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) in Latin America represents a public health issue due to the heterogeneity of the disease, the risks of dissemination, and the challenges posed by the limited available treatments. Reformulating miltefosine (MTF), currently used in oral capsules, into topical formulations, offers a short-term solution. **Objective:** To design a formulation containing MTF for topical use and evaluate its efficacy, safety, and immunomodulatory effects. Additionally, drug-resistant strains were generated and characterized. **Methodology:** MTF (w/v%) hydrogels were prepared, and their physicochemical, structural, rheological, and functional properties were determined by evaluating color, consistency, pH, viscosity, porosity, particle size, and compound release capacity. The antileishmanial activity was assessed *in vitro* and BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. Cytotoxicity and irritation/corrosion were determined using mouse skin. The immunomodulatory effect was evaluated *in situ* by measuring cytokine release. Histopathological and ultrastructural analyses were performed. Drug-resistant strains were generated through selective drug pressure and characterized based on resistance index, infectivity, expression of genetic markers, production of reactive oxygen species (ROS), and quantification of lipid bodies. **Results:** The hydrogels were transparent and colorless, with a pH ranging from 5.84 to 7.56, and a porous reticulated structure, remaining stable for up to 11 months at 4°C and 25°C. The 0.5%, 1.0%, and 1.5% hydrogels showed a dose-response effect in their aesthetic and parasitological efficacy, with EC₅₀ values of 4.45 mM and 4.92 mM, respectively. Temporary papillomatosis, increased mast cells, giant cells, and granulomas, and reduced inflammatory infiltrates and parasites were observed. Ultrastructurally, macrophages without parasites and vacuoles containing electron-dense material were noted. The release of IL-4, TNF α , and VEGF was reduced. Drug-resistant strains were generated within 8 weeks, with resistance index ranging from 5 to 8 in promastigotes, amastigotes, and mouse isolates. Heterogeneous transcription levels of various genes decreased ROS production, and variations in lipid body concentration were found. **Conclusion:** The topical MTF formulation is a promising and safe alternative for treating CL, with potential to be tested on clinical assays.

³ Doctoral theses

⁴ Faculty of Health. School of Medicine. Director: Patricia Escobar Ph.D.

Introducción

La leishmaniasis representa un desafío en la salud pública global donde más de 1000 millones de personas viven en zonas endémicas corriendo el riesgo de contraer la infección y algunas de desarrollar la enfermedad. Se estima que cada año se producen 30000 nuevos casos de leishmaniasis visceral (LV) y entre 0,7 y 1 millón de nuevos casos de leishmaniasis cutánea (LC). La LC, es la manifestación clínica más frecuente, provoca lesiones cutáneas, ulcerosas, en las zonas expuestas del cuerpo, que pueden dejar cicatrices de por vida y causar discapacidad grave o la estigmatización de la persona. Alrededor del 95% de los casos se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. (OMS, 2023). Esta enfermedad parasitaria, transmitida por mosquitos infectados del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, afecta principalmente a poblaciones en áreas rurales con acceso limitado a servicios de salud. A pesar de los avances en el tratamiento, las opciones terapéuticas disponibles presentan desafíos significativos, incluyendo toxicidad, costos elevados y protocolos de tratamiento prolongados que resultan en baja adherencia y accesibilidad.

En este contexto, la miltefosina (hexadecilfosfocolina, MTF), desarrollada originalmente como un fármaco anticancerígeno y posteriormente registrado como el primer medicamento de uso oral en leishmaniasis y utilizada como tratamiento de LC y su forma visceral (LV) en Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Paraguay, Perú y los Estados Unidos (Suntoyo et al., 2018). Sin embargo, su aplicación ha sido principalmente oral, evidenciando algunas limitaciones del fármaco tales como i. disminución de la eficacia (reactivación y aparición de cepas resistentes) como ha sido reportado en países como la India y Nepal debido probablemente a la vida media del fármaco y a su uso como monoterapia (Bryceson, 2001; Dorlo et al., 2012; Sundar et al., 2012; Srivastava et al., 2017); su potencial teratogénico que

conlleva a las mujeres en edad fértil evitar el embarazo durante y hasta cuatro meses después del tratamiento (Dorlo et al., 2012), iii. reacciones adversas frecuentes como vomito, náuseas, diarrea y dolores abdominales en 62% de los pacientes y efectos hepato y nefrotóxicos leves transitorios en 10-15% de los pacientes tratados con MTF oral (Rahman et al., 2011) y iv, problemas de accesibilidad dificultando el cumplimiento del esquema de tratamiento (Sundar et al., 2002; Sunyoto et al., 2018) su eficacia varía ampliamente, con tasas de éxito que oscilan entre el 33% y el 94% en diferentes formas clínicas de la enfermedad (Garnier & Croft, 2002; Sundar et al., 2002; Soto et al., 2004; Rubiano et al., 2012). Estas limitaciones resaltan la necesidad de investigar más a fondo sobre su uso, especialmente en formulaciones tópicas que podrían ofrecer un perfil de seguridad mejorado y una aplicación más accesible en comparación con los métodos tradicionales de administración.

Dado el contexto problemático de los tratamientos sistémicos y la necesidad de optimizar el tratamiento de la LC, este estudio evaluó el uso tópico de la MTF. La administración tópica no solo podría mitigar los efectos adversos asociados con la administración sistémica, sino que también podría ofrecer una alternativa más accesible y fácil de administrar, especialmente en áreas remotas con acceso limitado a servicios médicos. Además, el enfoque tópico permite una concentración del fármaco directamente en el sitio de la infección, aumentando la eficacia local mientras se reducen las dosis requeridas y, por ende, los efectos secundarios sistémicos. Por lo tanto, este estudio se centra en evaluar la eficacia, seguridad y efectos inmunomoduladores de la MTF tópica en modelos experimentales, con el propósito de proporcionar una base sólida para futuros estudios clínicos.

El objetivo principal de esta tesis es evaluar la eficacia, seguridad y el efecto inmunomodulador del tratamiento tópico con MTF en ratones infectados con cepas de *L. amazonensis* susceptibles y resistentes a este fármaco.

Específicamente, este estudio se planteó:

1. Diseñar y caracterizar fisicoquímica, estructural y funcionalmente una formulación tópica que contenga MTF para su uso directo en las lesiones de LC.
2. Determinar la eficacia terapéutica (Dosis-respuesta) de la MTF tópica en reducir la carga parasitaria y tamaño de las lesiones de LC, en el modelo murino.
3. Investigar los efectos inmunomoduladores del tratamiento, analizando cambios histopatológicos e inmunológicos en las lesiones tratadas.
4. Explorar mecanismos de resistencia en cepas de *Leishmania* que han mostrado resistencia a la MTF, buscando entender cómo el parásito evade la acción del fármaco.

Esta tesis se encuentra dividida en cuatro capítulos, que abordan aspectos teóricos y técnicos del tratamiento con MTF, ofreciendo nuevas perspectivas sobre su aplicación y los mecanismos de acción y resistencia.

En el **Capítulo 1**, se aborda el diseño y caracterización fisicoquímica, estructural y funcional de un hidrogel de MTF diseñado para su aplicación tópica. Este enfoque busca superar las limitaciones de los tratamientos sistémicos convencionales, como la toxicidad y la baja adherencia, ofreciendo una alternativa más segura, accesible y eficaz. La formulación tópica no solo proporciona una acción localizada y directa sobre las lesiones, sino que también simplifica el esquema terapéutico y reduce significativamente los costos, especialmente en áreas endémicas. En este capítulo se realizó una caracterización detallada del hidrogel, evaluando aspectos organolépticos tales como color, olor, aspecto, consistencia, pH, viscosidad, estructura interna del

hidrogel, composición química, distribución de la MTF en la formulación, el hidrogel como sistema de liberación de compuestos, el dimetilsulfóxido (DMSO) y MTF como potenciadores de la permeación, toxicidad *in vivo* e *in vitro*, actividad antileishmania *in vitro* y la estabilidad del hidrogel a diferentes temperaturas hasta por 11 meses. Los resultados encontrados en este capítulo son clave para asegurar la eficacia y seguridad del hidrogel en condiciones controladas. Los hallazgos de este trabajo abren la puerta a la siguiente fase del desarrollo, la realización de ensayos clínicos, donde se podrá validar su eficacia y seguridad en un contexto clínico. Este proceso es esencial para llevar esta formulación innovadora desde el laboratorio hasta el paciente, marcando un paso importante en el tratamiento de la LC.

En el **Capítulo 2**, se describe la dosis-respuesta de la MTF aplicada tópicamente en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*. El capítulo inicia con la estandarización del modelo murino, en el cual se realizó la identificación molecular de la especie de *Leishmania*, seguido de la inducción de lesiones de LC en ratones BALB/c, determinando tiempo y velocidad de crecimiento de las lesiones (ulcera/nódulo). Además, se realizó la validación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para determinación de carga parasitaria de las lesiones de los animales. Con el modelo estandarizado, se evaluó la efectividad del tratamiento tópico de MTF, evaluando cuatro concentraciones de MTF tópica (0,06 a 1,5 %p/v) realizando un análisis de dosis respuesta teniendo en cuenta los porcentajes de reducción del tamaño de las lesiones, carga parasitaria, improntas y biopsias. Con los resultados encontrados en este trabajo, se pudo establecer una dosis óptima de la MTF aplicada vía tópica, la cual demuestra su eficacia terapéutica mientras minimiza los efectos adversos, los cuales se podrían adaptar al tratamiento utilizando dosis que sean efectivas y seguras para humanos en estudios clínicos posteriores.

El **capítulo 3** de esta tesis, se examinó en profundidad el efecto *in situ* de la MTF tópica en un modelo murino de LC, desde el inicio del tratamiento (D0), pasando por la mitad (D12) y el final (D25), hasta los 60 días postratamiento (p.t.). Se buscó establecer biomarcadores histopatológicos, ultraestructurales e inmunológicos relacionados con el mecanismo de acción de la MTF sobre las lesiones cutáneas y la respuesta inmunitaria del ratón. Durante el tratamiento, se realizaron biopsias para analizar los cambios histopatológicos en la epidermis y dermis. Además, se empleó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar alteraciones ultraestructurales en los macrófagos y amastigotes. Por último, se llevó a cabo un análisis inmunológico en homogenizados de las lesiones, cuantificando la liberación de citocinas pro y antiinflamatorias, observándose variaciones en el perfil de citocinas entre la piel infectada, tratada con MTF y piel sana. Este cambio no solo demuestra la capacidad de la MTF para reducir la inflamación, sino que también destaca su función inmunomoduladora, ajustando la respuesta inmune del ratón para mejorar su defensa. Así, este capítulo aporta una comprensión más profunda de cómo la MTF actúa directamente sobre el parásito, promoviendo una recuperación integral del tejido dañado y modulando el ambiente inmunológico para favorecer una curación más completa y duradera de las lesiones cutáneas en este modelo de LC.

Finalmente, en el **capítulo 4** se aborda un análisis de los mecanismos de resistencia de *L. amazonensis* frente a la MTF. Mediante una combinación de metodologías *in vitro* e *in vivo*, este estudio exploró las características biológicas y moleculares de la resistencia. Se generaron cepas resistentes de *L. amazonensis* incrementando gradualmente las concentraciones de MTF, y su resistencia fue evaluada utilizando ensayos de inhibición de crecimiento con resarzurina para determinar las concentraciones inhibitorias (IC₅₀) y calculando los índices de resistencia. Asimismo, se investigó la resistencia cruzada con otros fármacos antileishmania y se examinaron

los cambios en la expresión génica relacionados con la resistencia mediante RT-qPCR. También se evaluó la capacidad de las cepas resistentes para infectar y causar enfermedad en modelos de ratón BALB/c, lo que permitió obtener una visión sobre la virulencia y patogenicidad en relación con la resistencia. Este capítulo, además de incluir la caracterización molecular realizada en el Instituto René Rachou de Fiocruz utilizando técnicas como citometría de flujo y microscopía confocal, demostró cómo *L. amazonensis* se adapta para sobrevivir a la MTF. Esto resalta la necesidad urgente de desarrollar estrategias terapéuticas que puedan superar o mitigar la resistencia a la MTF.

Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados obtenidos de esta tesis doctoral, proporciona una visión integral sobre el potencial terapéutico de la MTF reformulada en un hidrogel de administración tópica para el tratamiento de la LC. Además de proponer una alternativa más segura y eficaz, los resultados de este trabajo abren la puerta a tratamientos combinados que podrían potenciar la acción de la MTF, mejorando la eficacia terapéutica y reduciendo la aparición de resistencia. Lo más relevante de este estudio es que, al formar parte de la fase preclínica, sienta las bases para trasladar los hallazgos desde la práctica de laboratorio a un producto potencialmente utilizable en la clínica. Este proceso culminará en un ensayo clínico aprobado por el Ministerio de Ciencia y tecnología (Minciencias), llevando esta formulación innovadora desde el laboratorio hasta su aplicación en pacientes humanos.

1. Caracterización fisicoquímica, estructural y funcional de un hidrogel de miltefosina para el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea

1.1 Tratamientos tópicos: uso tópico de MTF, hidrogeles, potenciadores de la permeación

1.1.1 Estrategias terapéuticas en LC

La LC es un conjunto de enfermedades caracterizadas por presentar diferentes tipos de lesiones en la piel. Se observan desde lesiones únicas, a múltiples, pápulas, nódulos, úlceras de diferentes tamaños y formas, pudiendo ser asintomática o presentar formas diseminadas a mucosa. Representan un desafío para la salud pública global, especialmente en regiones endémicas donde los recursos son limitados y la carga de la enfermedad es alta (OMS, 2023). La variabilidad en la presentación clínica de la LC refleja la diversidad de especies de *Leishmania* involucradas y la complejidad de la respuesta inmune del huésped. Aunque algunas lesiones pueden resolverse sin intervención, el tiempo prolongado hacia la curación y el estigma asociado con la cicatrización recalcan la necesidad de tratamientos más efectivos y accesibles. Los tratamientos actuales, son pocos, de efectividad variable, con limitaciones significativas debido a la toxicidad, la duración del tratamiento y el requerimiento de su administración parenteral, lo que resulta en el incumplimiento de los esquemas de tratamientos. Además, la resistencia emergente resalta la urgencia de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

La guía actualizada de la Organización Panamericana de la Salud (siglas en inglés, PAHO) establece una estrategia diferenciada basada en evidencia para el tratamiento de la LC en el Nuevo Mundo (NM), adaptándose a las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad (PAHO, 2022). Este enfoque contempla las variaciones en la forma clínica de la leishmaniasis, la especie de *Leishmania* involucrada, la ubicación geográfica, y considera de manera específica la edad del paciente. Para los adultos, destaca el uso intralesional (IL) de antimoniales pentavalentes

(Sb^V) en casos localizados por *L. braziliensis* y *L. amazonensis*. La miltefosina (MTF) se recomienda para tratar a *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*, y *L. braziliensis*. Por otro lado, el isetionato de pentamidina (PMD), la termoterapia y la paromomicina (PAR) son recomendados de manera condicional para ciertas especies. En población pediátrica, la MTF y la PM se sugieren para las mismas especies. Los tratamientos abarcan desde los Sb^V, la anfotericina B liposomal (AmB-L), MTF, y PMD de uso sistémico, hasta tratamientos localizados como los Sb^V aplicados IL, la PAR utilizada tópicamente en crema o ungüento y la termoterapia y la radiofrecuencia. Estos nuevos enfoques permiten una gestión efectiva de la LC-NM, enfatizando la importancia de una selección de tratamiento que responda a las necesidades específicas de cada grupo poblacional y considerando situaciones especiales como el embarazo y la inmunosupresión. El esquema de tratamiento con Sb^V suele ser de 20 mg/kg/día por 20 a 30 días. Este tratamiento tiene restricciones y presenta efectos adversos que van desde síntomas gastrointestinales y musculoesqueléticos a efectos graves como cardiotoxicidad, alteraciones hepáticas y renales. Los Sb^V aplicados IL pueden causar dolor y reacciones locales (Brito et al., 2019). La AmB-L es aprobada por la Administración Federal de Medicamentos (siglas en inglés, FDA) y ha demostrado una alta eficacia a 2–3 mg/kg/día por hasta una dosis acumulada de 60 mg/kg y máxima diaria de 250 mg, pero su uso en LC muestra variabilidad en las tasas de curación entre 46 a 88%, dependiendo de la especie de *Leishmania* y las dosis utilizadas, lo que resalta la necesidad de más estudios (Naeem et al., 2021). La MTF de uso oral representa un avance significativo en el tratamiento de la leishmaniasis por su facilidad de administración y ha mostrado tasas de curación entre 53 a 91% que varían según la especie de *Leishmania* y la región geográfica (Soto et al., 2004). El esquema de tratamiento recomendado de la MTF es 1,5 a 2,5 mg/kg/día, con dosis máxima de 150 mg diarios, durante 28 días (PAHO, 2022). Los eventos adversos a nivel

gastrointestinal y el potencial daño teratogénico limitan su uso, requiriendo medidas anticonceptivas estrictas en mujeres en edad fértil (durante y cuatro meses después del tratamiento) y monitoreo de la función hepática y renal. La PMD es otro agente antileishmania utilizada con dosis de 3 a 4 mg/kg/día vía intramuscular o endovenosa, en 4 dosis, por 5 a 7 días en días alternos, su uso es limitado por sus efectos secundarios como nefrotoxicidad, riesgo de diabetes y alteraciones cardíacas (Chakravarty et al., 2019; Garza-Tovar et al., 2020).

1.1.2 Los tratamientos localizados en LC-NM

La LC se caracteriza por presentar lesiones en la piel observables a simple vista. Sin embargo, a diferencia de algunas infecciones superficiales de la piel, los parásitos de *Leishmania* residen intracelularmente en macrófagos de la capa dérmica (interna) de la piel. Los tratamientos localizados ya sean físicos o con fármacos deben acceder hasta el sitio donde habitan los parásitos. Bajo esta premisa, los tratamientos localizados, orientados hacia las lesiones de LC, podrían representar una opción prometedora en algunos casos de LC con múltiples beneficios en comparación con las terapias sistémicas. Estos tratamientos permitirían disminuir los efectos secundarios resultantes de la toxicidad de los tratamientos convencionales, simplificarían el régimen terapéutico facilitando la adherencia de los pacientes al tratamiento y evitarían biotransformación de los fármacos en el hígado, resultando en una eficacia localizada (Severino et al., 2022). Desde una perspectiva económica la disminución de la concentración del fármaco y de los gastos de hospitalización reduciría los costos de tratamiento especialmente en regiones donde la LC es endémica y los recursos son limitados (Carneiro et al., 2012).

Entre los tratamientos localizados físicos para la LC, se encuentran la termoterapia y crioterapia, utilizan calor o frío para destruir los amastigotes intracelulares directamente. La termoterapia consiste en la aplicación local de calor a 50 °C durante 30 segundos en una sola aplicación o con

aplicaciones repetidas hasta por 4 semanas. Ha mostrado una eficacia del 70% en estudios clínicos de *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. major* y *L. mexicana* (Cardona-Arias et al., 2015). En la crioterapia, se rocía nitrógeno líquido durante 5 a 20 segundos hasta que la lesión parezcan congelados en una o varias sesiones y ha mostrado eficacia clínica del 17% en *L. braziliensis* y hasta 84% en *L. major* (Soto et al., 2013; Mosleh et al., 2008). Otro tratamiento, es la terapia laser que consiste en inducir fototermólisis selectiva de las lesiones cutáneas lo que permite una destrucción localizada de los tejidos infectados sin afectar significativamente los tejidos circundantes, reportando eficacia hasta del 90% en pacientes con LC por *L. major* (Omidian et al., 2019). Por otro lado, las infiltraciones con Sb^V-IL han sido utilizadas mostrando tasas significativas de curación. Estudios demostraron que las inyecciones intralesionales de Sb^V presentan una tasa de curación que varía entre el 57% con una dosis de 3 inyecciones (81 mg Sb/mL) y el 73% con 5 inyecciones (650 µg Sb/8 µL por mm² de área de lesión por día) en pacientes bolivianos con lesiones de *L. braziliensis*, debido a su capacidad de concentrar el fármaco directamente en el sitio infectado, lo que permite una acción más directa y potente contra el parásito (Soto et al. 2013; Soto et al., 2016).

Finalmente están los tratamientos tópicos aplicados sobre las lesiones. Estos últimos constituyen un verdadero reto farmacéutico debido a que deben garantizar que el principio activo atraviese el estrato córneo (SC) y acceda los macrófagos infectados en la dermis. Por lo tanto, es necesario diseñar un tratamiento dérmico/transdérmico los cuales, si bien son aplicados en piel, los componentes de la formulación deben permitir que sus compuestos activos atraviesan las capas externas de la piel y llegar a la dermis o a los órganos internos.

Diversos tratamientos dermatológicos han sido evaluados en pacientes con LC-NM como el ungüento de PAR al 15%, un antibiótico aminoglucósido que ha demostrado efectos antileishmania desde la década de 1960, siendo investigado también como crema en combinación

con otros compuestos como el cloruro de metilbencetonio (MBCl) al 12%, urea al 10% y gentamicina al 0,5% como potenciadores de la permeación (PPP) o antibióticos (Asilian et al., 2003). La eficacia del tratamiento tópico con PAR con o sin PPP en LC-NM ha presentado eficacias que van desde el 20 al 90 % en diferentes estudios. En un estudio reciente, la PAR al 15% ha sido formulada en la pomada de Aquaphilic (mezcla de emolientes como urea, ácido láctico, lauril sulfato de sodio, propilenglicol, parabenos) fue aplicada 1 vez al día por 20 días ocluyendo la lesión en pacientes con LC causada por *L. braziliensis*, mejoró la eficacia con una tasa de curación del 77,5%, superior al control positivo de PMD aplicada IL que fue de 70% (Soto J et al., 2019). El ungüento de PAR al 15% y MBCL al 12 % administrado 20 veces (durante 10 o 20 días) en 52 pacientes ecuatorianos con LC-NM, mostró tasas de curación de 72% después de 50 días de seguimiento (Krause et al., 1994). En otro estudio en pacientes de Guatemala, el ungüento PAR al 15% y MBCl al 12% aplicada dos veces al día durante 20 días mostró tasas de curación del 54%, 2,17 veces superior al del grupo placebo (Arana et al., 2001). En un estudio fase III realizado en Colombia en pacientes con LC con *L. panamensis* y *L. braziliensis*, pacientes tratados con PAR/MBCL (15%/12%) tópico dos veces al día durante 10 días más Sb^v intramuscular (20 mg Sb/kg/día) por 7 días, mostró una eficacia del 58%, mientras que los pacientes tratados con el mismo tratamiento tópico y Sbv intramuscular por solo 3 días, tuvo una eficacia del 20% (Soto et al., 1998).

El uso de imiquimod como tratamiento tópico en la LC ha mostrado resultados prometedores cuando se combina con Sb^v. En un estudio realizado en Perú, en pacientes infectados por *L. braziliensis* y *L. peruviana*, la combinación de imiquimod tópico al 7.5% y Sb^v (20 mg/kg/día) durante 20 días logró una eficacia del 100% a los 3 meses, superando al tratamiento con Sb^v solo (57%) y al imiquimod solo, que no logró mantener la curación (Arévalo et al., 2007). De manera

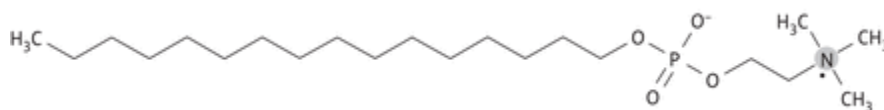
similar, en pacientes con leishmaniasis resistente a Sb^V, la combinación de imiquimod al 5% aplicado cada dos días y Sb^V durante 20 días alcanzó una tasa de curación del 90% a los 6 meses (Arévalo et al., 2001). Otro estudio en Perú, con 80 pacientes infectados por *L. braziliensis*, *L. peruviana* y *L. guyanensis*, comparó la combinación de imiquimod al 5% aplicado tres veces por semana con Sb^V, logrando una tasa de curación del 75% a los 12 meses (Miranda-Verastegui et al., 2009). La AmB ha sido utilizada en formulaciones tópicas, como la emulsión aceite en agua de AmB al 3% (Anfoleish) aplicada tópicamente en pacientes colombianos con LC-NM no complicada causada por *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* mostró tasas de curación del 39,4% (López et al., 2018). Otras formulaciones tópicas han sido evaluadas en algunos modelos experimentales en LC. Los geles y emulsiones conteniendo el compuesto buparvacuona (BPQ), una hidroxilnaftoquinona con actividad antiprotozoaria, y su profármaco 3-fosfonoximetil-buparvacuona (3-POM-BPQ) han sido eficaces reduciendo la carga parasitaria y tamaño de la lesión por *L. major* (Mantyla et al., 2003; Garnier et al., 2007). Ungüentos conteniendo morfina, conocida por sus propiedades inmunomoduladoras, redujeron el tamaño de lesión a $4,81 \pm 3,22$ mm en comparación con el control $8,95 \pm 5,71$ en ratones con LC por *L. major* (Alavi-Naini et al., 2008; Ghaffarpasand et al., 2016). Asimismo, apósitos de alcohol polivinílico conteniendo el arteméter (derivado de la artemisinina) un fármaco antiparasitario, aplicado a $25 \mu\text{g} / 100\mu\text{L}$ por 3 semanas sobre las lesiones en ratones BALB/c con LC por *L. major*, mostró efectos anti-*Leishmania* reduciendo en un 77,1% el tamaño de las lesiones (Ebrahimisadr et al., 2014). Se ha demostrado que un gel conteniendo Sb^V encapsulado en liposomas nanodeformables (NDL) mejora hasta cuatro veces la actividad *in vitro* contra amastigotes intracelulares de *L. tropica* en comparación con Sb^V en solución (Dar et al., 2018). Otros estudios con ratones BALB/c infectados con *L. panamensis* y *L. braziliensis*, se administraron dosis de 150, 50 y 16,6 mg Sb^V/kg/día

durante 29 días. La dosis más alta alcanzó una eficacia del 66.6% en *L. panamensis* y del 33.3% en *L. braziliensis*, aunque se observó reactivación de lesiones en algunos ratones curados estéticamente (Vera et al., 2021). Finalmente, Los tratamientos tópicos con azoles, como el ketoconazol (KTZ), han mostrado una eficacia variable en el tratamiento de la LC. En un estudio con ratones BALB/c infectados con *L. braziliensis* y *L. panamensis*, se evaluaron formulaciones tópicas de ketoconazol en concentraciones de 2%, 10% y 15% en gel, crema y lipogel. Aunque estas formulaciones demostraron una actividad *in vitro* significativa contra promastigotes ($IC_{50} < 11,10 \mu\text{g/mL}$), no lograron curar las lesiones en los ratones (Veral et al., 2018). Por otro lado, en otro estudio se combinó Sb^{V} y liposomas de KTZ para tratar *L. mexicana*. Esta combinación mejoró notablemente la permeación cutánea y redujo la carga parasitaria en 35,33 veces comparado con Sb^{V} en solución, demostrando un efecto sinérgico entre los dos fármacos (Dar et al., 2020; Vera et al., 2018).

1.1.3 La MTF como una opción de tratamiento tópico en LC

1.1.3.1 Estructura de la MTF

La MTF es una alquilfosfocolina, desarrollada originalmente como medicamento paliativo para las metástasis cutáneas del cáncer de mama (Eibl & Unger, 1990). Su nombre químico es hexadecil 2- (trimetilazaniumyl) etil fosfato, también conocido como hexadecilfosfocolina (**Figura 1**). Es un compuesto anfifílico y zwitteriónico debido al grupo de amina cuaternaria cargada positivamente (cargada permanentemente) y al grupo fosforilo cargado negativamente (pK_a : ~2). El compuesto cristalino es un polvo higroscópico blanco y soluble en disolventes acuosos y orgánicos. La fórmula empírica, peso molecular y solubilidad en etanol y DMSO se muestran en la **figura 1**.

Figura 1 Características fisicoquímicas de la MTF

Formula molecular	C ₂₁ H ₄₆ NO ₄ P
Peso molecular	407,576 g/mol
Solubilidad agua, etanol y DMSO	≥2,5, 1,5 y 0,8 mg/mL.
pKa	~2
Donador/aceptor de H	0/4

Nota: Estructura tomada de Dorlo et al., 2012

Según sus propiedades fisicoquímicas y estructura molecular, la MTF puede ser considerada un buen candidato para ser formulada para el tratamiento tópico en LC. Esto debido a que posee un peso molecular adecuado, menos de tres donantes de enlaces de hidrógeno, buena solubilidad en el vehículo de formulación y un coeficiente de partición entre uno y tres, características que facilitan su penetración a través del SC, la principal barrera cutánea para los fármacos aplicados tópicamente (Van Bocxlaer et al., 2016).

1.1.3.2 Uso tópico de la MTF

La MTF fue desarrollada inicialmente para ser utilizada tópicamente en lesiones cutáneas de metástasis de cáncer de mama (Leonard et al., 2001). Para este fin la MTF fue formulada al 6% (p/v) en una solución tópica de éteres de propilenglicol, registrada comercialmente con el nombre comercial de Miltex®. El uso de MTF en solución al 6% fue evaluado en ratones infectados con *L. mexicana* y *L. major*, reportándose una reducción del 85% al 99% de parásitos en los ganglios

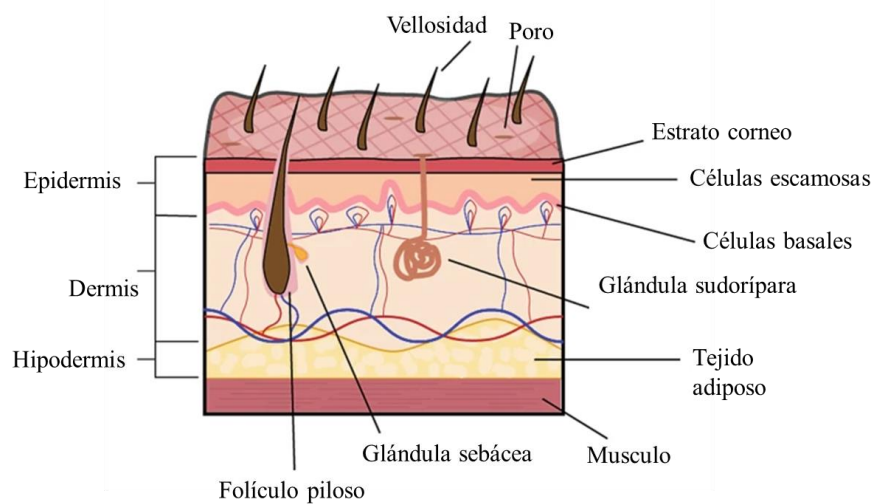
linfáticos y el bazo. Se administró una dosis diaria aproximada de 1,5 mg de MTF, aplicada tópicamente durante 2 a 5 semanas. Este tratamiento resultó en la desaparición visible y palpable de las lesiones en los ratones, aunque algunos, especialmente los infectados con *L. mexicana*, presentaron recaídas tras el tratamiento. En los ratones infectados con *L. major*, las lesiones sanaron más rápidamente y no se observaron recaídas (Schmidt-Ott et al., 1999). Por otro lado, recientemente, una solución de MTF al 6% p/v preparada en una solución conteniendo propilenglicol, agua, dimetil isosorbide y octil salicilato y combinaciones entre ellos, mostró solo una mínima mejora en el tamaño de la lesión y en la carga parasitaria, una baja penetración del fármaco y marcada irritación después de 5 días de tratamiento en ratones BALB/c con LC por *L. major*, (Van Bocxlaer et al., 2016). Contrariamente el tratamiento tópico con un hidrogel de carbopol conteniendo MTF al 0,5% por 21 días, redujo el tamaño de la lesión entre un 84% a un 100% sin detección de parásitos en ratones BALB/c con LC por especies del NM (Neira et al., 2019). Otros estudios, utilizando formulaciones liposomales que contienen MTF, han sido efectivos al mostrar el cierre de lesiones, denominado 'cura estética', y una disminución en la carga parasitaria en ratones BALB/c con LC por *L. amazonensis*. En los tratamientos con concentraciones de 0,5% de MTF dos veces al día por tres semanas, se observó una reducción de la carga parasitaria del 99,6%, mientras que con *L. major* a concentraciones del 4% de MTF aplicadas dos veces al día durante 4 semanas, la reducción fue del 99,8% (Peralta et al., 2022; Kavian et al., 2019). Las diferencias en los resultados encontrados con el uso tópico de MTF podrían deberse a la variación en las especies de *Leishmania* involucradas, la duración del tratamiento y los componentes de la formulación (Neira et al., 2019).

1.1.4 Tratamientos dérmicos/transdérmicos

1.1.4.1 Estructura de la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo cumpliendo con funciones protectoras, sensoriales e inmunológicas. Es un sitio clave para la administración no invasiva de sustancias biológicamente activas. La piel se compone de tres partes: la epidermis, la dermis y la hipodermis (**Figura 2**). La capa superficial y más delgada es la epidermis, mientras que la dermis se encuentra en la capa más profunda. Específicamente, el SC, la capa más externa de la epidermis, se considera la principal barrera para el paso de sustancias a través de la piel. El SC está formado por células queratinizadas densas y funcionalmente muertas, conocidas como corneocitos, que están rodeadas por una matriz lipídica intercelular compuesta de lípidos no polares organizados en capas laminares, lo que le confiere al SC su carácter principalmente hidrofóbico. A pesar de tener un grosor de solo 10 a 20 μm , el SC es responsable de la función de barrera de la piel, dificultando la penetración de fármacos, otras sustancias químicas y microorganismos, además de estar involucrado en la regulación de la pérdida transepidérmica de agua (Brunaugh et al., 2019).

Figura 2 Estructura de la piel



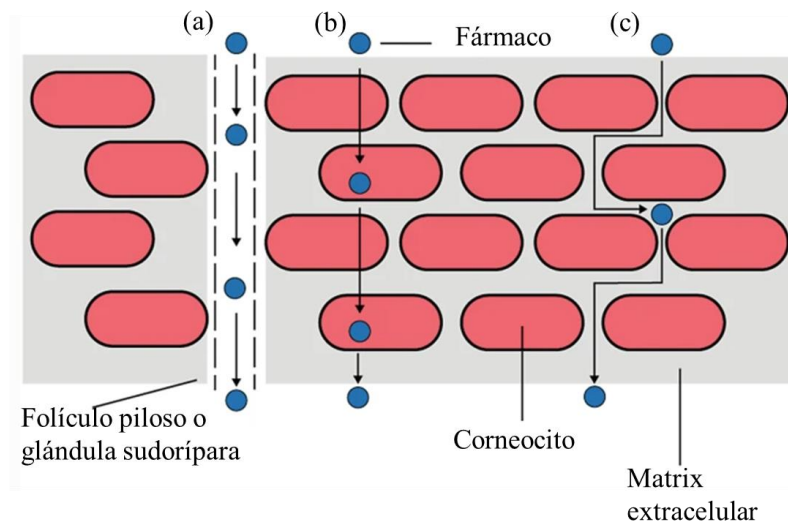
Nota: La figura es un corte transversal de la piel, mostrando sus capas y estructuras internas. La capa superior, la epidermis, está dividida en el estrato córneo, células escamosas y células basales, con un poro y tallo del cabello visibles. En la dermis subyacente se encuentran los folículos pilosos y las glándulas sebáceas que secretan sebo, así como glándulas sudoríparas. La hipodermis más profunda contiene tejido adiposo y terminaciones de fibras musculares, que aíslan y almacenan energía. Grafica modificada de Brunaugh et al., 2019.

1.1.4.2 Características de las formulaciones tópicas

Una formulación tópica consiste en un principio activo y en un sistema portador no activo, que incluye el vehículo y los excipientes. Está diseñada para aplicarse en áreas específicas de la piel o membranas mucosas y busca ejercer un efecto local, aunque algunos componentes pueden absorberse y tener un efecto sistémico. Estas formulaciones se presentan en varias formas como cremas, ungüentos, geles, lociones, soluciones y aerosoles, adaptándose a las necesidades de aplicación y al tipo de afección que tratan. El principio activo no se aplica puro sino diluido en un sistema portador que facilita su entrega y mejora la tolerancia y el rendimiento del producto. Los parámetros fisicoquímicos para la difusión pasiva del fármaco a través de la piel incluyen su solubilidad, comportamiento de partición y coeficiente de difusión, según la ley de Fick (Talevi et al., 2021; Brunaugh et al., 2019). Se ha demostrado que los fármacos con un peso molecular menor a 500 g/mol pueden penetrar la piel más eficazmente (Barry et al., 2001). El sistema portador no activo es esencial ya que afecta la eficacia de la entrega del fármaco y la aceptación del producto por los pacientes. Los vehículos pueden clasificarse en semisólidos y líquidos y se seleccionan según el tipo y la condición de la piel, así como los factores ambientales. Los excipientes son sustancias no activas que contribuyen a la estabilidad, eficacia y seguridad de la formulación. Sus

funciones varían y pueden actuar como humectantes, solventes, antioxidantes, conservantes, agentes de ajuste de pH y espesantes. También se emplean potenciadores de penetración (PPP) para facilitar el transporte del principio activo hacia las capas internas de la piel (Azzi et al., 2005). Se han considerado tres posibles vías para la administración de fármacos a través de la piel (**Figura 3**): La ruta intercelular es la más importante para la penetración de fármacos debido a que permite una absorción más directa y rápida a través de los espacios existentes entre los corneocitos, sin necesidad de atravesar las barreras celulares densas que implica la ruta transcelular. Esto facilita la difusión de fármacos hidrofílicos y lipofílicos, optimizando la eficacia del tratamiento tópico aplicado (Carneiro et al., 2012; Brunaugh et al., 2019).

Figura 3 Representación esquemática de las vías de administración tópica de fármacos



Nota: (a) Ruta transanexial: la molécula de fármaco pasa a través de estructuras de la piel como los folículos pilosos o las glándulas sudoríparas. (b) Ruta transcelular: la molécula de fármaco atraviesa directamente las células de la piel, conocidas como corneocitos. (c) Ruta intercelular: la

molécula de fármaco se mueve entre los corneocitos, pasando a través del espacio de la matriz extracelular. Estas rutas reflejan los diferentes caminos potenciales que una molécula de fármaco puede tomar para superar la barrera del estrato córneo y entrar en las capas más profundas de la piel. Grafica modificada de Brunaugh et al., 2019.

1.1.4.3 Hidrogeles como sistemas de liberación de fármacos (SLF)

Las formulaciones de uso tópico se han convertido en un área de interés en la industria farmacéutica debido a la versatilidad para incorporar principios activos y aumentar su eficacia. Los geles se destacan por su simplicidad en la composición y en la facilidad de su preparación. Los geles son matrices de un agente gelificante y un componente líquido, que forman una estructura de red tridimensional caracterizada por propiedades de rigidez y elasticidad. Dependiendo de su composición y método de preparación, los geles se pueden clasificar en hidrogeles, organogeles, emulgeles, bigeles, aerogeles, xerogeles o criogeles. Asimismo, se conocen hidrogeles inteligentes e hidrogeles superporosos e incluso considerando los tamaños de partículas, se encuentran disponibles macrogeles, microgeles y nanogeles para desarrollar productos farmacéuticos y cosméticos (Nayak et al., 2018)

Los hidrogeles representan un SLF utilizado en diversas áreas médicas por ejemplo en la cicatrización de heridas y el tratamiento del dolor. Están compuestos por una red de polímeros entrecruzados y contienen una proporción de agua entre el 70 y el 99%, lo que les confiere una textura física similar a la de los tejidos vivos. Esta característica proporciona a los hidrogeles una excelente biocompatibilidad y les permite encapsular fármacos hidrofílicos/hidrofóbicos con facilidad. Su formación en soluciones acuosas reduce el riesgo que ocurre en disolventes orgánicos de desnaturalización y agregación de los fármacos. La red polimérica les otorga una consistencia

sólida pero adaptable que imita las propiedades físicas de distintos tejidos blandos del cuerpo humano (Bodugoz-Senturk et al., 2009). La red entrecruzada actúa como una barrera que previene la penetración de contaminantes biológicos, protegiendo contra la degradación prematura (Su et al 2010).

Los hidrogeles naturales provienen de polímeros existentes en la naturaleza, como colágenos y polisacáridos, los semisintéticos de polímeros naturales que han sido modificados químicamente y los sintéticos de modificaciones químicas o síntesis completa de polímeros artificiales tales como el ácido poliacrílico, poliacrilamida, poli (N-vinil pirrolidona), poli (hidroxialquil metacrilato), ácido acrílico, ácido metacrílico, N-isopropil acrilamida, N-vinil-2-pirrolidona, etc. Están los convencionales y los inteligentes o sensibles a estímulos, que alteran su comportamiento en respuesta a cambios ambientales como el pH o la temperatura; los no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfotéricos, según la presencia y tipo de carga eléctrica de sus grupos funcionales; los biodegradables, que se descomponen en componentes menos dañinos, y los no biodegradables, duraderos y estables (Urvashi et al., 2022). Finalmente, existen los hidrogeles físicos formados por interacciones no covalentes como enlaces de hidrógeno; los químicos, formados por enlaces covalentes; y los bioquímicos, que utilizan sustancias biológicas en su formación. Cada tipo de hidrogel es idóneo para aplicaciones específicas, desde la medicina regenerativa hasta la liberación controlada de fármacos (Ahmed et al., 2015). La preparación de hidrogeles se basa en técnicas de entrecruzamiento físico y químico, que incluyen el calentamiento o enfriamiento de un polímero, interacción iónica, coacervación compleja, enlace de hidrógeno, maduración, ciclos de congelación-descongelación, injerto químico, injerto por radiación, entre otros. El entrecruzamiento químico implica la unión de cadenas poliméricas mediante un agente de entrecruzamiento, logrando la reacción entre grupos funcionales poliméricos como carboxílicos,

hidroxilos y amidas con agentes como el dihidrazida del ácido adípico y el glutaraldehído. Los hidrogeles químicamente entrecruzados también pueden prepararse mediante interacciones hidrofóbicas, incluyendo el entrecruzamiento covalente de un grupo polar incorporado por oxidación o hidrólisis (Kesharwani et al., 2021).

Los hidrogeles son una plataforma prometedora como SLF por su capacidad para retener agua, su biocompatibilidad y su comportamiento de hinchamiento controlable permitiendo mantener altas concentraciones del fármaco en el tejido objetivo por periodos prolongados. Su estructura porosa permite una carga y liberación eficiente del medicamento administrado por diferentes vías como la oral, tópica, inyectable, ocular, vaginal y rectal (Kesharwani et al., 2021). En la vía tópica, los hidrogeles ofrecen ventajas significativas para el tratamiento de afecciones cutáneas, aumentando el tiempo de residencia del fármaco en el sitio de aplicación y reduciendo la frecuencia de aplicación. Se han desarrollado hidrogeles con SLF en el tratamiento de afecciones como el acné, micosis, infecciones de heridas, psoriasis entre otros (**Tabla 1**).

Tabla 1 Hidrogeles de uso tópico y su aplicación terapéutica

Sistema de hidrogel	Agente terapéutico activo	Polímero utilizado	Enfermedad tratada	Referencia
Parches adhesivos de hidrogel	Triclosán	Poliacrilato de sodio, Carboximetilcelulosa	Acné vulgar	Lee et al., 2003
Hidrogel de quitosano fotocruzable	Factor de crecimiento de fibroblastos-2	Quitosano	Infección de heridas	Obara et al., 2003
Hidrogel a base de dextrano	Anfotericina B	Polietilenglicol	Micosis	Zumbuehl et al., 2007
Hidrogel de metileno azul liposomal	Azul de metileno	Celulosa	Acné vulgar	Fadel et al., 2009
Mezclas de hidrogel de quitina/quitosano	Fucoidán	Quitosano, Alginato	Infección de heridas	Murakami et al., 2010
Hidrogel a base de nanotransportadores	Dipropionato de betametasona, Ácido salicílico	Carbopol 934	Psoriasis	Baboota et al., 2011
Apósitos de gel de colágeno modificados	Colágeno	Colágeno	Heridas crónicas isquémicas, reducción de angiogénesis	Elgharably et al., 2015

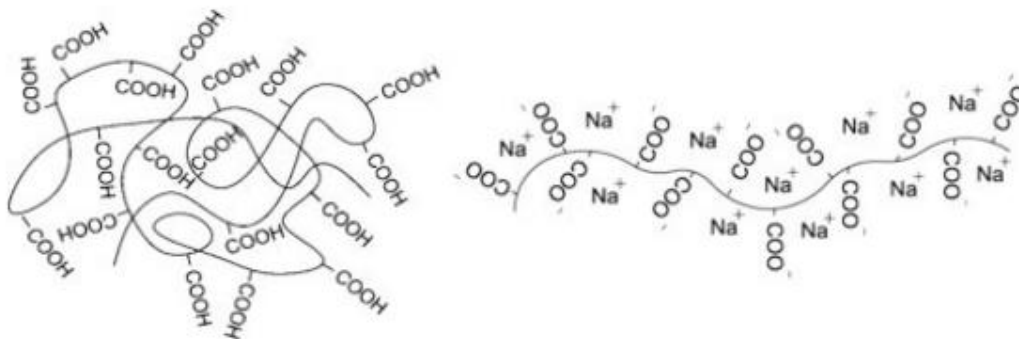
Gel de carbómero	Metotrexato	Carbopol 934	Psoriasis	Tripathi et al., 2018
Hidrogel a base de transportador lipídico nanoestructurado	Furoato de mometasona	Carbopol 940	Psoriasis	Kaur et al., 2018
Hidrogel tópico de clorhidrato de terbinafina	Clorhidrato de terbinafina	Carboximetilcelulosa de sodio, poloxámero	Actividad antifúngica	Kumar et al., 2020

Nota: la tabla resume la investigación y el desarrollo de varios sistemas de hidrogel diseñados para la administración tópica de agentes terapéuticos activos. Esta compilación de datos ofrece una visión integral de las aplicaciones potenciales de los hidrogeles en el tratamiento de afecciones cutáneas y heridas, destacando los avances en formulaciones de liberación controlada y su impacto en la terapia dermatológica y la cicatrización de heridas. Modificado de Kesharwani et al., 2021.

1.1.4.4 Hidrogeles de carbopol

La marca Carbopol® representa un grupo de polímeros sintéticos de ácido acrílico con alto peso molecular (por ejemplo, Carbopol: -910, 934, 940, 941, y934P) de la compañía Lubrizol Corporation. Estos polímeros son hidrofílicos y presentan una estructura reticulada. Cuando están en forma de polvo, las cadenas están altamente enrolladas y las partículas tienen un diámetro promedio de 5 a 15 micrones. Al entrar en contacto con el agua, la estructura comienza a desenrollarse y se hincha, aumentando su volumen en 1000 veces, lo que explica su propiedad inicial de espesamiento (Kim et al, 2003). Para neutralizar completamente este polímero en soluciones, es necesaria una reacción con una base, probablemente NaOH o trietanolamina (TEA), que convertirá el ácido en una sal debido a la repulsión electrostática (**Figura 4**).

Figura 4 Mecanismo de espesamiento del carbopol



Nota: Grafica tomada de Barbosa et al., 2021.

El polímero está muy enrollado en estado de polvo, pero la estructura entrecruzada comienza a desenrollarse cuando se dispersa en agua. La estructura extendida de la red de polímero se obtiene en presencia de una base, donde la reacción entre el polímero y la base conduce a la ionización a lo largo de la cadena del polímero. Las cargas negativas resultantes conducen a la repulsión electrostática y, por lo tanto, a la expansión de las cadenas de polímero a la estructura extendida.

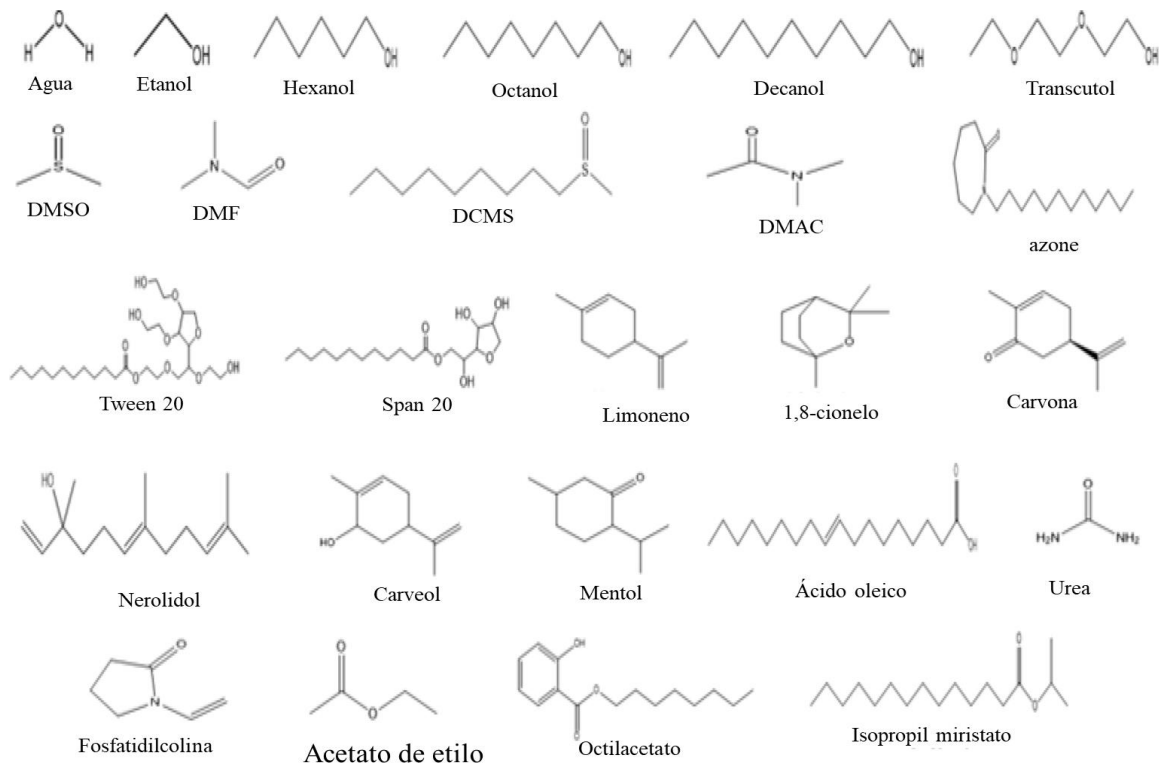
El tiempo para la estabilización del gel varía desde minutos para cantidades pequeñas hasta semanas para preparaciones a gran escala. Una característica es su valor de pH, que influye directamente en sus propiedades reológicas. Controlando el pH, se pueden manipular y mantener los parámetros deseados del fluido. Las diferencias en el pH tienen un impacto en las propiedades reológicas finales, evidenciado por las bajas tensiones de cizalla para las mismas deformaciones. Esto sugiere una alteración abrupta de las propiedades reológicas al alcanzar un pH neutro. Por lo tanto, mediante el control del proceso de neutralización a través de mediciones de pH, se pueden alcanzar las características deseadas del fluido (Barbosa et al., 2021).

1.1.4.5 Potenciadores de la permeación percutánea (PPP)

Los PPP son sustancias químicas utilizadas para incrementar la capacidad de los fármacos para atravesar barreras biológicas, como la piel o las membranas celulares (Hmingthansanga et al., 2022). Estos compuestos actúan disminuyendo la resistencia de la barrera cutánea al modificar la estructura de los lípidos y proteínas de la membrana o aumentando la solubilidad del fármaco, facilitando así su absorción y penetración a la dermis (**Figura 5**). Entre los sulfóxidos se encuentra el dimetilsulfóxido (DMSO) uno de los PPP más utilizado. Como solvente aprótico potente, incoloro, inodoro e higroscópico, el DMSO mejora la permeabilidad cutánea modificando la queratina intercelular. Estudios han demostrado que entre el 15–30% del DMSO aplicado tópicamente penetra la piel humana dentro de 2 horas, y que es metabolizado en el cuerpo. Sin embargo, altas concentraciones de DMSO pueden causar efectos secundarios indeseables como eritema, descamación, urticaria de contacto, y sensaciones de ardor (Brayton, 1986). Otros PPP utilizados son los alcoholes, como el etanol, que disuelven los lípidos del estrato córneo, aumentando la permeabilidad cutánea y facilitando la entrada de medicamentos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico, que aumentan la fluidez de los lípidos de la piel, lo que ayuda a la absorción

de los fármacos. Los terpenos, como el mentol, alteran los lípidos intercelulares del estrato córneo, optimizando la absorción de los fármacos. Las pirrolidonas, como la N-metil-2-pirrolidona, incrementan la solubilidad del fármaco y su absorción al alterar la matriz lipídica del SC. Finalmente, la urea es eficaz en aumentar el contenido de agua del estrato córneo, mejorando tanto la hidratación como la penetración de los fármacos a través de la piel (Williams et al., 2004; Hmingthansanga et al., 2022)

Figura 5 Estructuras químicas de PPP utilizados en formulaciones biomédicas



Nota: figura modificada de Hmingthansanga et al., 2022. Las estructuras químicas corresponden al agua, etanol, hexanol, octanol, decanol, transcutol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), decil metil sulfóxido (DCMS), dimetilacetamida (DMAC), azone,

Tween 20, Span 20, limoneno, 1,8-cineol, carveol, carvona, mentol, ácido oleico, urea, fosfatidilcolina, acetato de etilo, acetato de etilo, isopropil miristato, nerolidol.

Tratando de encontrar un tratamiento tópico, fácil de preparar, de bajo costo y efectivo que nos permitiera reformular de oral a tópico uno de los fármacos más importantes utilizados actualmente en LC como es la MTF el objetivo principal de este capítulo fue preparar el hidrogel de MTF conteniendo DMSO como PPP y realizar una caracterización fisicoquímica, estructural y funcional del hidrogel para el tratamiento tópico de la LC. Con esta formulación de aplicación tópica de MTF (fMTF) se espera superar las limitaciones presentes en los tratamientos actuales, que incluyen toxicidad, efectos secundarios adversos y dificultades en la administración de los medicamentos.

1.2 Metodología

El presente capítulo se diseñó, preparó y caracterizó fisicoquímica, estructural y funcionalmente hidrogeles de carbopol conteniendo MTF. La preparación y evaluación fue realizada en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP-UIS. La caracterización estructural fue realizada en el Laboratorio de Microscopia Electrónica (ME) y la caracterización reológica y distribución láser fue realizada en el Laboratorio de Espectroscopia (LE) del Parque Tecnológico Guatiguará de la UIS. El procesamiento histológico de la piel fue realizado en el Laboratorio del Departamento de Patología, Escuela de Medicina de la UIS. Todos los experimentos realizados fueron avalados por el Comité de Ética de la UIS. En la **Figura 6** se muestra el diseño metodológico desarrollado.

Figura 6 Diseño experimental realizado en el presente capítulo**1** Diseño y preparación**2** Caracterización**1.2.1 Materiales**

El ácido poliacrílico (Carbopol® 940), benzoato de sodio (C₆H₅COONa), trietanolamina (C₆H₁₅NO₃, TEA), y la cafeína se adquirieron en Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EE.UU). La MTF fue obtenida de Gold Biotechnology® (St Louis, MO, EE. UU) y el DMSO de Carlo Erba (Rodano, Italia).

1.2.2 Parásitos

Los promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/LV78) se mantuvieron en medio de insecto de Schneider con Suero bovino fetal inactivado con calor (FCS) al 10% a 28 °C.

1.2.3 Ratones y consideraciones éticas

Los ratones fueron suministrados por el Instituto Nacional de Salud de Colombia. Se alojaron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a 23 °C y $55 \pm 5\%$ de humedad relativa, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los ensayos fueron realizados con la aprobación del CEINCI de la UIS (Acta N.23 del 10 de diciembre 2019), y la Resolución 008430 de 1993 Título V, que refiere a la investigación biomédica con animales. Se tuvieron en cuenta aspectos como la pérdida de peso, cambios en el comportamiento y estrés, signos de dolor y los principios de las 3R: reemplazo, reducción y refinamiento.

1.2.4 Preparación de hidrogeles de carbopol

Se prepararon hidrogeles de carbopol al 0,5, 1 y 3% p/v en agua desionizada (sin MTF). Las muestras se llevaron a agitación mecánica ajustando el agitador a 100 rpm para dispersar el carbopol en el agua. Se adicionó 0,1% p/v de benzoato de sodio como preservante. Las dispersiones se dejaron en agitación durante 24 h para garantizar su completa dispersión. Finalmente, se agregó TEA 0,5 % p/v para neutralizar la formulación y se agitó manualmente por 1 h hasta homogenización. Para eliminar las burbujas las muestras fueron dejadas en reposo por 24 h. Las muestras se almacenaron en un frasco de vidrio tapado para evitar su desecación y humedad. Los diferentes hidrogeles se muestran en la **Tabla 3**.

Para los ensayos de liberación de compuestos, adicionalmente se prepararon hidrogeles conteniendo 0,5% MTF, 10% DMSO y 1% cafeína.

Tabla 2 Composición hidrogeles utilizados en el presente capítulo

Hidrogeles	Composición %(p/p)					
	Carbopol 940	C ₇ H ₅ NaO ₂	TEA	MTF	DMSO	Agua
0,5% carbopol	0,5	0,5	0,5	-	-	97,9
1% carbopol (vehículo)	1	0,5	0,5	-	-	97,4
3% carbopol	3	0,5	0,5	-	-	95,4
0,5% MTF-	1	0,5	0,5	0,5	-	96,9
10% DMSO-	1	0,5	0,5	0,5	10	86,9

Nota: Carbopol 940: polímero de ácido poliacrílico reticulado; C₇H₅NaO₂: benzoato de sodio; TEA: trietanolamina; MTF: miltefosina; DMSO: dimetilsulfóxido.

1.2.5 Caracterización fisicoquímica

1.2.5.1 Propiedades organolépticas

Las características de color y olor fueron registradas macroscópicamente. La consistencia aparente se determinó observando la fluidez definida como la habilidad de deformación que puede adquirir un fluido sin necesidad de ejercer una tensión mecánica y la resistencia definida como la capacidad de una dispersión coloidal para desarrollar y mantener una forma. Para ello, 10 g de los hidrogeles (**Tabla 3**) en un vaso de precipitado fueron sometidos a agitación constante por 1 min mediante una varilla de vidrio. Las formulaciones fueron clasificadas como: formulaciones semilíquidas

(semifluida y sin resistencia con agitación); semisólidas (consistencia media, resistencia moderada); y formulaciones semisólidas (consistencia y resistencia altas).

1.2.5.2 Medición pH

Se utilizó el método electroquímico utilizando un electrodo y un mili voltímetro. El pH se determinó directamente en los geles utilizando un pH metro digital (Ohaus Starter 3100, New Jersey, EE. UU.). Los valores menores, iguales o mayores de 7 fueron considerados ácidos, neutros y alcalinos, respectivamente. Los resultados de pH se expresaron la media \pm DS de tres experimentos independientes.

1.2.5.3 Caracterización reológica

Se determinó la viscosidad de los hidrogeles en un rango de velocidad de corte de 0,1–100 s⁻¹. Con este propósito se empleó un viscosímetro de platos paralelos (Viscotester iQ (HAAKE Viscotester iQ), un diámetro de plato de 40 mm y un espacio entre ellos de 150 μ m. El análisis se llevó a cabo a una temperatura de 25 y 40 °C la que fue controlada con un sistema Peltier actuando sobre el plato más bajo del reómetro. En adición, los parámetros reológicos, tales como el índice del comportamiento de flujo, el índice de consistencia, la viscosidad aparente y el límite de esfuerzo fueron establecidos según los modelos matemáticos de Herschel-Bulkley. Adicionalmente se realizaron ensayos viscoelásticos dinámicos de baja amplitud (*Small Amplitude Oscillation Tests*, SAOTs) en la región linear viscoelástica, con un método de barrido de frecuencia a 25 °C en un rango de 0,1–10 Hz. El viscosímetro HAAKE fue equipado con un sistema de platos paralelos con un diámetro de 25 mm, y un espacio entre los platos de 2000 μ m en el caso del hidrogel para realizar las pruebas y establecer el módulo elástico o de almacenamiento (G'), el módulo viscoso

o de pérdida (G''), el módulo complejo o dinámico (G^*). Los resultados son reportados como el comportamiento reológico como líquido ($G' < G''$) o sólido ($G' > G''$) de los hidrogeles.

1.2.6 Caracterización estructural

1.2.6.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los hidrogeles de 0,5% MTF y su vehículo (sin MTF) recién preparados o almacenados por 120 días a 4, 25 y 32 °C fueron secados en modo ambiental y se colocaron sobre *stubs* metálicos con cinta adhesiva de carbón y se recubrieron con oro. Las imágenes fueron tomadas en alto vacío, voltaje de aceleración de 15kV utilizando un microscopio electrónico de barrido FEG (*Field Emission Gun*) QUANTA FEG 650. Se utilizó el detector de electrones secundarios *Everhart Thornley Detector* ETD y de electrones retrodispersión *Back Scattered Electron Detector* (BSED) tipo detector estado sólido (SSD). El análisis semicuantitativo de los elementos químicos se realizó mediante espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDX) utilizando un detector EDAX APOLO X y el software EDX Genesis. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de los elementos químicos en la muestra.

1.2.6.2 Distribución de la MTF en el hidrogel mediante dispersión de luz dinámica

El tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta se midieron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y velocimetría láser electroforética utilizando un Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Se determinaron 24 h después de la preparación de los hidrogeles conteniendo 0,5% MTF, 1% carbopol y soluciones de MTF de 0,5 a 3 mg/mL. Las muestras fueron diluidas 1:1000 en agua tipo 1 y en 10% de DMSO. Los resultados se presentaron como la media \pm DE mediciones realizadas por triplicado a 25 ± 1 °C.

1.2.7 Caracterización funcional

1.2.7.1 Ensayo de liberación de la cafeína *in vitro*

Se realizó con el fin de determinar la capacidad del hidrogel de carbopol de liberar la cafeína. Se utilizaron celdas de difusión de Franz (PermeGear Inc., PA, EE. UU.) con un área de efectiva de difusión de $0,196 \text{ cm}^2$ y un compartimiento receptor de 3 mL conteniendo una solución de buffer fosfato (PBS) a pH 7,4, a $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ en constante agitación magnética. Se utilizó una membrana de celulosa de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius Stedim, GO, Germany) ubicada entre los compartimientos donador y receptor. A los hidrogeles (0,5%, 1% y 3% de carbopol) se les agregó una concentración de 1% p/v de cafeína (PM:194,2, LogP -0,07). Se colocaron 10 mg de los hidrogeles en la cámara donadora de la celda. La cantidad de cafeína liberada fue estudiada en los tiempos 0, 30, 60, 120, 180 y 240 min. tomando una alícuota de $300 \text{ }\mu\text{L}$ del compartimiento receptor, con la respectiva reposición de medio. La concentración final de cafeína se analizó mediante espectrofotometría UV-Vis a 272 nm (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) teniendo en cuenta una curva de calibración. Para ello se preparó una solución madre estándar de cafeína disolviendo 100 mg de cafeína en 100 ml de agua destilada y se hicieron diluciones 1:10 con agua destilada ($100 \text{ }\mu\text{g/ml}$). Se leyeron las soluciones estándar de 1 a $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de cafeína a 272 nm y se trazó la curva de calibración de concentración versus absorbancia. El coeficiente de correlación fue de 0,99 ($y = 0,0425x + 0,1343$) (Carreño y Escobar 2023). Los resultados fueron expresados como la media \pm DE de la cantidad acumulada de cafeína permeada a través la membrana de celulosa. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

1.2.7.2 Ensayo de permeación cutánea *ex vivo*

Se realizó con el fin de determinar el efecto de la MTF y el DMSO como PPP. La piel de ratón fue suministrada por la Unidad Experimental de Animales UEA-CINTROP. La piel dorsal de espesor total y el tejido subcutáneo se extrajo cuidadosamente, se lavó dos veces en PBS, pH 7,4 se cortó en pedazos, y se colocaron sobre las celdas de Franz con el lado estrato corneo mirando hacia el compartimiento del donante. Se utilizó la técnica de permeación descrita previamente utilizando la piel de ratón como membrana. Se colocaron 300 mg de los hidrogeles (0,5% MTF y 10% DMSO con 1% de cafeína) en el compartimiento donante y se sellaron con papel parafinado para evitar la evaporación. Se retiraron muestras de 300 μ L a las 0, 1, 2, 4, 6 y 24 h de la fase receptora y se reemplazaron con el mismo volumen de líquido receptor. La cantidad de cafeína se analizó espectrofotométricamente a 270 nm. La integridad de la membrana después del experimento se determinó histológicamente. Las membranas fijadas en formalina tamponada al 10% y se incluyeron en bloques de parafina. La cantidad acumulada de cafeína permeada a través de la piel se graficó en función del tiempo. Flux (J_{ss}) se calculó utilizando la ecuación $J_{ss} (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}) = \text{Cantidad acumulada de fármaco permeado}/\text{tiempo}$ según lo descrito en Carreño y Escobar 2023. El modelo de cafeína es utilizado como un compuesto modelo para estudios de permeación a través de la piel, pero no con la intención de aplicaciones terapéuticas transdérmicas o tópicas.

1.2.7.3 Actividad antileishmania *in vitro*.

Los promastigotes (2×10^6 parásitos/mL) fueron tratados por triplicado con 4–6 diluciones seriadas 1:3 de los hidrogeles (0,5% MTF y 10% DMSO) partiendo de 100 μ M de MTF, durante 72 h a 28 °C. Parásitos control fueron mantenidos en medio de cultivo. La viabilidad de los parásitos fue determinada por la técnica colorimétrica con resazurina (Sigma Aldrich), donde esta es reducida

a un color rosado cuando los parásitos son viables y oxidada a un color azul los parásitos no viables. Las absorbancias fueron determinadas en un lector de placas Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc, VT, USA) a 570 y 600 nm. Los porcentajes de reducción fueron calculados utilizando la siguiente formula (Bio-Rad, 2017): $\% \text{ de reducción} = \frac{\{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)\}}{\{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)\}} * 100$ O1: Coeficiente de extinción molar (E) de la resazurina oxidada (azul) a 570 nm; O2: E de la resazurina oxidada a 600 nm; R1 E resazurina del reducido (rosado) a 570 nm; A2: Absorbancia de los pozos tratados a 600 nm; N1: absorbancia de los controles negativos a 570 nm; N2: absorbancia de los controles negativos a 600 nm. Los porcentajes de inhibición fueron determinados a partir de la siguiente formula: $\% \text{ de inhibición} = [1 - (\% \text{ reducción en células tratadas} / \% \text{ reducción del control positivo})] * 100$. Los resultados fueron expresados como la concentración del hidrogel capaz de inhibir el 50% y el 90% de los parásitos (CI₅₀, CI₉₀) calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxlfittm (ID Business Solution,UK).

1.2.7.4 Ensayo de irritación/corrosión en piel de ratón.

La capacidad irritante de los hidrogeles (1% carbopol, 0,5% MTF y 10% DMSO) se realizó siguiendo las directrices de la OECD (Protocolo No 404) utilizando ratones BALB/c ($n = 1$). Brevemente, se realizó tricotomía del área dorsal y 24 h después, se aplicaron 50 mg de los hidrogeles sobre el área afeitada. Se utilizó un sitio separado, no tratado, como control. El tratamiento se realizó una vez al día durante 14 días. Los signos de edema o eritema en el lugar de la aplicación después de 4, 24 y 72 h y después de 9 y 14 días después del tratamiento se registraron y puntuaron de 0 (sin irritación) a 4 (irritación severa).

1.2.8 Estabilidad de los hidrogeles a diferentes temperaturas

Los hidrogeles (0,5% MTF y 10% DMSO) fueron conservados en recipientes de vidrios y sellados con *parafilm* a 4, 25 y 32 °C hasta por 11 meses. Se realizaron ensayos de inspección visual, medición de pH y consistencia, SEM, actividad anti-*Leishmania* como se describieron anteriormente.

1.2.9 Análisis de resultados

En los ensayos de liberación *in vitro* y permeación *ex vivo* se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.), se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para analizar cada experimento, junto con comparaciones post hoc (prueba de Tukey). Se realizaron comparaciones entre los hidrogeles (0,5, 1, 3% de carbopol, 0,5% MTF y 10% DMSO) que contenían 1% de cafeína. Un resultado se consideró significativo cuando p era inferior a 0,05. Los datos se presentaron como medias \pm DE. Para el análisis antileishmania en promastigotes determinó la CE_{50} y CE_{90} calculadas por regresión sigmoideal utilizando el software Mxslfit™.

1.3 Resultados

1.3.1 Caracterización fisicoquímica, comportamiento reológico y estabilidad de los hidrogeles

Los hidrogeles fueron transparentes e incoloros, homogéneos sin separación de fases, con un pH entre $5,38 \pm 0,1$ y $7,64 \pm 0,2$. La consistencia aparente fue de semilíquida en el gel de 0,5% carbopol y semisólidas en los geles de 1% y 3% carbopol, 0,5% MTF y 10% DMSO- (**Tabla 3**).

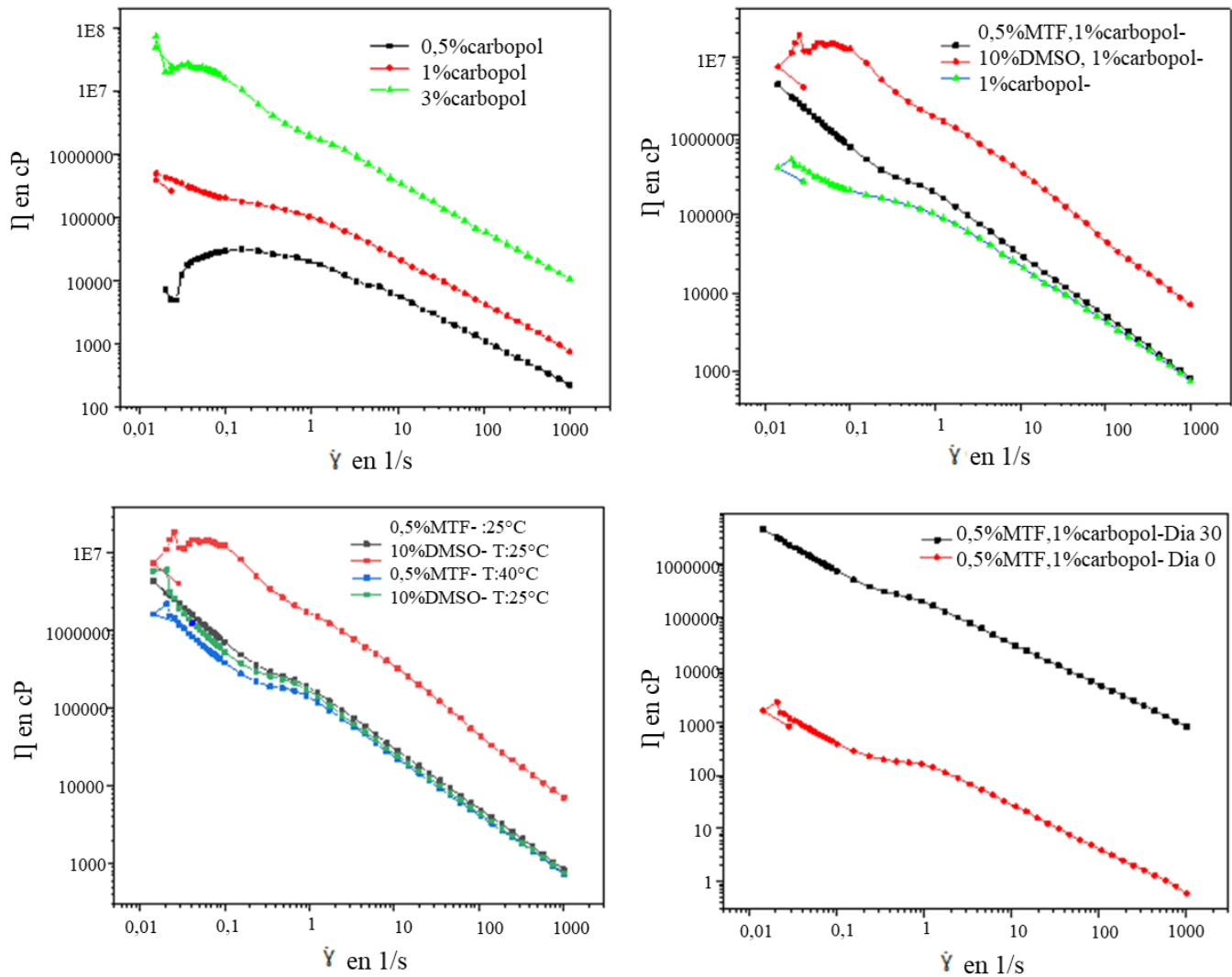
Las características fisicoquímicas de los hidrogeles se mantuvieron estables durante al menos 8 meses. El color y la consistencia de los hidrogeles se mantuvieron a 4, 25 y 32 °C por 11 meses, sin mostrar deshidratación al ser almacenadas a estas temperaturas.

Sobre la viscosidad y el comportamiento viscoelasticidad mostró ser mayor en el hidrogel de 3% carbopol > 1% carbopol > 0,5% carbopol, lo que se puede atribuir a la mayor proporción de enlaces de hidrógeno y el grado de entrecruzamiento de la red reticulada en cada uno de los casos (**Figura 7a**). Al evaluar los hidrogeles de 0,5% MTF y 10% DMSO, se observó un rango de viscosidades de 10% DMSO > 0,5% MTF = 1% carbopol a 25 y 40 °C, indicando que la temperatura no altera esta característica reológica (**Figura 7b-c**). Adicionalmente se encontró que todos los hidrogeles preparados mostraron un fenómeno de pseudoplasticidad, en el que la viscosidad disminuye progresivamente a medida que hay un incremento en la velocidad de corte (rapidez que se aplica una fuerza de deformación). La viscosidad en el gel de 0,5% MTF aumentó al mes de preparación (**Figura 7d**).

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas/organolépticas y parámetros reológicos de los hidrogeles investigados

Formulación	Propiedades fisicoquímicas/ organoléptica				Parámetros reológicos (viscosidad/viscoelasticidad)						
	color	olor	pH	CA	°C	K	n	Tc	r ²	G'G''	G* (Pas)
0,5% carbopol			7,64± 0,20	Semi líquida	25	36,5	0,26	10,46	0,99		88,06
1% carbopol (vehículo)			6,34 ± 0,14		25	48,35	0,45	83,37	0,99		207,5
3% carbopol	Inco loro	Ino loro	5,38 ± 0,10	Semi	25	308,6	0,20	99,06	0,99	G' > G''	207,7
0,5% MTF-			7,56 ± 0,05	sólida	25	145,6	0,25	46,75	0,99		131,0
					40	226,5	0,18	97,88	0,99		156,2
10% DMSO-			6,96 ± 0,14		25	115,9	0,26	74,03	0,99		180,1
					40	56,06	0,39	125,7	0,99		190,0

Nota: CA, Consistencia aparente; T °C, grados Celsius; K, índice de consistencia; n, índice de fluidez; Tc, límite de esfuerzo; r, coeficiente de correlación. G': módulo de almacenamiento elástico; G'': módulo de pérdida (viscoso); G*: modulo complejo

Figura 7 Perfil de viscosidad de hidrogeles

Nota: (a) 0,5%, 1% y 3% carbopol- (b) 0,5% MTF- y 10% DMSO- y 1% carbopol- y (c) hidrogeles 0,5% MTF, 10% DMSO- y 1% carbopol- a 25 °C y 40 °C y (d) 0,5% MTF- recién preparados y almacenado por 30 días. Las gráficas muestran la viscosidad (η en cP) de los hidrogeles cambia en respuesta a diferentes velocidades de corte ($\dot{\gamma}$).

En cuanto al comportamiento de flujo de los geles fue determinado a partir del modelo matemático Herschel-Bulkley para analizar formulaciones semisólidas (Singh et al., 2014), se observó que la

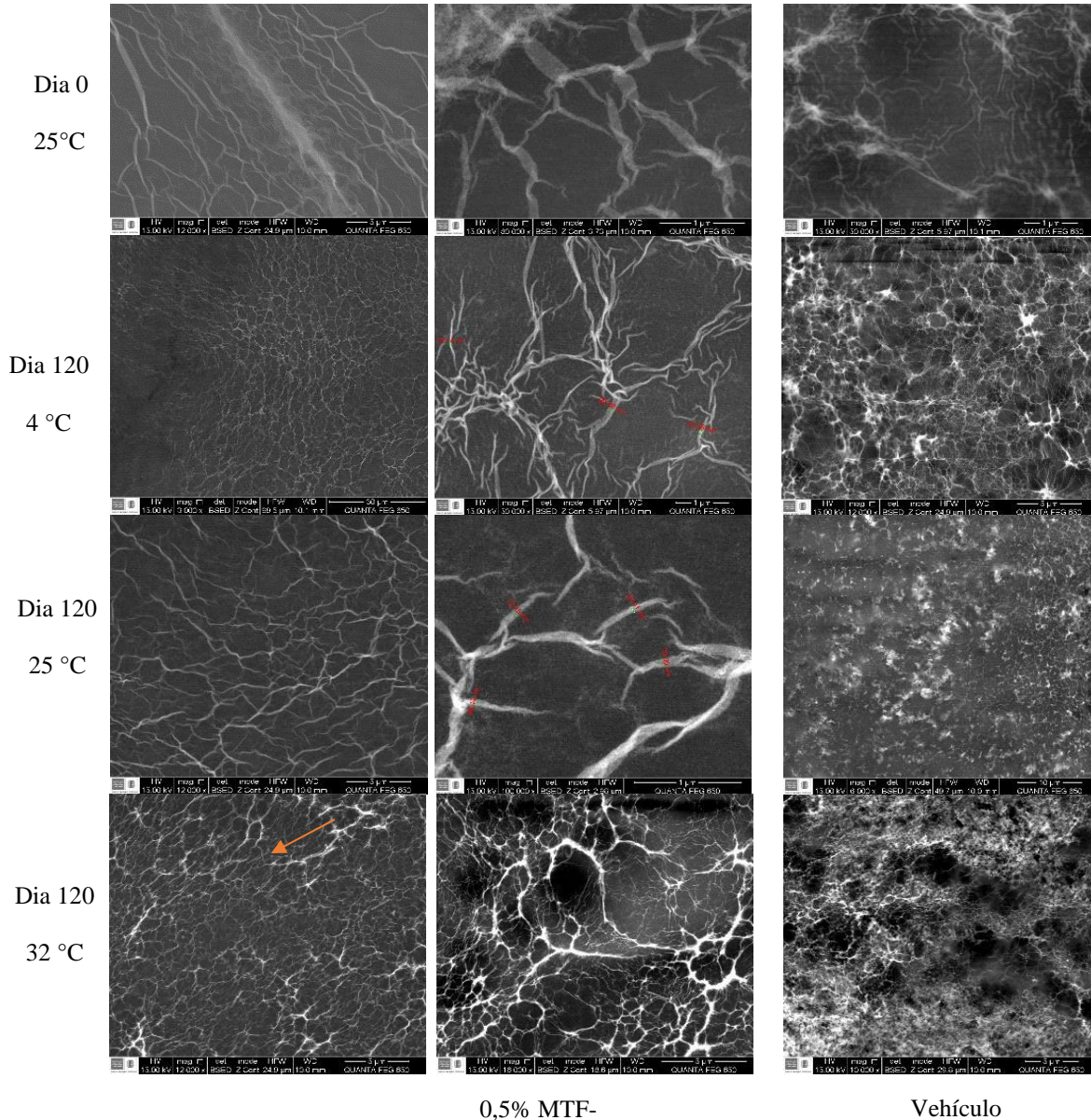
consistencia (K) de los hidrogeles fue mayor en el orden 3% carbopol > 0,5% MTF > 10% DMSO > 1% carbopol > 0,5% carbopol. La fluidez (n) de los hidrogeles fue mayor en orden a 1% carbopol > 0,5% carbopol > 10% DMSO > 0,5% MTF > 3% carbopol- y el límite de esfuerzo (τ_c) disminuye en el orden 0,5% carbopol < 0,5% MTF < 10% DMSO < 1% carbopol < 3% carbopol a 25 °C lo que explica la fuerza o carácter viscosos de cada una de las formulaciones. La temperatura de 40 °C no afectó este comportamiento en los hidrogeles. Para el estudio de la viscoelasticidad se tuvieron en cuenta el comportamiento del módulo elástico (G') y viscoso (G''), donde se evidenció en todos los hidrogeles predominó de comportamiento “similar a un sólido” lo que predice una mejor estabilidad durante el almacenamiento $G' > G''$. En cuanto al módulo complejo (G^*) se observó una resistencia mecánica 3% carbopol = 1% carbopol > 10% DMSO > 0,5% MTF > 0,5% carbopol (**Tabla 4**).

1.3.2 Caracterización estructural: análisis de la morfología y estabilidad de hidrogeles a través de SEM

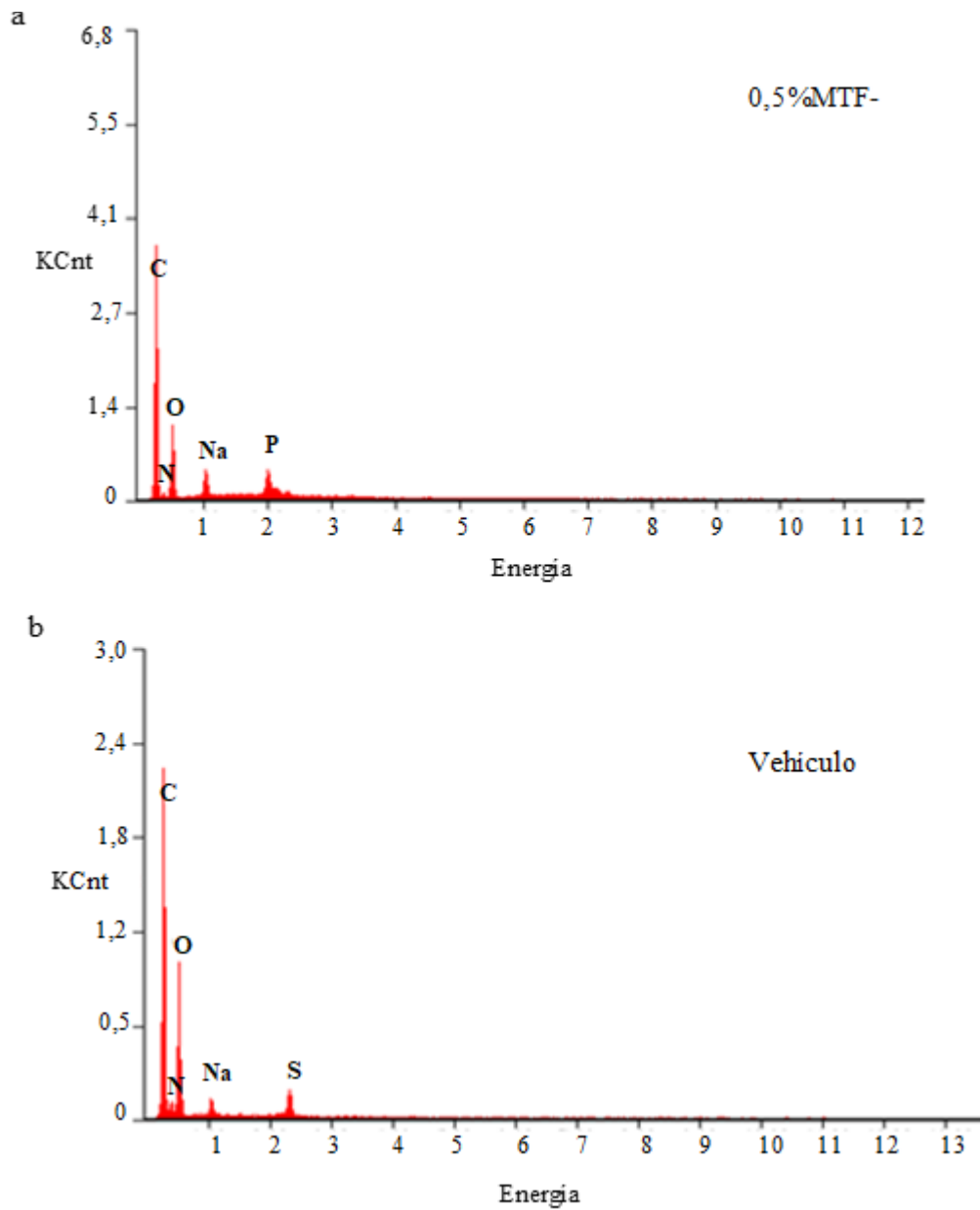
Las imágenes obtenidas (**Figura 8**) revelan detalles sobre las morfologías de los hidrogeles compuestos por 0,5% MTF y el vehículo 1%-carbopol, tanto en sus estados recién preparados como después de ser almacenados durante 120 días a diversas temperaturas (4, 25 y 32 °C). Los hidrogeles de 0,5% MTF y su vehículo exhibieron una morfología porosa homogénea, caracterizada por una distribución irregular a escala micrométrica. Esta estructura porosa es fundamental para aplicaciones como la administración controlada de fármacos, donde la porosidad puede influir en la liberación de fármacos. Además, se observó una gran cantidad de estructuras filamentosas, tanto paralelas como reticuladas, formando puntos de conexión entre ellas (**Figura 8a-b**). Estas estructuras filamentosas son indicativas de una red polimérica bien formada, esencial

para la estabilidad y la funcionalidad del hidrogel. El hidrogel de 0,5% MTF almacenado a temperaturas de 4 y 25 °C mostró filamentos con un grosor que variaba entre 29,14 y 99,8 nm (señalado en las **figuras 8 c y e**), manteniendo características similares a las del hidrogel de 0,5% MTF recién preparado. Esto sugiere una estabilidad estructural notable del hidrogel bajo estas condiciones de almacenamiento. Por otro lado, el hidrogel de 0,5% MTF almacenado a 32 °C mostró una condensación notable de su red reticulada, posiblemente debido a la pérdida de agua (**Figura 8g**). Este cambio en la estructura podría afectar las propiedades mecánicas y de hinchamiento del hidrogel, lo que es relevante para su desempeño en aplicaciones tópicas. En contraste, los hidrogeles vehículos presentaron redes reticulares que formaban poros más condensados con una distribución más heterogénea (**Figura 8 d, f y h**), diferenciándose significativamente de la estructura observada en el gel de MTF. Estas diferencias en la morfología podrían traducirse en variaciones en la capacidad de carga y liberación de fármacos, así como en la respuesta a estímulos externos como la temperatura de almacenamiento y el pH.

La composición elemental (% masa) de los hidrogeles de 0,5% MTF y el vehículo (1% de carbopol) fue de: carbono 58,01 y 50,58 %, nitrógeno 6,07 y 9,93%, oxígeno 26,41 y 34,09 %, sodio 4,70 y 2,03%, fósforo 4,80 y 0,0% y azufre 0,0 vs 3,36%, respectivamente (**Figura 9**). La presencia de fósforo del hidrogel de 0,5% MTF, corresponde al grupo fosfato de la MTF. El azufre detectado en el vehículo no corresponde a ningún excipiente utilizado en las preparaciones de los hidrogeles, lo que nos indica posiblemente alguna traza contaminante en el procesamiento de la muestra al momento del montaje en el SEM.

Figura 8 Microscopia electrónica de barrido

Nota: La figura muestra las imágenes obtenidas del SEM de hidrogel de 0,5% MTF y del vehículo recién preparados (día 0) a temperatura ambiente (aumentos: 12000x, 80000x y 30000x) (a-b). hidrogel almacenados a 4 °C (aumentos: 12000x, 50000x y 12000x) (c-d). almacenados a 25 °C (aumentos: 3000x, 100000x y 6000x) (e-f) y a 32 °C (aumentos: 3000x, 16000x y 3000x) por 120 días (g-h).

Figura 9 Espectrometría de energía de dispersión de rayos X (EDS)

Nota: las gráficas muestran los elementos químicos detectados del 0,5%MTF- (a) y el vehículo

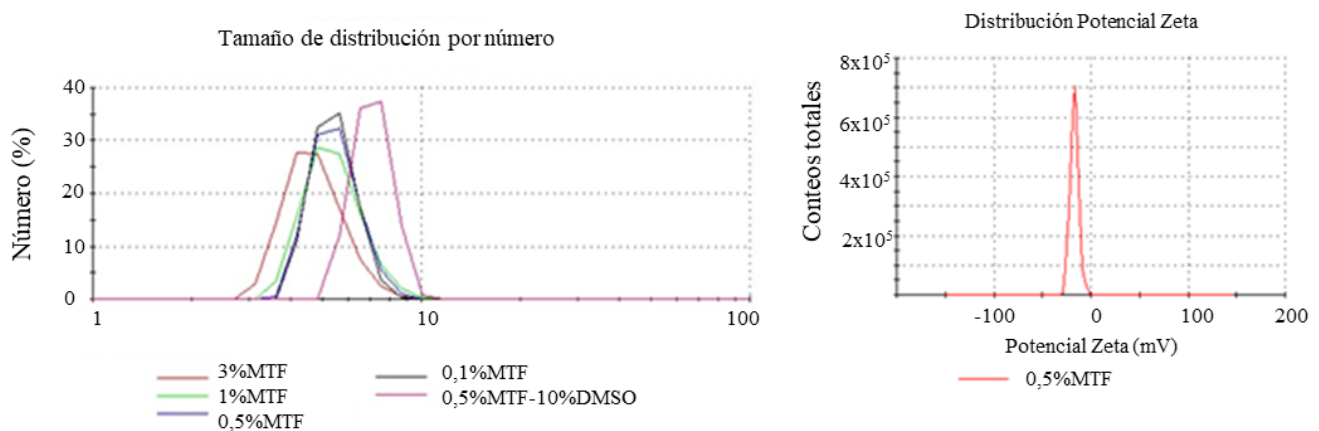
(b). C: carbono, N: nitrógeno, O: oxígeno, Na: sodio, P: fósforo; S: azufre.

1.3.3 Caracterización de micelas de MTF en medios acuosos y su interacción con DMSO y el carbopol: análisis de tamaño, PDI y potencial zeta

Se determinó la distribución de MTF mediante espectroscopía de dispersión de luz dinámica (DLS). Debido a sus características anfifílicas, la MTF puede autoorganizarse en micelas en soluciones acuosas. La concentración más baja de MTF analizada fue 2454 μM , que corresponde a 1 mg/mL. El tamaño medio de las micelas fue de $6,21 \pm 0,4$ nm (ver **Figura 10a**), con un PDI de $0,282 \pm 0,03$. Sin embargo, este PDI aumentó en la solución de agua con 10% de DMSO (PDI: 1), lo que sugiere que el DMSO dispersa las moléculas de MTF, resultando en micelas más heterogéneas. En el hidrogel de MTF al 0,5%, no se pudieron observar micelas debido a la interferencia del ácido poliacrílico (carbopol), que presentó un PDI de $0,728 \pm 0,3$.

El potencial zeta de la solución de MTF al 0,5% fue de $-17,2 \pm 4,35$ mV (**Figura 10b**). Para el hidrogel con 1% de carbopol (vehículo) fue de $-53,5 \pm 3,8$ mV, mientras que para el hidrogel con 0,5% de MTF fue de $0,31 \pm 0,08$ mV.

Figura 10 Curvas DLS de MTF soluciones (agua tipo I y DMSO).

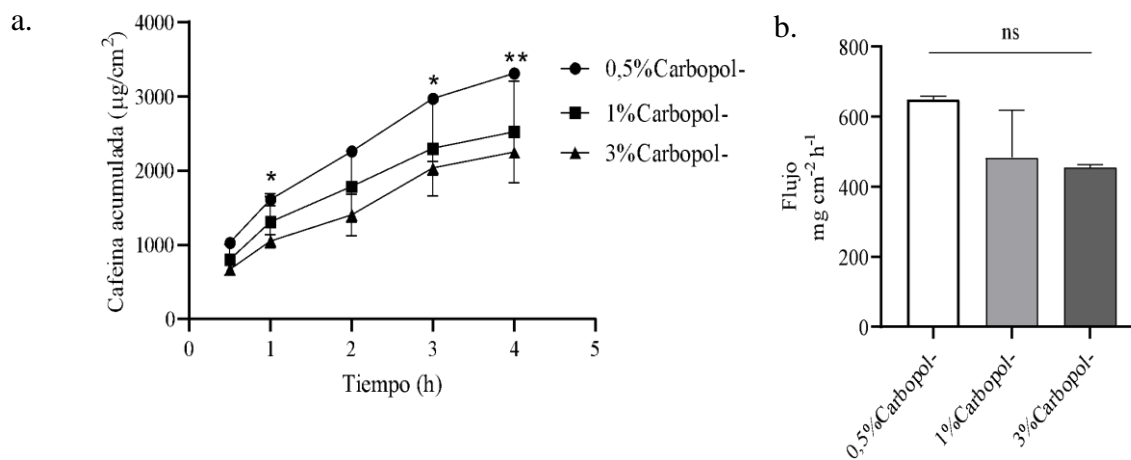


Nota: (a). La gráfica muestra el tamaño de partículas (micelas) y (b). potencial zeta de las partículas formadas de MTF en medio acuoso.

1.3.4 Evaluación de hidrogeles de Carbopol 940 como sistemas de liberación de fármacos.

La **figura 11** muestra que la concentración carbopol influye en la liberación de la cafeína mostrando que la concentración de cafeína contenida en 0,5% carbopol- fue de $1029,9 \pm 59,5$, $1610,9 \pm 80,4$, $2263,1 \pm 15,5$, $2970,6 \pm 24,2$ y $3310,2 \pm 41,3 \mu\text{g cm}^{-2}$, del 1% carbopol- fue de $802,9 \pm 207,4$, $1307,3 \pm 343,0$, $1784,6 \pm 479,6$, $2296,78 \pm 635,4$ y $2523,8 \pm 682,9 \mu\text{g cm}^{-2}$ y la de 3% fue de $670,95 \pm 67,6$, $1052,99 \pm 89,2$, $1402,53 \pm 280,23$, $2033,81 \pm 91,6$ y $2248,07 \pm 41,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ en los tiempos 30, 60, 120, 180 y 240 min ,demostrando que a mayor concentración del carbopol, menor es la capacidad de liberar compuestos. Adicionalmente, el flujo de la cafeína fue de $648,4 \pm 10,3$, $483,3 \pm 135,6$ y $454,8 \pm 8,9 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Figura 11 Perfiles de liberación y flujo de cafeína de hidrogeles de diferentes concentraciones de Carbopol 940



Nota: (a) La gráfica representa la concentración de cafeína ($\mu\text{g/cm}^2$) que atravesó la membrana de celulosa en el tiempo en horas (h). Hay tres series de datos que corresponden a diferentes concentraciones de carbopol: 0,5%, 1% y 3%. La serie del 0,5% carbopol- se representa con círculos, la serie del 1% carbopol se representa con cuadrados y la serie del 3% carbopol se representa con triángulos. Cada punto en el gráfico representa la medición de la cantidad de cafeína

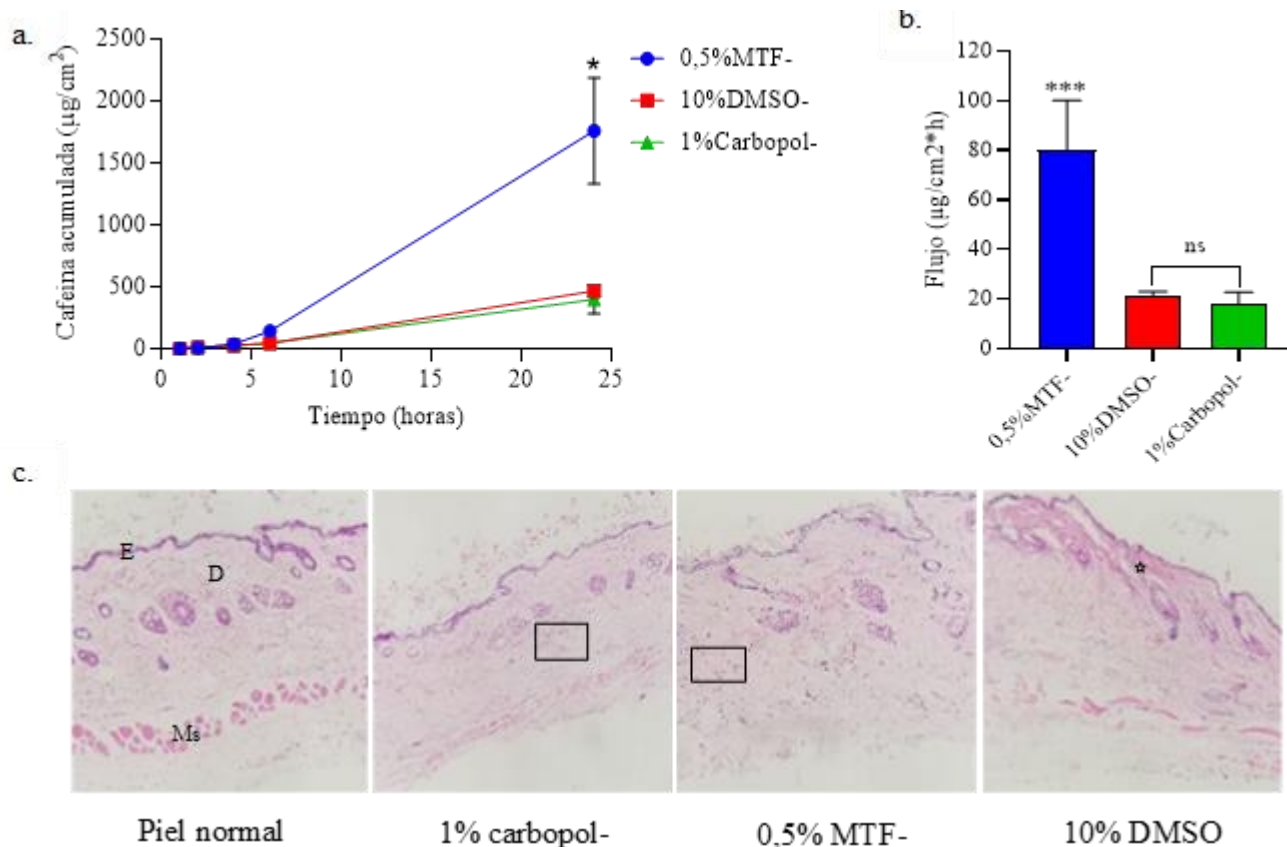
liberada en un tiempo específico. (b). Los valores de flujo de cafeína en estado estacionario (J_{ss}). Se realizó la prueba ANOVA de una sola vía. Los datos se muestran como medias \pm DS, $n = 6$. Diferencias estadísticamente significativas * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$. Ns: no diferencias significativas.

1.3.5 MTF como potenciador de la permeación

La cantidad acumulada ($\mu\text{g cm}^{-2}$) de cafeína que permea la piel durante todo el estudio (0–24 h) sin MTF o DMSO fue de $483,32 \mu\text{g cm}^{-2}$, con un flujo en estado estacionario (J_{SS}) de $17,67 \pm 5,1 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. El efecto de 0,5% MTF- y 10% DMSO- sobre la cantidad acumulada de cafeína que penetra a través de la piel se muestran en la **Figura 12 a-b**. El hidrogel de 0,5% aumento significativamente ($p = 0,0002$) los valores de J_{ss} con un índice de mejora de 4,5. El hidrogel 10% DMSO no mostró cambios en la permeación de cafeína con respecto a los resultados obtenidos con el hidrogel de 0,5% MTF. En el estudio histopatológico, las imágenes de piel antes y después del ensayo se muestran en la **Figura 12c**. En la piel normal, se observa una epidermis delgada sin alteraciones y en la dermis se observa celularidad y tejido conectivo normal, sin embargo, las imágenes histológicas de la piel tratada con DMSO hidrogel muestran desprendimiento de la epidermis y la dermis con fibrosis y acelular, lo que indica que se presentó un efecto tóxico en esta membrana. En cuanto al 0,5% MTF-hidrogel y vehículo se observa celularidad similar a la piel normal, lo que indica que no presentó efectos tóxicos durante las 24 h de tratamiento. En la

epidermis se alcanza a observar una película grisácea la cual posiblemente corresponde a la capa producida por los hidrogeles en la superficie de la piel.

Figura 12 Permeación de cafeína a través de la piel de ratón a las 24 h vehiculizada en 0,5 MTF-, 10% DMSO- y 1% carbopol-



Nota: (a) Cantidad de cafeína acumulada, (b) los valores de flujo en estado estacionario. Los resultados obtenidos con el 0,5% MTF- se muestran de color azul, con el 10% DMSO- de color rojo y el 1% carbopol de color verde. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar ($n = 6$). Se realizó la prueba ANOVA de una sola vía, los valores $p = < 0,05$ fueron estadísticamente significativos y (c) se observan imágenes representativas las pieles pre y post ensayos de permeación (aumentos: 400x), en la piel tratada con el vehículo y 0,5% MTF hidrogel se observa

celularidad en la dermis (recuadro) y restos del hidrogel en la de la epidermis (flecha), en la piel tratada con 10% DMSO, se observa desprendimiento en la epidermis-dermis (asterisco) y fibrosis (estrella) en la dermis. E: epidermis; D: dermis; Ms: músculo.

1.3.6 Actividad antileishmania

El hidrogel de 0,5% MTF fue activo contra la especie de *L. amazonensis* evaluada. Los promastigotes mostraron valores de CI_{50} de $10,14 \pm 0,4 \mu\text{M}$ y CI_{90} de $12,30 \pm 0,81$ de MTF (concentración final) contenidos en la formulación. La MTF en solución, utilizada como fármaco control *in vitro*, fue activa con de CI_{50} de $6,31 \pm 3,4$ y CI_{90} de $13,18 \pm 3,2$. El hidrogel sin MTF (vehículo) no tuvo actividad antileishmania (**Tabla 5**).

Tabla 4 Actividad anti-*Leishmania* de 0,5%MTF- y MTF en solución (PBS) en promastigotes de *L. amazonensis* almacenada en diferentes tiempos y temperaturas

Temperatura almacenamiento	Tiempo de preparación (meses)									
	0		1		3		6-8		11	
	CI ₅₀ ±DS	CI ₉₀ ±DS	CI ₅₀ ±DS	CI ₉₀ ±DS	CI ₅₀ ±DS	CI ₉₀ ±DS	CI ₅₀ ±DS	CI ₉₀ ±DS	CI ₅₀ ±DS	CI ₉₀ ±DS
Hidrogel de 0,5%MTF equivale a 1226 µM de MTF										
4 °C			6,16±0,34	10,95	10,54±0,	>100	6,02±0,8	9,78±0,5	9,76±3,6	19,28±7,
					2			6	1	4
25 °C	10,14±0,		15,47±10,	31,51±1,8	10,50±0,	>100	ND	ND	9,19±3,9	ND
	4	12,30±0,8	3		3					
32 °C			6,65±2,68	9,48±1,1	8,94±1,8	11,76±1,	ND	ND	ND	ND
						2				
Vehículo (hidrogel sin MTF)										
4 °C			>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
25 °C	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND

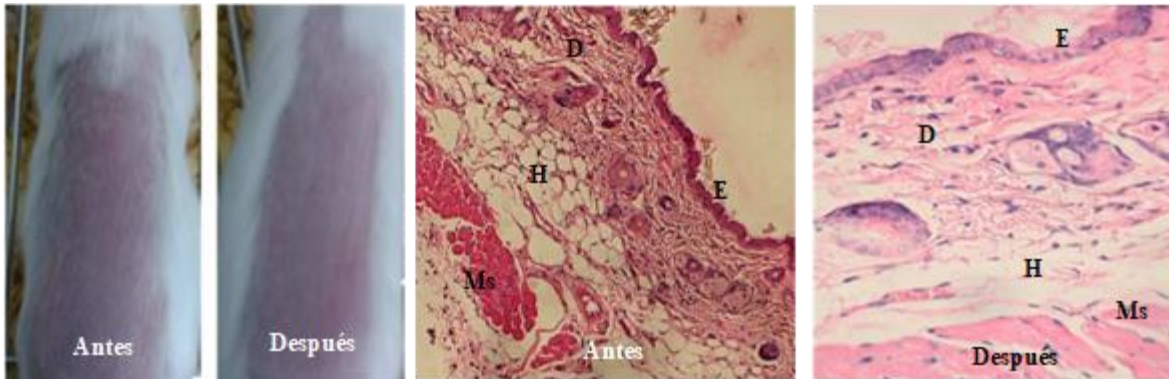
32 °C			>100	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
<hr/>										
MTF solución (µM)										
<hr/>										
						15,71±0,	10,18±0,	11,34±0,		
4 °C			0,53±0,01	5,24±0,2	1,61±0,0	8	1	1	ND	ND
				11,428±1,				11,65±0,		
28 °C			0,71±0,13	2	2,54	29,2±3,9	9,82±0,1	3	ND	ND
	6,31±3,4	13,18±3,2								
			0,738±0,1			19,07±1,		11,10±0,		
32 °C			3	6,35±1,2	2,21±0,2	7	9,57±0,1	0	ND	ND
								11,07±0,		
37 °C			1,12±0,07	4,64±0,6	3,36±0,1	13,9±0,1	9,33±0,0	0	ND	ND

Nota: Los valores que se muestran en la tabla corresponden a la concentración µM de MTF contenida en el 0,5% MTF-. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de tres experimentos (n = 3). *Diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$. CI_{50} y 90 : concentración inhibitoria 50 y 90 ; DE: desviación estándar; ND: no determinado.

1.3.7 Evaluación de la seguridad cutánea (irritación) de hidrogeles

Ninguno de los animales sanos mostró signos evidentes de irritación cutánea (eritema o edema) en el lugar de la aplicación del 0,5% MTF-hidrogel, DMSO hidrogel y 1% carbopol hidrogel durante 14 días de tratamiento en piel sana (**Figura 13**). No hubo cambios histológicos en la piel tratada.

Figura 13 Irritación en ratones BALB/c.



Nota: Características macroscópicas y microscópicas (aumentos: 100x y 400 x) de la piel tratada con múltiples dosis (14 dosis) de 0,5% MTF-Hidrogel. No se observó signos de irritación (edema y eritema), ni alteraciones histopatológicas en las capas de la piel examinadas. E: Epidermis; D: Dermis; H: Hipodermis; Ms: tejido muscular.

1.4 Discusión

La presente discusión se enfoca en el análisis integral de los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre hidrogeles, destacando sus propiedades fisicoquímicas, reológicas, estructurales y su potencial en aplicaciones biomédicas. Los hidrogeles, conocidos por su capacidad para retener agua y sus diversas aplicaciones en el campo de la liberación controlada de fármacos, han sido caracterizados bajo diferentes condiciones de temperatura y concentraciones del polímero gelificante Carbopol®. Mediante técnicas avanzadas como la SEM y la EDS, hemos explorado su morfología y composición elemental. Además, se ha evaluado su funcionalidad como sistemas de liberación de fármacos, específicamente utilizando la cafeína como modelo, y se han estudiado sus efectos sobre la permeación en piel de ratón, así como su actividad antileishmania.

Los hidrogeles (0,5% car-, 1% car-, 3% car-, 0,5% MTF- y 10% DMSO-) resultaron ser translúcidos y homogéneos, sin separación de fases ni formación de precipitados. Presentaron un pH variable entre 5,38 y 7,56, siendo el hidrogel de 3% carbopol el más ácido y el de 0,5% carbopol el más alcalino. Esta variación se atribuye a la concentración del ácido acrílico (carbopol) en su composición. Por otro lado, el gel de 1% carbopol y 10% DMSO mostró un pH ligeramente ácido, mientras que el gel de 0,5% MTF elevó el pH, indicando así que la MTF afecta el pH del hidrogel. Otros estudios que examinan el efecto del carbopol en formulaciones tópicas han evaluado su impacto dependiendo de la concentración, encontrando variaciones en el pH (1% p/v = pH: 5,01; 1,5% p/v = pH: 4,56; 2% p/v = pH: 3,76) (Çağlar et al., 2023). Otro estudio, muestran geles de 0,5% MTF como los geles vehículo fueron transparentes, homogéneos y sin color, con un pH de $5,91 \pm 0,05$ y $5,41 \pm 0,02$, respectivamente (Neira et al., 2019). Cabe destacar que el pH natural de la piel en adultos humanos oscila entre 4,1 y 5,8. Las formulaciones dentro de este rango de pH se consideran compatibles con la piel (Lukić et al., 2021).

En cuanto a la estabilidad, nuestros hidrogeles mantuvieron sus características fisicoquímicas y funcionales, incluyendo la actividad antileishmania, hasta por 11 meses. Se han realizado estudios sobre la estabilidad acelerada de hidrogeles bajo un estricto control de temperatura ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa ($75\% \pm 5\%$), enfocándose en hidrogeles de 1% de carbopol durante seis meses. Estos estudios arrojaron resultados muy favorables respecto a la estabilidad de sus propiedades físicas (color, homogeneidad, consistencia), manteniendo un pH constante (entre 5,01 y 5,02) y una distribución uniforme del contenido del fármaco, incluso bajo condiciones de estrés (Qindeel et al., 2019). Tales investigaciones son cruciales para validar la eficacia y viabilidad a largo plazo del hidrogel en diversos entornos.

El comportamiento reológico de todos los hidrogeles preparados en nuestro estudio demostró un fenómeno de pseudoplasticidad, caracterizado por una disminución progresiva en la viscosidad del hidrogel (**Figura 7**) al aplicar una fuerza de cizalla o estrés. Este comportamiento pseudoplástico se debe al rompimiento progresivo de los enlaces de hidrógeno por la fuerza de corte aplicada sobre los hidrogeles, lo cual facilita su fluidez (Corredor-Chaparro et al., 2022). Desde la perspectiva de la aplicación práctica en el desarrollo de medicamentos, este fenómeno resulta favorable para la liberación eficiente de fármacos, ya que facilita la formación de una capa delgada de la formulación sobre la superficie de la piel, mejorando así su penetración (Behera et al., 2015). Además, todos nuestros hidrogeles exhibieron un comportamiento mecánico de gel débil, con un módulo G^* que oscila entre 10 y 1000 Pa·s. Estos valores son similares a los reportados en hidrogeles a base de pectina, que presentaban valores bajos en comparación con otras formulaciones semisólidas como organogeles o bigeles, cuyos valores de módulo G^* superan los 1000 Pa·s (Lupi et al., 2016). En relación con la propiedad de viscoelasticidad de los hidrogeles, se estudió el módulo complejo G^* , que desempeña un papel crucial en su reología, proporcionando

una medida integral de la elasticidad y la viscosidad del material. Este módulo resulta de la combinación de dos componentes fundamentales: el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''). El módulo G' refleja la capacidad del hidrogel para comportarse como un sólido elástico, capaz de almacenar energía al deformarse. Un valor elevado de G' indica una red interna robusta en el hidrogel, permitiéndole recuperar su forma original tras una deformación (Corredor-Chaparro et al., 2022). Por otro lado, el módulo G'' muestra la tendencia del material a comportarse más como un líquido viscoso, disipando energía en forma de calor bajo deformación. Un valor alto de G'' en un hidrogel implica una mayor resistencia al flujo o al movimiento interno de sus moléculas (Marapureddy et al., 2020). La combinación de estos dos componentes hace que el módulo G^* sea un indicador de las características mecánicas generales de un hidrogel, reflejando su capacidad para resistir deformaciones y su fluidez bajo diferentes tipos de esfuerzos aplicados. El uso de la SEM ha permitido avances en la comprensión de la morfología de los hidrogeles (Ramirez et al., 2016). En nuestro estudio, el análisis mediante SEM de hidrogeles de 0,5% MTF y su vehículo de 1% carbopol tras 120 días a diversas temperaturas mostró una estructura porosa uniforme, esencial para la liberación controlada de fármacos. La estructura se preservó a 4 y 25 °C, pero a 32 °C se evidenciaron alteraciones posiblemente por deshidratación, afectando sus propiedades físicas. Otro estudio, realizó la comparación sobre morfología de hidrogeles de poli(N-isopropilacrilamida) encontrando que, debido a su estructura (textura superficial y porosidad), influyeron en el comportamiento de hinchamiento/deshinchamiento (Zhao et al. 2015). Por otro lado, en otro estudio utilizaron SEM para estudiar la morfología superficial de hidrogeles de poli (acrilamida-co-ácido itacónico) en presencia de iones Ca^{2+} , observando cambios morfológicos debido a la interacción de los iones Ca^{2+} con los grupos ionizados de la estructura del hidrogel, lo que conlleva a la reducción del tamaño de los poros y la presencia de poros

interconectados (Ramírez et al. 2016). Estas características son cruciales en aplicaciones biomédicas y en la liberación controlada de fármacos, donde la porosidad puede ser ajustada para mejorar/disminuir la liberación de fármacos. Otro estudio, reportó un aumento en el tamaño de poro (210 nm-1,4 μm hasta 6,9 μm) al incorporar un monómero biodegradable como el ácido itacónico, destacando la versatilidad de estos materiales en aplicaciones farmacéuticas (Gáscue et al., 2012).

La técnica de SEM combinada con la dispersión de energía de rayos X (EDX) permite la identificación de elementos específicos absorbidos/adheridos en el hidrogel. En nuestro caso, El análisis de la composición elemental de los hidrogeles de 0,5% MTF y su vehículo de 1% carbopol mostró diferencias significativas en sus componentes, destacando la presencia de fosforo en el hidrogel de MTF, atribuible al grupo fosfato de la MTF. Resultados obtenidos en otros estudios, muestran la eficacia de esta técnica, en donde se investigan en hidrogeles de poliacrilamida la presencia de metales tóxicos, debido a que destacando la capacidad de los hidrogeles para absorber diversos elementos (Fuentes et al., 2011). La combinación de MEB y EDX, por lo tanto, proporciona una comprensión más profunda de las interacciones químicas y las capacidades de absorción o interacción de los hidrogeles, lo que es crucial para su aplicación en diferentes campos. La MTF es soluble en agua, pero anfifílica, la cual forma micelas en un medio acuoso, en donde sus partes hidrofóbicas (cadena de 16 carbonos) se orientan hacia el interior, formando un núcleo, mientras que sus partes hidrofílicas (fosfatidilcolina) se orientan hacia el exterior. La concentración micelar crítica (CMC) de la MTF varía según el solvente y el método utilizado para su determinación, con valores tan bajos como 3 μM (Rakotomanga et al., 2004). La CMC es el punto en el cual las moléculas de MTF comienzan a agregarse para formar micelas. Por debajo de la CMC, las moléculas de MTF existen principalmente como monómeros dispersos en la solución,

mientras que, por encima de la CMC, la formación de micelas es predominante. Un estudio sobre la agregación de MTF (formación de micelas) en diferentes medios, utilizando espectroscopía de fluorescencia de sonda y tensión superficial, informó valores de CMC que van desde 60 μM en agua pura hasta 35 μM en PBS (Dirany et al., 2023). Estos valores reflejan los efectos electrostáticos en la formación de micelas y la naturaleza zwitteriónica del fármaco. En nuestro estudio, la caracterización de micelas de MTF (0,5% p/v = 12,26 mM) en agua tipo I reveló un tamaño de $6,21 \pm 0,4$ nm, con un índice de PDI de $0,282 \pm 0,03$, indicando una distribución de tamaño uniforme. Esta observación es coherente con los hallazgos de otro estudio, donde se observaron micelas de MTF de tamaño 4-8 nm, sugiriendo una consistencia en la formación de micelas de MTF en diferentes entornos, como buffer HEPES 30 mM y Carbomer934-P NF (un polímero de carboxipolimetileno). Sin embargo, la adición de DMSO en nuestra formulación resultó en un aumento del PDI, indicando una mayor heterogeneidad en el tamaño de las micelas. Este contraste con lo observado en el estudio anterior, donde la inclusión de fosfolípidos condujo a la formación de liposomas (150 ± 50 nm) y micelas de diferentes tamaños ($10-12 \pm 3$ nm), resalta cómo los componentes de la formulación pueden influir en la estructura y estabilidad de las micelas (Peralta et al., 2022). Además, en nuestro estudio, la presencia de carbopol interfirió con la observación de micelas; el alto PDI observado en el hidrogel de MTF podría deberse a la formación de estructuras más complejas o agregados en presencia de carbopol. En cuanto al potencial zeta, en nuestro estudio fue evaluado en las micelas de MTF en agua tipo I y en hidrogeles con el objetivo de determinar su carga superficial y posible efecto en las interacciones con membranas biológicas, que generalmente poseen carga negativa, lo cual facilitaría su internalización.

La relación entre la concentración de carbopol, el pH y la liberación de fármacos en hidrogeles ha sido ampliamente estudiada. A bajas concentraciones de carbopol (0,5%–2%) en solución acuosa,

un hidrogel es capaz de incorporar y liberar una amplia gama de fármacos (p.ej. compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos de bajo peso molecular y macromoléculas) y facilitar la rápida absorción del fármaco e hidratación de la piel sin oclusión (Zaho et al., 2015). En experimentos *in vitro* usando la técnica de disolución en medios simulados de fluidos gástrico (pH 1,2) y fluido intestinal (pH 7,4) con fármacos como el diclofenaco sódico, se observó que el aumento en la concentración de Carbopol 934 (1 a 3 % p/v) llevó a una disminución leve en el porcentaje de liberación del fármaco (Suhail et al., 2020). Este efecto se debe a la formación de un hidrogel más denso y rígido, lo cual aumenta la viscosidad del sistema e impide la eficiente difusión del fármaco fuera de la matriz del hidrogel. Por ende, a mayor concentración de carbopol, menor es el porcentaje de liberación del fármaco. Por otro lado, se ha encontrado que la liberación del fármaco aumenta con el incremento del pH. Esto se explica por el hecho de que el carbopol es un polímero sensible al pH, que exhibe una mayor capacidad de hinchazón en condiciones alcalinas, facilitando así la liberación del fármaco en concentraciones más altas en un medio alcalino (Taylor et al., 1977). Esto se debe a alta concentración de grupos COOH del hidrogel, el cual en un pH del entorno es básico, los grupos COOH tienden a perder un ion hidrógeno (H⁺), convirtiéndose en grupos COO⁻ (iones carboxilato), conduciendo a un aumento en la repulsión electroestática y la reducción del enlace de hidrógeno facilitando una mayor absorción de agua, lo que lleva a una mayor hinchazón (Suahil et al., 2020). Estos hallazgos, fueron observados en nuestro estudio de liberación de cafeína, subrayando la importancia del equilibrio entre la concentración de carbopol y el pH en el diseño de SLF eficientes. Un estudio investigó la liberación de MTF desde hidrogeles de 1% Carbopol 934-P a través de membranas de policarbonato, comparando la MTF libre con la encapsulada en liposomas. Se encontró que la MTF libre se liberaba más rápidamente, mostrando un flujo 3,5 veces mayor en comparación con la encapsulada. Este resultado destaca cómo la forma

del fármaco (libre o encapsulada) afecta su tasa de difusión desde el hidrogel (Peralta et al., 2022). La MTF cumple con algunos de los requisitos como candidato para la permeación de fármacos basándose en sus características fisicoquímicas (peso molecular de 407,576 g/mol, pKa aproximadamente 2, solubilidad en agua $\geq 2,5$ mg/mL y donantes/aceptores de enlaces de hidrógeno 0/4), además ha sido utilizada en solución tópica Miltex® para tratar metástasis de cáncer de piel, lo que indica cierta permeación del fármaco. Sin embargo, en este estudio por la dificultad en la cuantificación de MTF no fue posible determinar la permeación de MTF en piel de ratón. Por lo tanto, determinamos el efecto de este fármaco como PPP de la cafeína que es utilizado como un compuesto de referencia en estudios de permeación cutánea percutánea (OECD 428). Estudios han sido publicados para la identificación de aceites esenciales y sesquiterpenos de origen vegetal como posibles candidatos como PPP (Carreño et al., 2023) En nuestro estudio se encontró que 0,5% MTF-, mejora significativamente la permeación de la cafeína comparado con el vehículo de 1% carbopol y 1% DMSO, manteniendo la integridad de la piel durante la exposición. Este efecto se puede atribuir al comportamiento de la MTF como surfactante debido a que es una molécula anfifílica y zwitteriónica a pH de la piel (pH 5,5), que contiene tanto una carga positiva como una negativa ($pK_a \approx 2$) lo puede provocar alteraciones en la organización del SC (Lemery et al., 2015). La capacidad del 10% DMSO como PPP fue evaluada en este estudio, sin embargo, no se observó diferencias significativas en comparación con el vehículo y si se observó un efecto irritante en la piel debido a la exposición constante por 24 h. El DMSO es un solvente aprótico formador de enlaces de hidrógeno utilizado durante más de tres décadas como componente de SLF transdérmicos tanto para fármacos hidrofílicos como lipofílicos. Altera las propiedades de barrera del SC (fluidez de los lípidos y formación transitoria de poros de agua) y se ha incorporado en diversas preparaciones farmacéuticas con efectos favorables en la curación

de heridas, analgesia e inflamación en concentraciones <50% (Marren et al., 2011; Ahn et al., 2014). En la leishmaniasis experimental, 12% de DMSO en una formulación de PAR en parafina blanda blanca mostró ser efectivo en reducir las lesiones y la carga parasitológica en ratones infectados con *L. major* (El-On et al., 1987). Son pocos los estudios que proporcionen pautas para determinar la dosis adecuada y segura de DMSO para una entidad clínica específica y ciertas precauciones deben implementarse con el tratamiento de LC.

En el presente estudio verificamos el efecto antileishmania *in vitro* de la MTF en solución sobre especies del NM (Yardley et al., 2005). Su efecto contra promastigotes de *L. amazonensis* se mantuvo hasta por 11 meses cuando se formuló en un hidrogel. Un estudio en amastigotes de *L. amazonensis* reveló que la MTF es efectiva en inhibir el parásito de manera dosis-dependiente, con concentraciones menores a 9 μM para evitar la citotoxicidad en macrófagos. La eficacia de la MTF alcanzó aproximadamente un 40% de inhibición a una dosis baja de 2,3 μM y aumentó al 90% con 9 μM , demostrando su potencial en el tratamiento LC-NM al ajustar las dosis (Peralta et al., 2022).

La evaluación de la seguridad cutánea (no irritación/corrosión) en las formulaciones tópicas es crucial para asegurar la compatibilidad de los productos con la piel humana y prevenir reacciones adversas. En este estudio el uso tópico del hidrogel de 0,5% de MTF y 10% de DMSO en piel sana no mostró irritación. Estos hallazgos están en línea con los resultados obtenidos en otro estudio, en el que no se observaron signos de irritación cutánea en ratones con LC por *L. amazonensis* tratados con un hidrogel 0,5% MTF. En ensayos *in vitro* realizados en fibroblastos la viabilidad celular se mantuvo por encima del 72% en concentraciones de MTF entre 2,25–36 μM (Peralta et al., 2022). En contraste, un estudio *in vivo* en ratones infectados con *L. major* mostraron que formulaciones tópicas con una concentración de MTF (6% p/v) en propilenglicol y dimetil

isosorbide (usados como PPP) y octil salicilato indujeron irritación a los 5 días de tratamiento. La irritación observada llevó a la suspensión del tratamiento (Van Bocxlaer et al., 2016). Este hecho subraya la importancia utilizar una concentración óptima de MTF y un vehículo apropiado.

1.5 Conclusiones

Los hidrogeles desarrollados mostraron estabilidad fisicoquímica y homogeneidad manteniendo estas propiedades hasta por 11 meses bajo diferentes condiciones de temperatura, lo que sugiere su viabilidad para aplicaciones a largo plazo. Su comportamiento reológico pseudoplástico favorece una fácil aplicación y adherencia cutánea. La estructura porosa de los hidrogeles de MTF resultó beneficiosa para la liberación controlada de fármacos, como se observó en el caso de la cafeína, cuya liberación aumentó con menores concentraciones de carbopol. Además, los hidrogeles de MTF al 0,5% mostraron actividad anti-*Leishmania*, lo cual se mantuvo bajo diferentes condiciones de temperatura, siendo relevantes para el tratamiento tópico en zonas endémicas. Finalmente, estos hidrogeles fueron bien tolerados, sin evidencias de irritación o toxicidad, lo que refuerza su potencial como tratamiento tópico seguro.

Referencias

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>

Ahn, H., Kim, J., & Jeung, E. B. (2014). Dimethyl sulfoxide inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Immunobiology*, 219(3), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.01.003>

Alavi-Naini, R. (2008). Topical morphine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Medical Hypotheses*, 70(1), 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.04.027>

Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R., & Kroeger, A. (2001). Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 466–470. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.466>

Arevalo, I., Tulliano, G., Quispe, A., Spaeth, G., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., et al. (2007). Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), 1549–1554. <https://doi.org/10.1086/518172>

Arevalo, I., Ward, B., Miller, R., Meng, T.-C., Najjar, E., Alvarez, E., et al. (2001). Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1847–1851. <https://doi.org/10.1086/324161>

Asilian, A., Jalayer, T., Nilforooshzadeh, M., Ghassemi, R., Peto, R., Wayling, S., et al. (2003). Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: Double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(5), 353–359. <https://doi.org/10.1590/S0042-96862003000500007>

Azzi, C. G., et al. (2005). Topical dermatological vehicles: Engineering the delivery systems. In R. L. Bronaugh & H. I. Maibach (Eds.), *Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology* (pp. 801–810). Taylor & Francis Group.

Baboota, S., Alam, M. S., Sharma, S., Sahni, J. K., Kumar, A., & Ali, J. (2011). Nanocarrier-based hydrogel of betamethasone dipropionate and salicylic acid for treatment of psoriasis. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1(3), 139–147. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.85963>

Barbosa, J. (2021). The pH influence on the carbopol® solutions stabilization by addition of NaOH. *Journal of Polymer Science*, 23, 345–353.

Barry, B. W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 101–114. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00167-1)

Behera, B., Sagiri, S. S., Pal, K., Pramanik, K., Rana, U. A., Shakir, I., & Anis, A. (2015). Sunflower oil and protein-based novel bigels as matrices for drug delivery applications: Characterization and in vitro antimicrobial efficiency. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(8), 837–850. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.974268>

Bodugoz-Senturk, H., Macias, C. E., Kung, J. H., & Muratoglu, O. K. (2009). Poly(vinyl alcohol)–acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*, *30*(5), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.008>

Brayton, C. F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. *The Cornell Veterinarian*, *76*(1), 61–90.

Brito, N. C., Machado de Assis, T. S., Rabello, A., & Cota, G. (2019). Intralesional infiltration versus parenteral use of meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis: A cost-effectiveness analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(12), e0007856. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007856>

Brunaugh, A. D., Smyth, H. D. C., & Williams III, R. O. (2019). Topical and transdermal drug delivery. In *Essential Pharmaceutics*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31745-4_9

Çağlar, E. Ş., et al. (2023). Preparation and characterization of Carbopol-based hydrogels containing dexpanthenol. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*.

Cardona-Arias, J. A., Vélez, I. D., & López-Carvajal, L. (2015). Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis: A meta-analysis of controlled clinical trials. *PLoS One*, *10*(5), e0122569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122569>

Carneiro, G., Aguiar, M. G., Fernandes, A. P., & Ferreira, L. A. (2012). Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *9*(9), 1083–1097. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.701204>

Carreño, H., Stashenko, E. E., & Escobar, P. (2023). Essential oils distilled from Colombian aromatic plants and their constituents as penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Molecules*, 28(6), 2872. <https://doi.org/10.3390/molecules28062872>

Chakravarty, J., & Sundar, S. (2019). Medicamentos actuales y emergentes para el tratamiento de la leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(10), 1251–1265. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>

Corredor-Chaparro, M. Y., Vargas-Riveros, D., & Mora-Huertas, C. E. (2022). Hypromellose – Collagen hydrogels/sesame oil organogel based bigels as controlled drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 75, 103637. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103637>

Dar, M. J., Din, F. U., & Khan, G. M. (2018). Sodium stibogluconate loaded nano-deformable liposomes for topical treatment of leishmaniasis: Macrophage as a target cell. *Drug Delivery*, 25(1), 1595–1606. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1494222>

Dar, M. J., Khalid, S., Varikuti, S., Satoskar, A. R., & Khan, G. M. (2020). Nano-elastic liposomes as multidrug carriers of sodium stibogluconate and ketoconazole: A potential new approach for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 145, 105256. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105256>

Dirany, Z., El-Dirany, R., Smith, G. N., Nguewa, P., & González-Gaitano, G. (2023). Mixed micelles and gels of a hydrophilic poloxamine (Tetronic 1307) and miltefosine: Structural characterization by small-angle neutron scattering and in vitro evaluation for the treatment of

leishmaniasis. *Journal of Molecular Liquids*, 379, 121654.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121654>

Ebrahimisadr, P., Ghaffarifar, F., Hassan, Z. M., Sirousazar, M., & Mohammadnejad, F. J. (2014). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) containing artemether in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(5), e9696. <https://doi.org/10.5812/jjm.9696>

Eibl, H., & Unger, C. (1990). Hexadecylphosphocholine: A new and selective antitumor drug. *Cancer Treatment Reviews*, 17(2–3), 233–242. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(90\)90053-i](https://doi.org/10.1016/0305-7372(90)90053-i)

Elgharably, H., Ganesh, K., Dickerson, J., Khanna, S., Abas, M., Ghatak, P. D., Dixit, S., Bergdall, V., Roy, S., & Sen, C. K. (2014). A modified collagen gel dressing promotes angiogenesis in a preclinical swine model of chronic ischemic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 22(6), 720–729. <https://doi.org/10.1111/wrr.12229>

El-On, J., Jacobs, G. P., Witztum, E., et al. (1984). Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(6), 745–751. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.6.745>

Fadel, M., Salah, M., Samy, N., & Mona, S. (2009). Liposomal methylene blue hydrogel for selective photodynamic therapy of acne vulgaris. *Journal of Drugs in Dermatology*, 8(9), 983–990.

Garnier, T., Mantyla, A., Jarvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., & Croft, S. (2007). In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(4), 802–810. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm303>

Garza-Tovar, T. F., Sacriste-Hernández, M. I., Juárez-Durán, E. R., & Arenas, R. (2020). An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Fac Review*, *9*(28), 1–8. <https://doi.org/10.12703/r/9-28>

Ghaffarpasand, F., Akbarzadeh, A., Heiran, H. R., Karimi, A. A., Akbarzadeh, A., & Ghobadifar, M. A. (2016). Effect of topical morphine on cutaneous leishmaniasis in an animal model: A preliminary report. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *18*(5), e24402. <https://doi.org/10.5812/ircmj.24402>

Hmingthansanga, V., Singh, N., Banerjee, S., Manickam, S., Velayutham, R., & Natesan, S. (2022). Improved topical drug delivery: Role of permeation enhancers and advanced approaches. *Pharmaceutics*, *14*(12), 2818. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122818>

Kaur, N., Sharma, K., & Bedi, N. (2018). Topical nanostructured lipid carrier-based hydrogel of mometasone furoate for the treatment of psoriasis. *Pharmaceutical Nanotechnology*, *6*(3), 133–143. <https://doi.org/10.2174/2211738506666180523112513>

Kavian, Z., Alavizadeh, S. H. K., Golmohamadzadeh, S., Badiee, A., Khamesipour, A., & Jaafari, M. R. (2019). Development of topical liposomes containing miltefosine for the treatment of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Acta Tropica*, *196*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.018>

Kesharwani, P., Bisht, A., Alexander, A., Dave, V., & Sharma, S. (2021). Biomedical applications of hydrogels in drug delivery systems: An update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *66*, Article 102914. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102914>

Kim, J. Y., Song, J. Y., Lee, E. J., & Park, S. K. (2003). Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid and Polymer Science*, *281*(7), 614–623. <https://doi.org/10.1007/s00396-002-0820-z>

Kim, S., & Park, S. (2004). Properties of smart hydrogels composed of polyacrylic acid/poly (vinyl sulfonic acid) responsive to external stimuli. *Smart Materials and Structures*, *13*(2), 317–322. <https://doi.org/10.1088/0964-1726/13/2/010>

Krause, G., & Kroeger, A. (1994). Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: A clinical study under field conditions in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *88*(1), 92–94. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90517-7)

Kumar, T. P., & Eswaraiah, M. C. (2020). Formulation and evaluation of topical hydrogel containing antifungal drug. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *8*(4), 249–254. <https://doi.org/10.15406/ppij.2020.08.00302>

laser therapy on cutaneous leishmaniasis compared to intralesional meglumine antimoniate. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, *36*(2), 227–231. <https://doi.org/10.5114/ada.2019.82827>

Lemery, E., Briançon, S., Chevalier, Y., et al. (2015). Surfactants have multi-fold effects on skin barrier function. *European Journal of Dermatology*, 25(5), 424–435. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2587>

Leonard, R., Hardy, J., van Tienhoven, G., Houston, S., Simmonds, P., David, M., & Mansi, J. (2001). Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(21), 4150–4159. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.21.4150>

López, L., Vélez, I., Asela, C., Cruz, C., Alves, F., Robledo, S., et al. (2018). A phase II study to evaluate the safety and efficacy of topical 3% amphotericin B cream (Anfoleish) for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), e0006653. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006653>

Lukić, M., Pantelić, I., & Savić, S. D. (2021). Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products. *Cosmetics*, 8(3), 69. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>

Lupi, F. R., Shakeel, A., Greco, V., Oliviero Rossi, C., Baldino, N., & Gabriele, D. (2016). A rheological and microstructural characterisation of bigels for cosmetic and pharmaceutical uses. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.098>

Mantyla, A., Garnier, T., Rautio, J., Nevalainen, T., Vepsäläinen, J., Koskinen, A., et al. (2003). Synthesis, in vitro evaluation, and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of

buparvaquone. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(1), 188–195.
<https://doi.org/10.1021/jm030868a>

Marapureddy, S. G., & Thareja, P. (2020). Structure and rheology of hydrogels: Applications in drug delivery. In P. Chandra & L. Pandey (Eds.), *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery* (pp. 3-22). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-4790-4_4

Marren, K. (2011). Dimethyl sulfoxide: An effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs. *The Physician and Sportsmedicine*, 39(3), 75–82.
<https://doi.org/10.3810/psm.2011.09.1933>

Miranda-Verastegui, C., Tulliano, G., Gyorkos, T. W., Calderon, W., Rahme, E., Ward, B., Cruz, M., Llanos-Cuentas, A., & Matlashewski, G. (2009). First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(7), e491.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000491>

Mosleh, I. M., Geith, E., Natsheh, L., Schönian, G., Abotteen, N., & Kharabsheh, S. (2008). Efficacy of a weekly cryotherapy regimen to treat *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(4), 617–624.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.12.032>

Murakami, K., Aoki, H., Nakamura, S., Nakamura, S., Takikawa, M., Hanzawa, M., & Ishihara, M. (2010). Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 31(1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.031>

Naeem, F., Nathan, K., Chivinski, J., Ekmekjian, T., Libman, M., & Barkati, S. (2021). Intravenous liposomal amphotericin B efficacy and safety for cutaneous and mucosal leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*, *11*(6), e045707. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-045707>

Nayak, A. K., & Das, B. (2018). Introduction to polymeric gels. In K. Pal & I. Banerjee (Eds.), *Polymeric Gels: Characterization, Properties and Biomedical Applications* (pp. 3–22). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-04092-5>

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(6), 1634–1641. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz049>

Obara, K., Ishihara, M., Ishizuka, T., Fujita, M., Ozeki, Y., Maehara, T., Saito, Y., Yura, H., Matsui, T., Hattori, H., Kikuchi, M., & Kurita, A. (2003). Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Biomaterials*, *24*(20), 3437–3444. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00220-5)

Omidian, M., Jadbabaei, M., Omidian, E., & Omidian, Z. (2019). The effect of Nd

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2015). Test No. 404: Acute dermal irritation/corrosion. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects*. Paris, France. <https://doi.org/10.1787/9789264242678-en>

Organización Mundial de la Salud. (2023). Leishmaniasis. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Pan American Health Organization. (2022). *Guideline for the treatment of leishmaniasis in the Americas* (2nd ed.). Washington, DC: PAHO. <https://doi.org/10.37774/9789275125038>

Peralta, M. F., Usseglio, N. A., Bracamonte, M. E., et al. (2022). Efficacy of topical miltefosine formulations in an experimental model of cutaneous leishmaniasis. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(1), 180–196. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00896-8>

Qindeel, M., Ahmed, N., Sabir, F., Khan, S., & Ur-Rehman, A. (2019). Development of novel pH-sensitive nanoparticles loaded hydrogel for transdermal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569031>

Rakotomanga, M., Loiseau, P. M., & Saint-Pierre-Chazalet, M. (2004). Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1661(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.010>

Ramirez, A., Benitez, J. L., Rojas de Astudillo, L., & Rojas de Gascue, B. (2016). Materiales polímeros de tipo hidrogeles: Revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB y MET. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108–130. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002&lng=es&nrm=iso

Rojas de Gáscue, B., Contreras, D., Ramírez, A., Prin, J. L., Astudillo, H., Rojas, L., Figueroa, Y., Palomo, C., Müller, A., & Katime, I. (2012). *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 55, 39–42.

Schmidt-Ott, R., Klenner, T., Overath, P., & Aebischer, T. (1999). Topical treatment with hexadecylphosphocholine efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *93*(1), 85–90. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(99\)90192-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(99)90192-x)

Severino, P., Santana, W., Lisboa, E. S., Santos, V. L. S. d., Lima, E. T. d. S., Cardoso, J. C., Albuquerque-Junior, R. L. C. d., Naveros, B. C., Santini, A., Souto, E. B., & et al. (2022). Cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis treatment for wound healing: Classical versus new treatment approaches. *Microbiology Research*, *13*(4), 836–852. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13040059>

Sikarwar, U., Khasherao, B. Y., & Sandhu, D. (2022). A review on hydrogel: Classification, preparation techniques and applications. *The Pharma Innovation Journal*, *11*(7), 1172–1179. <https://doi.org/10.22271/tpi.2022.v11.i7o.13944>

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., Fuya, P., Herrera, R., & Berman, J. (1998). Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: Controlled study. *Clinical Infectious Diseases*, *26*(1), 56–58. <https://doi.org/10.1086/516267>

Soto, J., Paz, D., Rivero, D., Soto, P., Quispe, J., Toledo, J., & Berman, J. (2016). Intralesional pentamidine: A novel therapy for single lesions of Bolivian cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 852–856. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0640>

Soto, J., Rojas, E., Guzman, M., Verduguez, A., Nena, W., Maldonado, M., Cruz, M., Gracia, L., Villarroel, D., Alavi, I., Toledo, J., & Berman, J. (2013). Intralesional antimony for single lesions of Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 56(9), 1255–1260. <https://doi.org/10.1093/cid/cit049>

Soto, J., Soto, P., Ajata, A., Luque, C., Tintaya, C., Paz, D., Rivero, D., & Berman, J. (2019). Topical 15% paromomycin-aquaphilic for Bolivian *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis: A randomized, placebo-controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 68(5), 844–849. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy619>

Su, J., Hu, B. H., Lowe, W. L., Kaufman, D. B., & Messersmith, P. B. (2010). Anti-inflammatory peptide-functionalized hydrogels for insulin-secreting cell encapsulation. *Biomaterials*, 31(2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.031>

Suhail, M., Wu, P. C., & Minhas, M. U. (2020). Using carbomer-based hydrogels to control the release rate of diclofenac sodium: Preparation and in vitro evaluation. *Pharmaceuticals*, 13(11), 399. <https://doi.org/10.3390/ph13110399>

Talevi, A., & Bellera, C. L. (2021). Free diffusion in drug absorption. In *The ADME Encyclopedia*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5_44-1

Taylor, N. W., & Bagley, E. B. (1977). Tailoring closely packed gel–particle systems for use as thickening agents. *Journal of Applied Polymer Science*, 21(1), 113–122. <https://doi.org/10.1002/app.1977.070210110>

Tripathi, P., Kumar, A., Jain, P. K., & Patel, J. R. (2018). Carbomer gel bearing methotrexate loaded lipid nanocontainers shows improved topical delivery intended for effective management of psoriasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1322–1334. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.136>

Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., & Croft, S. L. (2016). Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(7), 862–872. <https://doi.org/10.1111/jphp.12548>

Vera, A. M., Casadiego, O. A., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2018). Evaluación de formulaciones de ketoconazol para uso tópico en leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia)*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(3), 476–482. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3531>

Vera, A. M., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2021). Anti-leishmanial activity of 29 daily sessions of intralesional-pentavalent antimony administration on *Leishmania (Viannia)*-infected BALB/c mice. *Revista de Biología Tropical*, 69(4), 1179–1188. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i4.47368>

Williams, A. C., & Barry, B. W. (2004). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(5), 603–618. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.025>

Yardley, V., Croft, S. L., & De Doncker, S. et al. (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 272–275.

Zhao, F., Yao, D., Guo, R., Deng, L., Dong, A., & Zhang, J. (2015). Composites of polymer hydrogels and nanoparticulate systems for biomedical and pharmaceutical applications. *Nanomaterials*, 5(4), 2054–2130. <https://doi.org/10.3390/nano5042054>

Zumbuehl, A., Ferreira, L., Kuhn, D., Astashkina, A., Long, L., Yeo, Y., Iaconis, T., Ghannoum, M., Fink, G. R., & Langer, R. (2007). Antifungal hydrogels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32), 12994–12998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705250104>

2. Efectividad de la miltefosina al ser aplicada tópicamente en un modelo murino de LC infectado con una especie del Nuevo Mundo

2.1 Leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo (LC-NM): generalidades

La LC es una enfermedad dermatológica que presenta diversas formas clínicas (localizada, difusa anérgica, mucosa) dependiendo de la especie de *Leishmania* y las características inmunológicas del hospedero. Las especies de *Leishmania* causantes de enfermedad en mamíferos se organizan en tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Mundinia*. La clasificación de *Leishmania* y *Viannia* se basa en el desarrollo biológico del parásito dentro del intestino del vector flebótomo y el subgénero *Mundinia* fue clasificado recientemente mediante aproximaciones moleculares (Silveira et al., 2023). En la **Tabla 5** se muestra la clasificación taxonómica detallada de estos subgéneros, incluyendo las especies más importantes, su distribución geográfica y las manifestaciones clínicas asociadas a cada una, tales como leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD), leishmaniasis cutánea difusa anérgica (LCDA), y leishmaniasis mucocutánea (LMC).

Tabla 5 Clasificación taxonómica de parásitos de *Leishmania*, clasificación subgénero, distribución y sus manifestaciones clínicas en la LC-NM

Subgénero	Criterio de clasificación	Especies	Distribución geográfica	Manifestación Clínica
<i>Leishmania</i> (Ross 1903)	Desarrollo en el intestino medio	<i>L. amazonensis</i>	Amazonia brasileña	LCL, LCDA
		<i>L. mexicana</i>	América Latina	LCL, LCD
	hasta el	<i>L. pifanoi</i>	Venezuela	LCL

	intestino	<i>L. garnhami</i>	América del Sur	LCL
	anterior	<i>L. venezuelensis</i>	Venezuela	LCL
	(suprapilaria).	<i>L. waltoni</i>	América Latina	LCL
<hr/>				
			Primera especie	
			identificada en el	
			NM. Amplia	
		<i>L. braziliensis</i>	distribución en	LCL, LMC,
			América Latina,	LCD.
			especialmente en	
	Desarrollo en el		Brasil	
	vector desde el			
		<i>L. guyanensis</i>	En la Guayana	LCL
<i>Viannia</i>	intestino	<i>L. shawi</i>	Amazonía brasileña	LCL
(Laison &	posterior hasta	<i>L. lainsoni</i>	Región amazónica	LCL
Shaw 1987)	el intestino	<i>L. lindenbergi</i>	Región amazónica	LCL
	anterior	<i>L. naiffi</i>	Amazonía brasileña	LCL
	(peripylaria).	<i>L. peruviana</i>	Perú	LCL
			Panamá y regiones de	
		<i>L. panamensis</i>	América Central y del	LCL
			Sur	
		<i>L. guyanensis</i> /	Región amazónica de	
		<i>L. shawi</i>	Brasil	LCL

	Aproximaciones		
<i>Mundinia</i>	moleculares		
(Shaw et al., 2016)	(genes <i>v7v8 ssu</i> , <i>L. martiniquensis</i> rRNA, <i>hsp70</i> , y <i>gapdh</i>).	Encontrada en la región del Caribe	LCL, LCD

Nota: tabla modificada de Silveira et al., 2023. LCL, leishmaniasis cutánea localizada; LCD, leishmaniasis cutánea difusa; LCDA, leishmaniasis cutánea difusa anérgica; LMC, leishmaniasis mucocutánea.

La LC-NM es producida por protozoarios dimórficos del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos a los humanos y reservorios mamíferos a través de mosquitos hembra hematófagos del género *Lutzomyia*. Es una enfermedad dermatológica endémica en Centro y Sur América. Durante el año 2022 se reportaron 37890 casos de LC, ocupando Colombia el tercer lugar con 5685 casos después de Perú y Brasil con 5760 y 12878 casos, respectivamente (OPS, 2023). En Colombia, las especies reportadas se encuentran distribuidas en todo el país excepto en el archipiélago de San Andrés y Bogotá DC con una incidencia de 42,89 casos por 100000 habitantes en riesgo (INS,2023). Las principales especies involucradas en la LC son *L. (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Los subgéneros *Leishmania* o *Viannia*, se diferencian entre otros, por el sitio de desarrollo y el acoplamiento de su forma flagelada (promastigotes) en el intestino del mosquito (Akhoundi et al., 2016) y el *Mundinia* se caracteriza por su diversidad en términos de hospedadores y vectores, siendo transmitido no sólo por flebótomos sino también por mosquitos del género *Forcipomyia*. Además, este subgénero

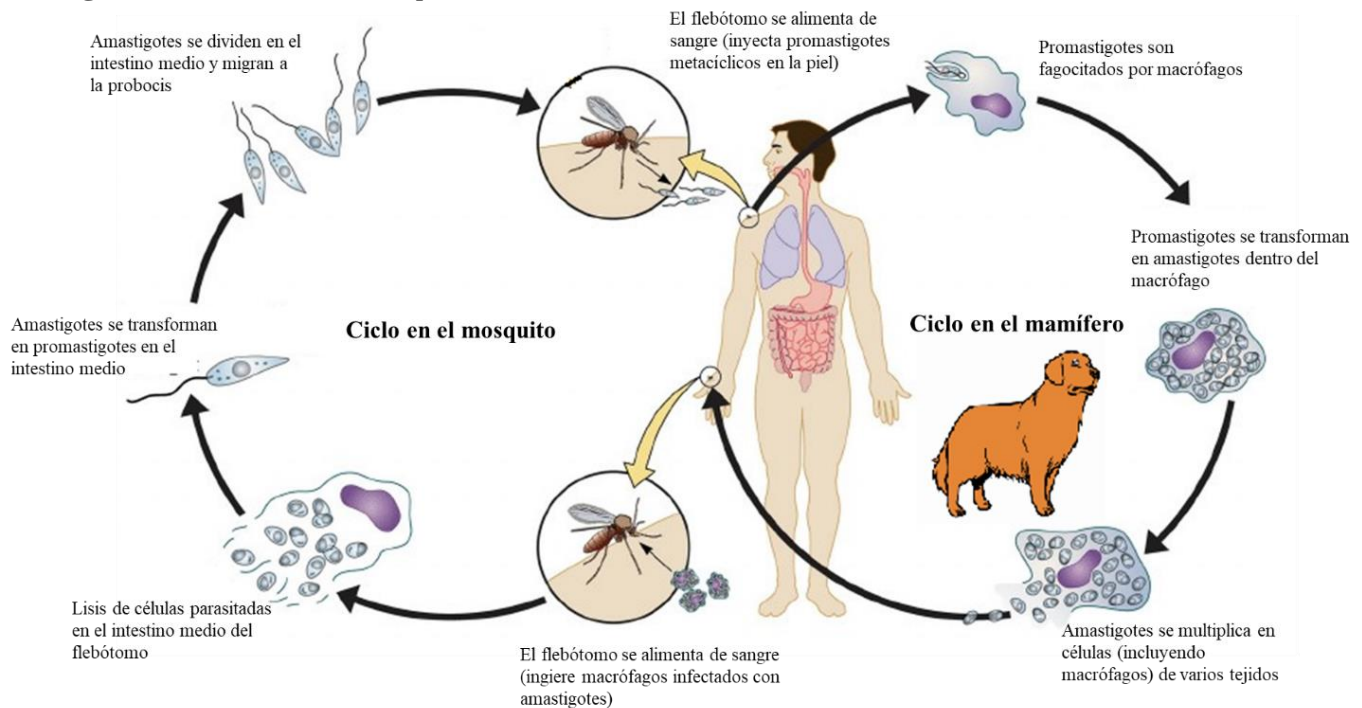
Mundinia presenta una distribución geográfica más amplia, desde Sudamérica hasta el sudeste asiático y África, (Butenko et al., 2019).

El ciclo de vida de *Leishmania* se mantiene entre los flebótomos y los hospederos mamíferos. En los mosquitos, las formas flageladas (móviles) de promastigotes procíclicos se dividen por fisión binaria y se transforman en diversas formas (nectomonas, paramastigotes, haptomonas) hasta llegar a promastigotes metacíclicos, que constituyen la forma infectiva transmitida al hospedero vertebrado por la hembra del flebótomo. En el hospedero mamífero, las formas inmóviles, los amastigotes, no tienen un flagelo exteriorizado y viven como parásitos intracelulares en las células fagocíticas, especialmente en los macrófagos de la dermis de la piel, en el caso de las especies de *Leishmania* dermatrópicas (Kaye et al., 2011). El parásito también infecta y modula otras células inmunitarias, como los neutrófilos, células dendríticas y mastocitos, los cuales pueden influir en la eliminación o en el establecimiento de la infección (Costa da Silva et al., 2022). Una vez en el macrófago, los amastigotes intracelulares se replican en los fagosomas, evitando la muerte del parásito al neutralizar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH), y el óxido nítrico (ON), permitiendo así su supervivencia y multiplicación en el hospedero. A medida que se acumulan grandes cantidades de amastigotes, los macrófagos se lisan, liberando los parásitos, facilitando la reinfección de otras células. Este ciclo continúa cuando otros flebótomos ingieren fagocitos infectados durante su alimentación. Dentro del vector, los amastigotes se convierten en promastigotes en el intestino posterior o medio, donde proliferan y se diferencian en promastigotes

infectivos. Estos migran a las glándulas salivales del flebótomo, desde donde son transmitidos nuevamente a un hospedero, perpetuando el ciclo de vida del parásito.

Nota: Los promastigotes procíclicos se replican en el intestino del mosquito flebótomo, migran a la probóscide y se transforman en promastigotes metacíclicos, la forma infectiva no replicativa.

Figura 14 *Ciclo de vida del parásito*



Durante la picadura el mosquito libera los promastigotes junto con componentes inmunomodulatorios en la piel del huésped. Los fagocitos del huésped ingieren los promastigotes, que se transforman en amastigotes intracelulares. Estos se multiplican hasta romper las células huésped, infectando otros macrófagos. El ciclo se completa cuando un mosquito ingiere macrófagos infectados, iniciando la transformación de amastigotes a promastigotes nuevamente.

Figura tomada y modificada de Esch et al., 2013.

Las manifestaciones clínicas de la LC-NM son diversas. La más común es la LC localizada (LCL) se caracteriza por un número limitado de lesiones, de úlceras húmedas o secas con un borde crateriforme elevado (forma vulcano) con carga parasitaria moderada en el borde de las úlceras y respuesta inmune de hipersensibilidad tipo retardado (DTH) positivo (Rodríguez et al., 2016). La LC difusa anérgica (LCDA) se caracteriza por presentar múltiples lesiones nodulares, no ulcerativas y diseminadas, con abundantes parásitos y ausencia de respuesta DTH. La LC diseminada (LCD) se caracteriza por numerosas lesiones papulares/acneiformes en ≥ 2 áreas no contiguas del cuerpo, comúnmente involucrando membranas mucosas, pocos parásitos en las lesiones y fuerte respuesta DTH). La leishmaniasis mucosa (LM) por su parte es una de las formas más graves y difíciles de tratar. Se manifiesta con lesiones inflamatorias en las membranas mucosas de la nariz, boca y faringe que pueden ser desfigurantes presentando de escasos/nulos parásitos en las biopsias y una fuerte respuesta DTH (Silveira et al., 2023; Silveira et al., 2004). Las especies de *Leishmania* involucradas se observan en la **tabla 11**. Detalles sobre los factores que podrían estar involucrados en la heterogeneidad de la LC del NM se analizarán en el capítulo 3.

2.1.1 *Uso de ratones BALB/c en el estudio de la LC-NM*

El modelo murino ha sido ampliamente utilizado para estudiar la infección, patogénesis, inmunidad y terapéutica en LC. Una ventaja sobre otras infecciones por ejemplo por *Plasmodium* es que los ratones se pueden infectar con las mismas especies que infectan a los humanos. Las manifestaciones de la enfermedad en ratones varían según la especie de *Leishmania* y el modelo murino utilizado (Scorza et al., 2017). Los ratones BALB/c son uno de los modelos endogámicos (es decir producidos por más de 20 generaciones de apareamiento entre hermanos) más utilizados en la investigación biomédica utilizados especialmente en la investigación inmunológica y de

enfermedades infecciosas. Al ser consanguíneos son genéticamente uniformes a través de sus múltiples generaciones de apareamiento (Nakamura et al., 2013). Esta uniformidad genética los hace particularmente útiles en la investigación científica porque reduce la variabilidad en los experimentos y permite que los resultados sean reproducibles. En el estudio de la leishmaniasis se han observado diferencias genéticas en los ratones BALB/c en loci de los cromosomas 6, 7, 10, 11, 15 y 16, asociados con la respuesta a la infección en comparación con cepas resistentes de ratones, como C57BL/6, C3H, CBA y NZB, entre otros (Sacks et al., 2002; Lipoldová et al., 2000). Fenotípicamente, los ratones BALB/c muestran una liberación temprana de IL-4 generando una respuesta tipo Th2 responsable de suprimir el desarrollo de la respuesta Th1 y de inhibir la secreción de IFN γ necesaria para activar los macrófagos infectados y eliminar los parásitos (Malherbe et al., 2000). Los modelos murinos comúnmente utilizados para evaluar la LC son los ratones C57BL/6 y BALB/c para infecciones causadas por diversas especies de *Leishmania*, como *L. major*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Los ratones C57BL/6 tienden a desarrollar una respuesta inmunitaria de tipo Th1, caracterizada por la producción de interferón gamma (IFN- γ) y la activación de macrófagos que controlan y resuelven la infección de manera auto-curativa o crónica controlada. En contraste, los ratones BALB/c exhiben una respuesta Th2 predominante, con una mayor producción de citocinas como IL-4 e IL-10, lo que favorece la progresión de infecciones crónicas formando lesiones ulcerosas localizadas con riesgo de diseminación y la persistencia de los parásitos en el tejido cutáneo (Scott et al., 2016). Sin embargo, en el caso de infecciones de especies del subgénero *Viannia* desarrollan una enfermedad leve que generalmente se resuelven espontáneamente (Oliveira et al., 2012; Scott et al., 2016). Otros modelos como los ratones CBA y C3H son relativamente resistentes a infecciones por *L. major*. Estos desarrollan una respuesta

inmune celular tipo Th1, con citoquinas como IL-12, IFN γ y TNF α presentando pequeñas lesiones que se curan espontáneamente sin diseminación (Sacks et al., 2002).

Los trabajos iniciales de LC murina fueron realizados en *L. major*, la especie causante de la LC del Viejo Mundo. En ellos se demostró la polarización de la respuesta inmune en leishmaniasis donde ratones resistentes generaron una respuesta Th1 y ratones susceptibles, una respuesta Th2 (Scott et al., 2016). En infecciones con *L. mexicana* se presentan lesiones crónicas en la mayoría de las cepas de ratones (Pérez et al., 1979), en las infecciones por *L. braziliensis* se presentan lesiones pequeñas, no ulcerativas y algunas veces autocurativas en ratones BALB/c y C57BL/6 (Rocha et al., 2007) y en las infecciones por *L. amazonensis* en ratones como C57BL/10 y CBA, muestran una abundante cantidad de amastigotes, mayor daño tisular y alta producción de anticuerpos (de Oliveira Cardoso et al., 2010).

2.1.2 La MTF como alternativa terapéutica de la LC-NM

La MTF es una alquilfosfocolina, desarrollada originalmente como medicamento para las metástasis cutáneas del cáncer de mama (Unger et al., 1990). Fue el primer medicamento antileishmania oral que llegó al mercado y está registrada para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (LV) en Alemania e India y para el tratamiento de la LC y LV en Colombia (Sundar et al., 2002, Soto et al., 2006). El mecanismo de acción de la MTF se ha asociado con la inhibición de la biosíntesis de fosfolípidos y citocromo c oxidasa mitocondrial e inducción de apoptosis, alteración de la señalización celular dependiente de lípidos y alteraciones en la homeostasis intracelular del Ca $^{2+}$ (Paris et al., 2004; Urbina, 2006; Luque & Rivas, 2007; Pinto-Martínez et al., 2017). Además, actúa como inmunomodulador, restaurando la capacidad de respuesta al IFN γ , estimulando la producción temprana de IL-12 y TNF α , regulando las respuestas Th1/Th2 y aumentando la producción de ROS (Dasgupta et al., 2003; Dorlo et al., 2012; Pálic et al., 2019).

La MTF mejora la función de los macrófagos al inducir la expresión de citocinas, regular positivamente los receptores de citocinas y aumentar la capacidad fagocítica y la producción de ROS y NO en células y ratones (Zeisig et al., 1995; Ponte et al., 2012; Peixoto et al., 2020). También aumenta la proliferación de células T CD4+ y CD8+ y el estallido oxidativo humano. Sin embargo, su uso ha sido relacionado con malestar gastrointestinal que a menudo es la causa de una mala adherencia a la terapia, teratogenicidad y hepato- y nefrotoxicidad requiriendo monitoreo del paciente (Ware et al., 2021; Dorlo et al., 2012). La administración tópica de MTF podría ser una estrategia prometedora ya que minimiza los efectos secundarios, reduce la necesidad de un monitoreo intensivo y mejora la adherencia al tratamiento. Dada la aprobación de la MTF por la FDA su reformulación de oral a tópica podría ser una ruta económica y viable a mediano plazo (FDA, 2015). Estudios han demostrado la capacidad de la MTF de permear el SC de la piel, debido a su bajo peso molecular (407,57 g/mol), naturaleza anfifílica y zwitteriónica, (pKa: ~2) y su solubilidad en varios disolventes como agua ($\geq 2,5$ mg/mL), etanol (1,25 mg/mL) y DMSO (0,8 mg/mL) (Van Bocxlaer et al., 2016).

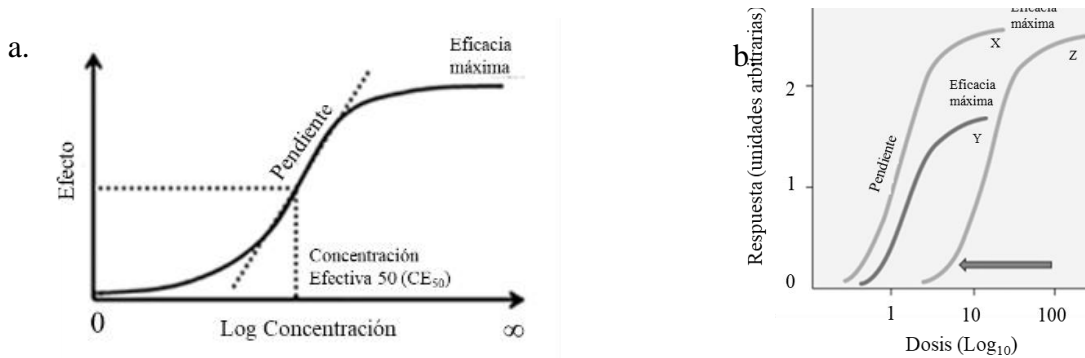
Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la MTF tiene actividad en diversas especies de *Leishmania* (Schmidt-Ott et al., 1999; Escobar et al., 2002). El primer estudio publicado del uso oral de MTF en la LC-NM fue un ensayo clínico en soldados colombianos positivos para *L. amazonensis* ($n = 5$) y *L. panamensis* ($n = 10$) donde dosis entre 50 mg/día durante 20 días y 150 mg/ día durante 28 días mostraron tasas de curación del 60% y el 81%, respectivamente (Soto et al., 2001). Otro estudio en 133 pacientes con LC en Colombia y Guatemala, el tratamiento oral con 150 mg/día durante 28 días mostró una tasa de curación del 60% en casos por *L. mexicana* y 33% en infecciones por *L. braziliensis* (Soto et al., 2004). Otros ensayos realizados en pacientes con LC por *L. braziliensis* en Bolivia, tratados con 2.5 mg/kg/día durante 28 días, mostraron una

tasa de curación del 88%. Estos datos demostraron la eficacia variable de la MTF. Estudios realizados en niños colombianos ($n = 116$), mostraron que la MTF utilizada oralmente a 1.8–2.5 mg/kg/día durante 28 días fue efectiva en el 83% de casos de LC producidos por *L. panamensis* y *L. guyanensis*, mostrando una efectividad similar al tratamiento con Sb^V (Rubiano et al., 2012). Este estudio resalta la ventaja del uso oral de MTF y su baja toxicidad en la población pediátrica.

2.1.3 Actividad dosis-respuesta

El término dosis-respuesta se refiere a la relación entre la dosis/concentración aplicada y el **efecto** observado (i.e., terapéutico, tóxico) a nivel de molécula, célula, tejido, órgano, sistema de órganos u organismo. Existen modelos matemáticos de dosis-respuesta que van desde una simple ecuación hasta la complejidad de modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos multicompartimentales. La farmacodinámica (lo que el fármaco le hace al organismo) estudia los **efectos** (bioquímicos, fisiológicos y moleculares) de los fármacos en el organismo (la unión a receptores, los efectos posreceptor y las interacciones químicas). Tanto la farmacodinámica como la farmacocinética (lo que el cuerpo hace con el fármaco, o el destino del fármaco) ayudan a explicar la relación dosis/respuesta, es decir, los **efectos** del fármaco. La respuesta farmacológica depende de la unión del fármaco a su diana y la concentración del fármaco en el receptor controla su efecto. Sin importar cómo se produzca el **efecto** de un fármaco (por unión o interacción química, i.e. un antiácido), la concentración del fármaco en sitio de acción controla el **efecto**. La respuesta a la concentración puede ser compleja y a menudo no lineal. Los resultados de dosis-respuesta suelen graficarse colocando la dosis o la función de dosis (p. ej., \log_{10} dosis) en el eje x y el **efecto** (respuesta) en el eje y. Dado que el **efecto** de un fármaco es una función de la dosis y el tiempo, dicho gráfico representa la relación dosis-respuesta independientemente del tiempo. Los efectos medidos se registran con frecuencia como máximos en el momento del efecto máximo o en

condiciones estacionarias (Farinde, 2023). Las relaciones dosis respuestas se pueden mostrar como curvas hiperbólicas o curvas sigmoidales (o sigmoideas). El modelo de curva hiperbólica muestra la relación entre la dosis del fármaco (eje X) y la respuesta al fármaco (eje Y) en una escala lineal. Se utiliza p. ej., para representar cambios en la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, el pH gástrico, la glucosa en sangre, actividad enzimática, el potencial de membrana, entre otras. Cuando la dosis del fármaco se representa en una escala logarítmica de base 10, se obtiene una curva sigmoidal dosis-respuesta (IUPHAR, 2024). La curva sigmoidal dosis-respuesta es uno de los fundamentos de la farmacología la cual muestra la potencia (a lo largo del eje x de la dosis), la eficacia máxima (mayor respuesta alcanzable) y la pendiente (cambio en la respuesta por unidad de dosis). Esta representación amplía la escala de dosis en la región en la que la respuesta al fármaco cambia rápidamente y comprime la escala en las dosis más altas, donde los grandes cambios tienen poco efecto sobre la respuesta. Se caracteriza por su forma en 'S', con dos asíntotas y una pendiente que indica cómo las variaciones en la concentración afectan la respuesta farmacológica (**Figura 15a**). El modelo sigmoidal ayuda a identificar y comparar la potencia entre diferentes fármacos (Aguirre et al., 2010; Farinde et al., 2022) (**Figura 15b**).

Figura 15 Curva sigmoideal dosis-respuesta de fármacos.

Nota: **a.** La gráfica refleja en eje vertical (Efecto), indica el grado de efecto farmacológico obtenido con el fármaco. El eje horizontal (log Concentración), representa el logaritmo de la concentración del fármaco. El uso de una escala logarítmica permite apreciar mejor el rango de concentraciones, especialmente cuando este es amplio. El efecto (o eficacia) máximo (E_{max}), representa el efecto máximo que puede producir el fármaco; es el techo de la curva, indicando que no se obtiene un mayor efecto, aunque se aumente la dosis del fármaco. La concentración efectiva 50 (CE_{50}) es la cantidad del fármaco que induce el 50% del máximo efecto deseado. Esta medida es un indicador de la potencia del fármaco; a menor CE_{50} , mayor potencia. La pendiente indica la velocidad con la que aumenta el efecto farmacológico con el incremento de la concentración del fármaco. **b.** Comparación de las curvas dosis-respuesta de los fármacos X, Y y Z. El fármaco X tiene mayor actividad biológica por equivalente de dosis y, por lo tanto, es más potente que los fármacos Y o Z. Los fármacos X y Z tienen la misma eficacia, indicada por su respuesta máxima alcanzable (efecto techo). El fármaco Y es más potente que el Z, pero su eficacia máxima es menor. Gráfica modificada de Aguirre et al., 2010 y Farinde et al., 2023.

La relación dosis-respuesta, en la que intervienen los principios de la farmacocinética y la farmacodinámica, determina la dosis y la frecuencia necesarias, así como el índice terapéutico (IT) de un fármaco en una población. El IT es la relación entre la concentración tóxica mínima y la CE_{50} y ayuda a determinar la eficacia y la seguridad de un fármaco. Aumentar la dosis de un fármaco con un valor de IT pequeño aumenta la probabilidad de toxicidad y/o ineficacia del fármaco. Estas características difieren según la población y se ven afectadas por factores relacionados con el paciente como la edad, el embarazo, y la función orgánica (p. ej., renal, cardíaca). Esta característica es crucial para identificar la dosis óptima que proporciona el máximo beneficio terapéutico minimizando el riesgo de efectos adversos, lo que garantiza un tratamiento seguro y eficiente (Zang et al., 2016).

Los ensayos de dosis-respuesta han sido cruciales en la evaluación de tratamientos tópicos. Algunos ejemplos se encuentran en estudios realizados con la crema de benvitimod para la psoriasis (Zang et al., 2016), la crema de imiquimod para el carcinoma (Marks et al., 2001) y el minoxidil tópico para la alopecia (Shupack et al., 1987). Estos ensayos se han utilizado estratégicamente para optimizar el tiempo y los recursos en el desarrollo, facilitando la integración cuantitativa de información y la toma de decisiones clínicas con muestras de tamaño reducido a lo largo de las fases clínicas. El método de exposición-respuesta es una técnica empleada que consiste en la identificación de una dosis inicial adecuada y en la determinación de cómo ajustar la dosis de manera óptima para cada paciente. Este enfoque implica un análisis detallado de los parámetros farmacocinéticos, y farmacodinámicos. La "exposición" hace referencia a la dosis administrada al cuerpo y a las mediciones de la concentración del fármaco en el plasma y otros fluidos biológicos, expresándose en términos que incluyen concentración máxima (C_{max}), concentración mínima (C_{min}), concentración en estado estable (C_{ss}) y área bajo la curva (AUC). Por su parte, "respuesta"

alude a la medición directa del efecto farmacológico del fármaco, abarcando un extenso conjunto de resultados o biomarcadores. Estos pueden ser biomarcadores indirectos asociados con un efecto potencial o establecido, y una variedad de efectos clínicos, ya sean a corto o largo plazo, que se relacionan con la eficacia o la seguridad del tratamiento (FDA, 2003). Los modelos de exposición-respuesta se utilizan para simular y predecir los resultados de futuros ensayos, evaluar diversas estrategias y diseños de ensayos clínicos antes de su ejecución, acelerar el desarrollo de medicamentos y contribuir al control de los costos de los estudios clínicos (Lalonde et al., 2007; Zang et al., 2016).

En este capítulo nos propusimos establecer un modelo experimental en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* para poder cuantificar dos efectos importantes de la enfermedad como fueron el tamaño de las lesiones, expresado en mm², y la carga parasitaria de las lesiones expresados en concentración de parásitos/ lesión. Dado los resultados obtenidos con el tratamiento tópico con 0,5% de MTF (una dosis/día por 21 días) (Neira et al., 2019), quisimos determinar la relación de diferentes dosis (0,06, 0,17, 0,5 y 1,5 % de MTF) con la respuesta (reducción de lesión o de carga parasitaria) asociada con el tratamiento tópico con MTF. Se mostrarán datos importantes que podrán contribuir a la optimización del uso tópico de MTF en LC-NM.

2.2 Metodología

Se presenta un estudio de tipo experimental realizado en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*. En la primera fase se estandarizó el modelo murino de infección con *Leishmania* y en la segunda se determinó el efecto de diferentes concentraciones de MTF en el tamaño de las lesiones y carga parasitaria (ensayo dosis respuesta). La tipificación de la cepa se realizó en el laboratorio de genómica funcional del Instituto Rene Rachou- Fiocruz/MINAS, Brasil. Los

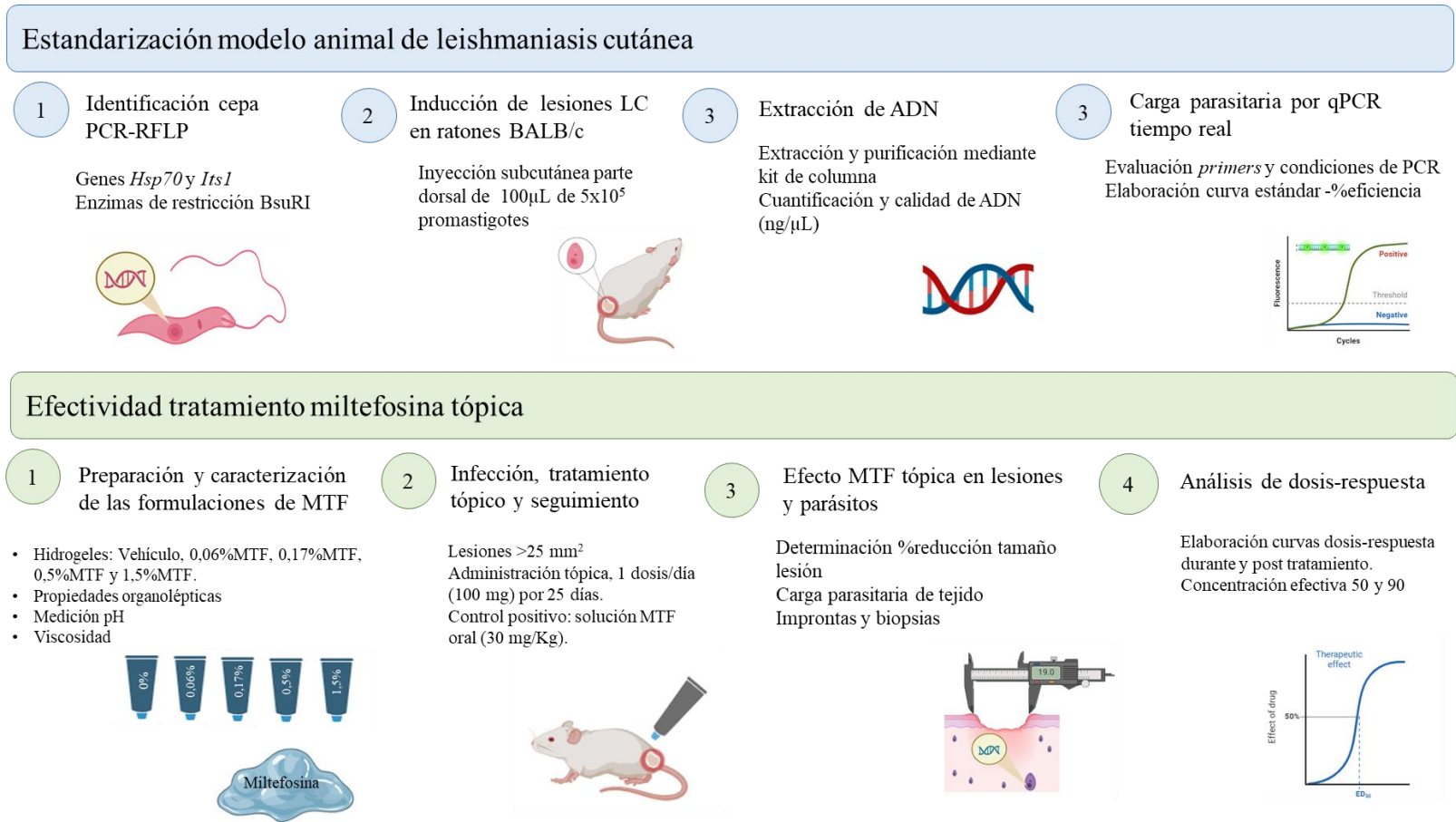
ensayos *in vivo* se realizaron en la Unidad Experimental en Animales (UEA), Sede UIS Guatiguará, la preparación de los hidrogeles en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP-UIS, y el estudio histológico en el Laboratorio del Departamento de Patología, Escuela de Medicina de la UIS, con el apoyo y asesoría del profesor Julio Cesar Mantilla. Todos los experimentos fueron avalados por el Comité de Ética de la UIS (CIENCI). En la **Figura 16** se muestra el diseño metodológico desarrollado en este capítulo.

2.2.1 Estandarización del modelo experimental

2.2.1.1 Ratones

Se utilizaron ratones hembra BALB/c procedentes del Instituto Nacional de Salud, de 10 a 12 semanas de edad y masa corporal de 20 g. Los animales fueron mantenidos en la UEA a temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con agua y comida *ad libitum*, humedad relativa ambiental del 50–70%, luminosidad de ciclos luz/oscuridad de 12 h. Todos los ensayos fueron realizados con la aprobación del CEINCI de la UIS (Acta N.23 del 10 de diciembre 2019), y la Resolución 008430 de 1993 Título V, que refiere a la investigación biomédica con animales. Se tuvieron en cuenta aspectos como la pérdida de peso, cambios en el comportamiento y estrés, signos de dolor y los principios de las 3R: reemplazo, reducción y refinamiento.

Figura 16 Diseño metodológico del capítulo 2



Nota: La grafica muestra una primera parte donde se estandariza el modelo de infección en ratones BALB/c y una segunda parte en la cual se evalúa la efectividad de un tratamiento tópico con diferentes concentraciones de MTF.

2.2.1.2 Parásitos

Los parásitos de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/LV78) fueron mantenidos a 28 °C en medio de cultivo Schneider's suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado con calor.

2.2.1.3 Identificación de cepa de *Leishmania* mediante el método PCR-RFLP

La especie fue confirmada por PCR-RFLP, utilizando las cepas de referencia *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) y *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) suministradas por la Profesora Silvane Fonseca Murta de la Colección de *Leishmania* del Instituto Rene Rouchou FIOCRUZ-MINAS. El ADN de la cepa utilizada fue extraído a partir de 10⁷ promastigotes en fase logarítmica de crecimiento, utilizando el reactivo DNAzol™ (Invitrogen). La cantidad y calidad de ADN se realizó utilizando un lector multi-modal Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc, VT, USA) a 260 nm y 280 nm. Se realizó la amplificación de genes conservados en *Leishmania*: proteínas de choque térmico en (HSP70) y espaciador transcrito interno (ITS1) mediante PCR convencional. La mezcla de reacción (25 µL) contenía 10 mM de dNTP Mix; 10X buffer PCR de alta fidelidad (Invitrogen); 50 mM de MgSO₄; 5 U/µL de la enzima polimerasa de alta fidelidad (Platinum® Taq DNA, Invitrogen), 10µM de cada *primer* y 10 ng/µL del ADN obtenido de los aislamientos. Se incluyó en todos los experimentos agua destilada como control negativo y, ADN de *L. (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/75/M2903, como control positivo. Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador convencional (Applied Biosystems). El protocolo consistió en la desnaturalización inicial (a 94 °C, durante 5 min) seguida de 35 ciclos de desnaturalización (a 94 °C durante 15 s), hibridación (a 64 °C durante 30 s) y extensión (a 68 °C durante 3 min), con una extensión final a 68 °C durante 5 min. La amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinte de ácidos nucleicos fluorescente (GelRed®, Biotium) a 3,5 V/cm durante

30 min. (Schönian et al., 2003; Garcia et al., 2004). Los *primers* utilizados en este estudio se muestran en la **Tabla 6**. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en agarosa TBE al 2% a 100 V en tampón TBE 0,5% (Tris-borato 0,045 M, EDTA 1 mM) y tinte de ácidos nucleicos fluorescente, se visualizaron bajo luz ultravioleta. Los productos de PCR (10-15 μ L) se llevaron a digestión utilizando la enzima de restricción BsuRI (HaeIII, Thermo Scientific™) HaeIII utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Los fragmentos de restricción se llevaron a electroforesis en gel de agarosa TBE al 4% a 100V y fue visualizada bajo luz ultravioleta. Las bandas obtenidas fueron comparadas con las bandas obtenidas de las cepas de referencia.

2.2.1.4 Infección de los ratones

Los ratones fueron infectados en la región lumbosacra, 4-6 mm arriba de la base de la cola con promastigotes de *L. amazonensis* en fase estacionaria de crecimiento en una concentración de 5×10^5 parásitos/100 μ L de tampón de fosfatos (PBS) a pH 7,0, vía subcutánea. La infección fue realizada sin sedación, ya que los ratones no manifestaban signos de dolor. Los parásitos fueron pasados al menos una vez a través de ratones antes de realizar el estudio para minimizar la pérdida de virulencia después de un cultivo *in vitro* prolongado.

2.2.1.5 Evaluación de la infección, sacrificio de los ratones y recolección de muestras

El seguimiento del tamaño de las lesiones y características (nódulo y/o úlcera) se llevó a cabo llevando un registro fotográfico y mediciones de las lesiones utilizando un medidor digital (Tracedable®, VWR, Radnor, USA). El tamaño de la lesión fue calculado en mm^2 teniendo en cuenta la medida del diámetro longitudinal y transversal (área lesión = eje mayor x eje menor x π). Estas mediciones fueron realizadas semanalmente desde que los ratones empezaron a mostrar las lesiones, durante el tratamiento y hasta el final del experimento. Se determinó la velocidad de

crecimiento de las lesiones mediante el cociente de la resta de los valores de tamaño y tiempo de evolución de las lesiones ($\text{mm}^2/\text{día}$). Los resultados fueron expresados como el promedio \pm DS del tamaño de lesión (mm^2). Los animales fueron anestesiados utilizando una mezcla de anestésicos vía intraperitoneal de 12,5 mg/kg de xilacina (Virbac, México) y 87,5 mg/kg de ketamina (Holliday-Scott S.A, Buenos Aires, Argentina) y la eutanasia fue realizada mediante dislocación cervical. Se prepararon frotis de las lesiones las cuales fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa para la detección microscópica de parásitos. Además, se recolectaron fragmentos de la lesión distribuyendo en recipientes con una solución de formalina tamponada al 10% (pH 7,0) para estudios histopatológicos y en recipientes secos para determinar la carga parasitaria.

2.2.1.6 Procesamiento y análisis de parásitos en biopsias

Los fragmentos de lesión fijados con formalina fueron embebidos en parafina. Cortes de 5 μm fueron realizados con un micrótopo 2135 (Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, USA) y colocados sobre una lámina portaobjetos. Estos fueron desparafinados y posteriormente coloreados con H&E para ser analizados microscópicamente. Los resultados fueron expresados utilizando una escala semicuantitativa de clasificación: -, ausencia, +, leve; ++, moderado; +++, severo para la presencia y ausencia de parásitos en la dermis.

2.2.1.7 Carga parasitaria en lesiones de LC

Primers

Se utilizaron los *primers* reportados por Van Bocxlaer et al., 2018. La secuencia de la región 170-bp en el gen 18S ADN ribosomal fueron específicos para todas las especies de *Leishmania*. Las respectivas secuencias se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6 Secuencias de *primers* utilizados en la técnica de PCR para la amplificación de ADN de *Leishmania spp*

Gen	Primer	Secuencia	Ref
ITS1 (300 a 350 pb)	FW	5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'	El Tai et al., 2000
	RV	5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'	
HSP70 (~1300 pb)	FW	5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3'	Garcia et al., 2004
	RV	5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3'	
18s rADN (170-pb)	FW	5'-C CAA AGT GTG GAG ATC GAA G-3'	Van Bocxlaer et al., 2018
	RV	5'-GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3'	

Nota: FW: *forward*; RV: *reverse*

Extracción de ADN de lesiones de LC

Las secciones de las lesiones fueron descongeladas y pesadas. El ADN se extrajo utilizando el kit comercial de extracción de ADN en sangre y tejido DNeasy® (Qiagen). Brevemente, le agregaron 20 µL de proteinasa K y 180 µL de tampón ATL a 10 mg de tejido y se dejaron a 56 °C en baño María durante toda la noche. Después de agitación en Vórtex se agregaron 200 µL de tampón AL e incubó 10min a 56 °C. El ADN fue precipitado adicionando etanol y la muestra se transfirió a una columna giratoria del kit. El ADN se retuvo en la columna durante varios lavados y por último se eluyó en 200 µL de tampón AE. Se obtuvieron alícuotas de 50 µL de ADN las cuales fueron almacenadas en viales de 1,0 mL a -20 °C.

Cuantificación y calidad de ADN

La pureza y la concentración de ADN fue determinada mediante espectrofotometría utilizando un lector Multi-Modal Sinergy TM (BioTek, Vermont, USA). Se agregaron 2 µL de muestra en la placa *Take3*, se utilizó como blanco el buffer AE. La concentración de ADN de la muestra se

calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Para determinar la pureza del ADN obtenido de las lesiones de piel se estableció la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} , la cual indica que un ADN de pureza óptima tiene valor entre 1,8–2,0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1,6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1,6$ indica posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un ratio $A_{260}/A_{280} > 2,1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra (Programa de control de calidad de ácidos nucleicos, Banco Nacional de ADN Carlos III, Universidad de Salamanca, www.bancoadn.org, 2010).

Optimización y validación de primers para la qPCR en la detección de parásitos

Para la optimización de los *primers* utilizados en la qPCR se evaluaron diferentes temperaturas (60 y 62 °C) y concentraciones (0,3 a 0,8 μM) para identificar la temperatura de anidamiento (T_m) y concentración óptima para la anexión de los *primers*. Se llevó a cabo una qPCR para confirmar la presencia de amplificadores del tamaño correcto y verificar la eficiencia de los *primers*. Se amplificó 1 μL de ADN de cultivo de parásitos en un volumen final de 20 μL , que contenía 10 μL de enzima PowerUp™ SYBR® *Green Master Mix* y 9 μL de *primers* a concentraciones entre 0,3 a 0,8 μM . Las muestras fueron procesadas en un termociclador Applied Biosystems™ QuantStudio 5. Las condiciones de amplificación utilizadas consistieron en una desnaturalización inicial con dos pasos: a 50 °C por 2 min y a 95 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg y una extensión entre 60 y 62 °C por 1 min. Cada corrida incluyó una muestra negativa (agua MilliQ). En la qPCR, se observó la amplificación de la muestra de ADN, obteniendo valores de Ct (ciclo umbral) que representaron el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal fluorescente generada por la PCR alcanzara un umbral predefinido. Además, al amplificado se le realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,7%,

y luego se tiñó con EZ-VISION® y se visualizó bajo luz UV. Se utilizó el marcador de tamaño de fragmentos de ADN Thermo Scientific GeneRuler 100bp DNA Ladder para la estimación del tamaño de los fragmentos amplificados.

Curva estándar de concentraciones de parásitos versus valores ciclo umbral Ct

Los promastigotes de *L. amazonensis* se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 min a 3000 g. El número de parásitos se determinó microscópicamente utilizando una cámara de Neubauer, procediendo luego a realizar diluciones en serie de diez veces, desde 1×10^8 parásitos/mL hasta 1 parásito/mL. El ADN se extrajo utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen y se determinó la cantidad y pureza del ADN tal como se explicó anteriormente. Se llevaron a cabo reacciones de qPCR en tiempo real para las diluciones de ADN registrando los valores de Ct correspondientes. Cada reacción se realizó por triplicado en dos ensayos distintos. Se calculó el coeficiente de variación interensayo utilizando la fórmula $CV = (\sigma/\mu) * 100\%$, donde σ denota la desviación estándar y μ el promedio de los datos obtenidos. Se construyó la gráfica de la curva estándar trazando los valores de Ct en función de la concentración de las diluciones conocidas, observándose una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de parásitos y los valores de Ct. La eficiencia del PCR se determinó aplicando la fórmula: % Eficiencia = $[(10^{(-1/\text{pendiente})}) - 1] \times 100\%$, calculado por el software QuantStudio Design and Analysis v.1.4.3.

2.2.2 Efecto de diferentes dosis de MTF en el tamaño de las lesiones y en la carga parasitaria

2.2.2.1 Medicamentos y reactivos

La MTF se obtuvo de Gold Biotechnology® (St Louis, MO, EE. UU) y el Carbopol®940, benzoato de sodio, trietanolamina y medio de cultivo Schneider se adquirieron de Sigma-Aldrich

(St Louis, MO, EE. UU). El DMSO se adquirió de Carlo Erba Reagent (Rodano, Italia) y el suero bovino fetal (SBF) de Gibco (Grand Island, NY, EE. UU.).

2.2.2.2 Preparación y caracterización de las formulaciones de MTF

Se prepararon formulaciones semisólidas tipo hidrogel conteniendo MTF en concentraciones de 0,06, 0,17, 0,5 y 1,5% p/v como se describen en el Capítulo 1, sección 2.4. El polímero gelificante carbopol (1% p/v) se disolvió en agua destilada y benzoato de sodio al 0,1%. La MTF, en las diferentes concentraciones, se disolvieron en el DMSO. Se mezclaron las dos fases mediante agitación continua y la solución se neutralizó gota a gota con trietanolamina hasta que se formó un sistema coloidal semisólido transparente. Se preparó un hidrogel sin MTF (vehículo). Los hidrogeles se inspeccionaron visualmente para determinar su color, homogeneidad, consistencia y separación de fases. La consistencia se estableció subjetivamente como se describe en el Capítulo 1, sección 1.2.5.1, los hidrogeles fueron clasificados como semilíquidos o semisólidos. El pH se midió usando un medidor de pH digital (Ohaus Starter 3100, New Jersey, EE. UU.), los valores por debajo de 7, a 7 y por encima de 7 se consideraron ácidos, neutros y alcalinos, respectivamente. Los resultados de pH fueron expresados como la media \pm DE. La viscosidad se midió usando un viscosímetro (Atago, Japón), los resultados de fueron en centipoise (cps). Las formulaciones fueron conservadas a 4 °C protegidos de la luz en frascos de vidrio ámbar sellados con cinta parafinada para evitar la desecación.

2.2.2.3 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se calculó utilizando software G Power (*Statistical Power Analyses 3.1.9.4 for Windows*). Se calculó asumiendo un α de 0,05 y un poder de prueba del 80% utilizando la siguiente formula derivada de la prueba t: $n = 1 + 2C \left(\frac{s}{d}\right)^2$, donde n es el tamaño de muestra,

C una constante seleccionada para el nivel de significancia y poder de prueba, s desviación estándar poblacional, d es la diferencia de las medias detectadas del área bajo la curva.

2.2.2.4 Grupos (G) experimentales, esquema de tratamiento, cálculo de las dosis aplicadas de MTF

Los ratones infectados se distribuyeron aleatoriamente en 7 grupos experimentales ($n = 6-8$ ratones). Los grupos G1-5 fueron tratados con el vehículo y cada concentración de MTF por 25 días, el G6 con MTF 30 mg/kg oral/15 días (control positivo) y el G7 se mantuvo sin tratamiento (control negativo), para descartar cura espontánea de las lesiones. Teniendo en cuenta el peso molecular de la MTF, que cada dosis fue aplicada en 100 mg sobre la lesión y que se aplicaron dosis por 25 días, a partir de la concentración final del hidrogel (0 a 1,5% p/v de MTF) se calcularon la concentración de MTF (mM) utilizadas en cada dosis (**Tabla 7**).

Tabla 7 Grupos experimentales utilizados en el capítulo 2.

Grupo	n	Hidrogel (MTF %)	MTF (mM) dosis/día*	MTF (mM) dosis/25 días**	Vía de aplicación	N Dosis	Días p.t.
1	6	0	0	0			
2	8	0,06	1,47	36,8			
3	8	0,17	4,17	104,2	Tópica	25	
4	6	0,5	12,26	902,08			60
5	8	1,5	36,80	306,5			
6	6	Solución MTF	30 mg/kg	450 mg/kg***	Oral	15	
7	6	Ninguna	-	-	-	-	-

Nota: *n*: número de animales; p.t.: post tratamiento; *Concentración MTF diaria administrada (100 mg de hidrogel) en las lesiones; **Concentración final de MTF administrado tópicamente en los 25 días de tratamiento; ***Concentración final de MTF administrado oralmente en los 15 días de tratamiento.

Cuando las lesiones (nódulos y/o úlceras) tenían un área entre 15 y 65 mm² fueron tratados tópicamente directamente sobre las lesiones con los hidrogeles (100 mg, una dosis día/25 días). El control positivo MTF solución 30 mg/kg fue preparada en PBS, pH 7,2 y administrada vía oral utilizando una cánula de alimentación calibre 22G (una dosis 100 µL día/15 días). Los ratones fueron observados para determinar cambios en el comportamiento y signos del estrés, además se pesaron y se les midieron las lesiones durante y después del tratamiento. Se calculó el área (mm²) de las lesiones. Después del tratamiento (60 días p.t.) los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina y sacrificados por dislocación cervical. Se tomaron improntas y biopsia de lesión.

2.2.2.5 Efecto de las diferentes dosis de MTF y los controles en la reducción de lesiones y parásitos

Para determinar el efecto de los tratamientos en las lesiones se midió el tamaño de las lesiones semanalmente hasta por 60 días p.t. según lo descrito en Vera et al.,2021. A partir de estos datos se determinaron los porcentajes de reducción del tamaño de la lesión (% RLesión) en cada ratón según la siguiente ecuación $\% R_{\text{Lesión}} = [(AL_{\text{antes}} - AL_{\text{después}}) \times 100] / AL_{\text{después}}$, donde AL_{antes} y $AL_{\text{después}}$ representan el área de la lesión (mm²) antes del tratamiento, durante y después del tratamiento.

El efecto de las diferentes concentraciones de MTF en los parásitos se determinó de las improntas, biopsias y carga parasitaria de las lesiones o de la cicatriz obtenidas después de 60 días p.t. Las improntas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Las biopsias fueron procesadas como se describió en anteriormente. El número de amastigotes por campo microscópico ($\times 400$) se calificó semi-cuantitativamente de la siguiente manera: 1 a 5 parásitos (+), pocos; 6 a 10 parásitos (++) , moderados; o 11 a 20 parásitos (+++) , aumentados.

La carga parasitaria fue determinada mediante qPCR. Se obtuvo el ADN de las lesiones utilizando la metodología descrita en la sección 2.1.7.2. Se realizó qPCR en tiempo real bajo las siguientes condiciones desnaturalización inicial a 50 °C por 2 min y a 95 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 seg y una extensión entre 60 °C por 1 min. El cálculo de la carga parasitaria de las lesiones de los ratones se obtuvo a partir de los Ct de las muestras y la ecuación de la recta de la curva estándar mediante la ecuación: Carga parasitaria=10 (Ct-intersección de la curva estándar) /pendiente). Los resultados fueron expresados como la media \pm DS de la concentración de parásitos por lesión.

A partir de los datos de carga parasitaria se determinaron los (% RParásitos) en cada ratón según la siguiente ecuación (% RParásitos) = $[(NP_{\text{antes}} - CP_{\text{después}}) \times 100] / NP_{\text{después}}$, donde NP_{antes} y $NP_{\text{después}}$ representan el número de parásitos antes y después del tratamiento.

2.2.3 *Análisis dosis-respuesta de la MTF*

Teniendo en cuenta los % Rlesión y del % RParásitos en cada de las concentraciones de MTF, se determinó la dosis efectiva 50 y 09 (DE)_{50/90}, definida como la concentración de MTF tópica que reduce el 50% y el 90% del tamaño de las lesiones o carga parasitaria. La DE₅₀ se calculó por regresión sigmoideal utilizando el software Mxslfit™ (ID Business Solution, UK). Se

realizaron graficas de curvas dosis-respuesta y DE_{50} durante el tratamiento y p.t. teniendo en cuenta los tamaños de lesión y curvas dosis respuesta y DE_{50} p.t. de la carga parasitaria.

2.2.4 Eficacia estética y parasitológica

En cada G experimental se determinó la eficacia estética (Ee) de los tratamientos determinando el porcentaje de ratones que redujeron el tamaño de las lesiones entre 75 y 100% en los diferentes tiempos de evaluación. Igualmente se determinó la eficacia parasitológica (Ep) de los tratamientos determinando el porcentaje de ratones que redujeron el número de parásitos a cero en el análisis microscópico de improntas y biopsias y en la determinación de la carga parasitaria.

La respuesta al tratamiento (eficacia final, Ef) se realizó teniendo en cuenta la clasificación según Wortmann et al., 2002 donde, eficacia completa (100% de reducción, 100% de re-epitelización y ausencia de parásitos); parcial (75-99% de reducción); estable (0-74% reducción); no efectivo (aumento de las lesiones).

2.2.5 Análisis de resultados

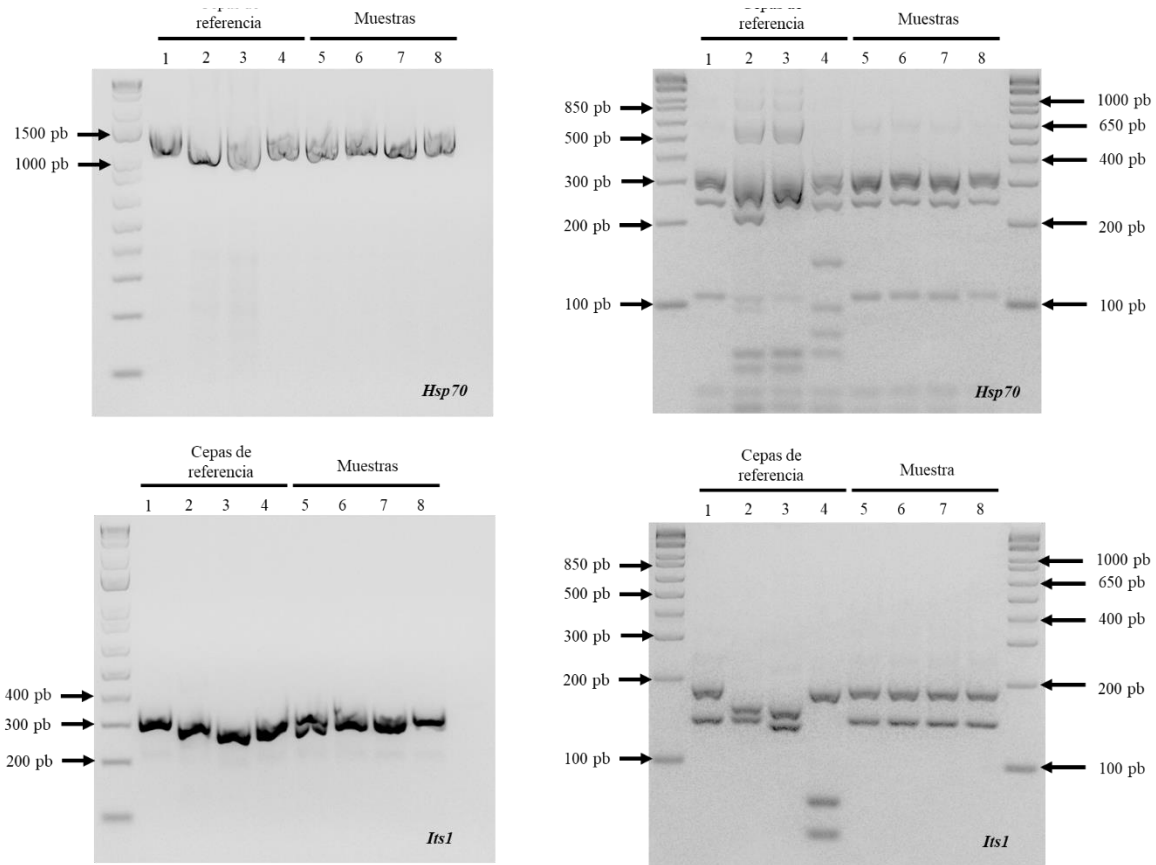
La normalidad de los datos tamaños de lesiones y carga parasitaria se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos de tamaño de lesiones y carga parasitaria se analizaron utilizando GraphPad Prism v.8.2.0. La significancia estadística se fijó en $p < 0,05$. En la evolución de las lesiones y carga parasitaria *in vivo* se realizó la prueba ANOVA de una sola vía y las pruebas post hoc de múltiple Dunnett's y Kruskal-Wallis para comparar los diferentes grupos experimentales. Para el análisis dosis-respuesta de la MTF tópica en las lesiones se determinó la concentración efectiva 50 y 90 calculadas por regresión sigmoideal utilizando el software Mxlfifit™(ID Business Solution,UK).

2.3 Resultados

2.3.1 Estandarización del modelo murino de LC

2.3.1.1 Verificación especie de *Leishmania* utilizada

A partir del ADN obtenido de cultivos de los promastigotes utilizados en la infección de los ratones, las bandas obtenidas del análisis de RFLP para los genes *Hsp70* y *Its1* fueron compatibles con las cepas de referencia de *L. amazonensis* (**Figura 17**). En todas las muestras de ADN obtenidas de las cepas de referencia y de las muestras utilizadas en este estudio mostraron una pureza óptima entre 1,84 y 1,93.

Figura 17 Identificación cepas de parásitos por el método PCR- RFLP.

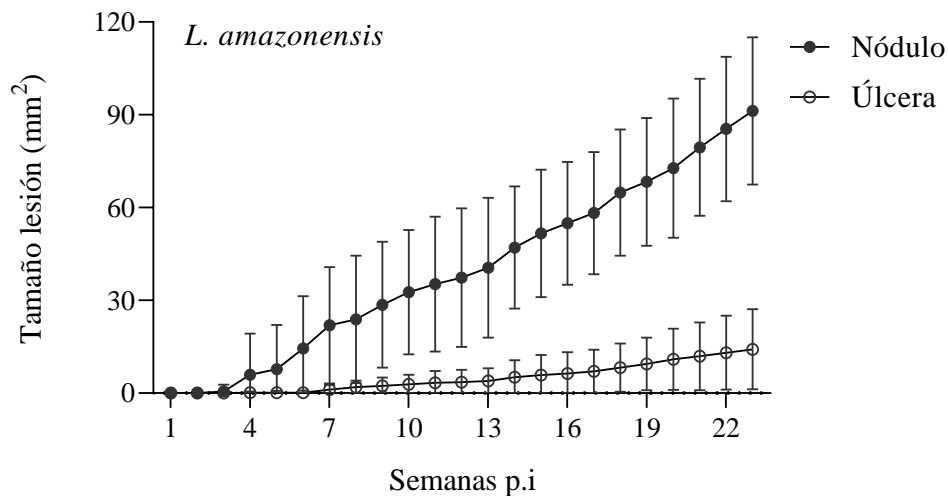
Nota: Las figuras muestran la amplificación (izquierda) y digestión (derecha) con la enzima de restricción HaeIII, de los genes *Hsp70* (arriba) y *Its1* (abajo). Las bandas PCR-RFLP de cepas de referencias corresponden en las líneas 1-4. Línea 1, *L. amazonensis*; Línea 2, *L. braziliensis*; Línea 3, *L. guyanensis*; Línea 4, *L. infantum*. Líneas 5-8, corresponden a muestras de estudio utilizadas en este trabajo. Marcador de peso molecular de bandas 1 kb fue usado.

2.3.1.2 Evolución de las lesiones inducidas por *L. amazonensis*

Después de 4 semanas de la infección los tamaños de las lesiones aumentaron progresivamente. En las semanas 4, 8 y 12 p.i el tamaño promedio de los nódulos en infecciones

fue de $5,96 \pm 3,5$; $23,85 \pm 5,5$; $37,35 \pm 5,9$ mm². El tamaño promedio de las úlceras fue de $0,12 \pm 0,1$; $1,93 \pm 0,5$; $3,57 \pm 1,0$ mm² (**Figura 18**).

Figura 18 Evolución de las lesiones producidas en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*.

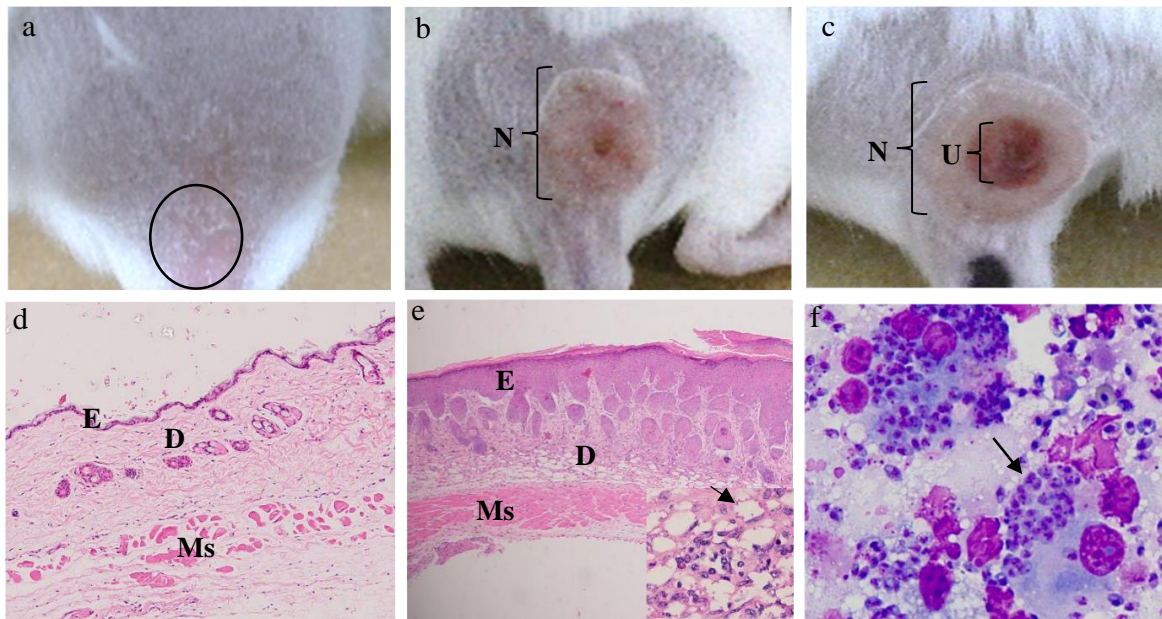


Nota: La figura muestra promedio \pm DE del área (mm²) de los nódulos (puntos negros) y úlceras (puntos vacíos) en diferentes semanas p.i. $n = 14$.

Macroscópicamente las lesiones iniciaron como una pápula la cual se transformó en un nódulo elevado e indurado regular (**Figura 19 a-c**). La formación de úlcera fue evidenciada en el 77,7% de los ratones infectados presentándose una leve a moderada invaginación recubierta de piel con centro eritematoso y con formación de costra (**Figura 19 a-c**). La velocidad de crecimiento promedio del nódulo fue 0,59 mm²/día. En todas las improntas de las lesiones se observaron microscópicamente la presencia de abundantes amastigotes extra e intracelulares (**Figura 19f**). En

las biopsias obtenidas de las lesiones, se observaron cambios estructurales en las diferentes capas de la piel (se discutirán en el capítulo 3). Las lesiones se caracterizaron por la presencia de inf

Figura 19 Modelo de LC en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*. de amastigotes (**Figura 19e**). En contraste, la estructura de piel normal (**Figura 19d**) muestra la epidermis con su la capa basal, granulosa y el estrato corneo y la dermis formada por tejido conjuntivo laxo irregular con fibras de colágeno, fibroblastos y macrófagos dispersos. Adyacente se muestra el tejido graso y el muscular (**Figura 19e**).



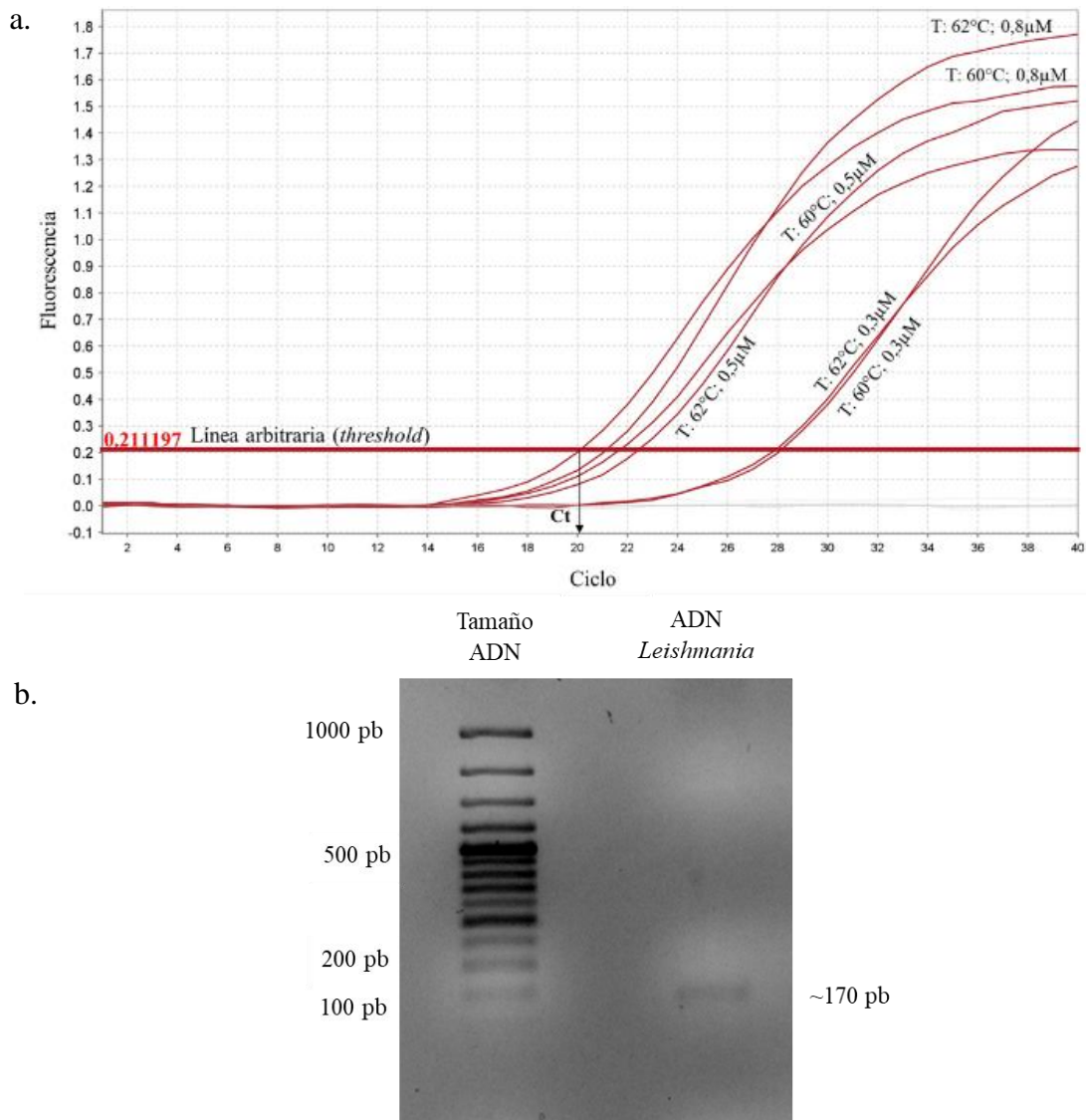
Nota: En la fila de arriba se observan las características macroscópicas de las lesiones post infección, p.i. (a) sitio de inoculación (b) lesión nodular 30 días p.i. y (c) la formación de la ulcera a los 60 días p.i. En la fila de abajo en (d) se muestran las características microscópicas del tejido piel normal sin infección (aumento 100x), (e) tejido infectado (aumento 100x) y el recuadro se muestran macrófagos vacuolados con amastigotes adheridos a la pared (flecha) (aumento 1000x) (f) impronta de la lesión 60 días p.i la flecha indica los amastigotes (aumento 1000x). N, nódulo; U, ulcera; E, epidermis; D, dermis; Ms, músculo.

2.3.1.3 Validación método qPCR

Evaluación de los primers utilizados para qPCR

Los *primers* utilizados en este estudio no mostraron diferencias en la amplificación del fragmento del gen *18s* ADNr, sin embargo, las concentraciones del *primers* (0,8 y 0,5 μ M) mostraron una amplificación eficiente con Ct entre 20 y 22 ciclos para detectar muestras con baja cantidad de ADN parasitario (**Figura 20a**). Además, del amplificado obtenido de la qPCR, al realizar la electroforesis en el gel de agarosa se visualizó una banda de 170 pb la cual corresponde al fragmento del gen *18s* estudiado (**Figura 20b**).

Figura 20 Evaluación de los primers en la amplificación del gen 18S del ADNr de *Leishmania*.



Nota: (a) Curva de amplificación: La gráfica muestra la relación entre los ciclos de amplificación y la fluorescencia (indicativo de la cantidad de producto amplificado) utilizada en la optimización de la temperatura de anidamiento y la concentración de los *primers* durante la qPCR. La línea *threshold* indica el umbral de detección, un nivel predefinido de fluorescencia que marca el punto donde se considera que la señal es mayor que el ruido de fondo y ciclo umbral (Ct), indica el ciclo específico en el que la fluorescencia del producto amplificado cruza el *threshold*. (b)

Determinación del tamaño del producto amplificado: la imagen exhibe una banda en un gel de agarosa, evidenciando un fragmento de aproximadamente 170 pb, correspondiente al producto amplificado del gen *18S* obtenido mediante qPCR.

Curva estándar

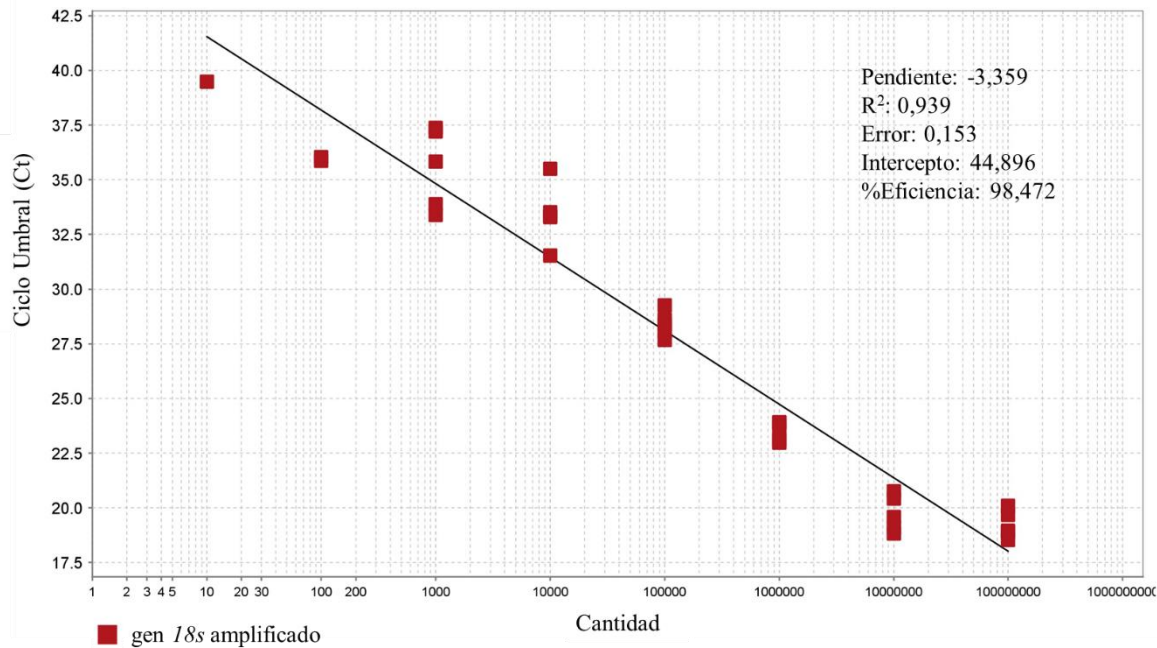
Las curvas estándar ($n=2$) de la qPCR para la amplificación del ADN del gen *18s* de *Leishmania*, fueron lineales en un rango de concentraciones de parásitos (1×10^8 a 1×10^2 ADN parásitos/reacción). Estas curvas presentaron un error estándar de 0,153 y un coeficiente de correlación (R^2) de 0,939, con una pendiente de -3,359, lo que indica una eficiencia del 98,47% (**Figura 21**). Para evaluar la precisión y reproducibilidad del ensayo, se calculó el coeficiente de variación (CV) basado en los valores Ct obtenidos para cada concentración de parásitos, tanto en réplicas técnicas (reproducibilidad intra-ensayo) como en dos ensayos independientes (reproducibilidad inter-ensayos). Los valores de CV para las réplicas técnicas oscilaron entre 0,3 y 5,9%, mientras que en los ensayos independientes variaron de 0,1 a 6,4% (**Tabla 8**). Bajo las condiciones específicas establecidas para cada ensayo de qPCR, no se observó amplificación en la muestra de control negativo ni en el blanco del ensayo, confirmando la especificidad del método de cuantificación de la carga parasitaria.

Tabla 8 *Coefficiente de variación (CV) de las réplicas intra-ensayo e inter-ensayos.*

Reproducibilidad intra-ensayo		Reproducibilidad
Ensayo 1	Ensayo 2	inter-ensayos

No. de parásitos DNA equivalentes/ reacción	media			media			media		
	Ct	DE	CV	Ct	DE	CV	Ct	DE	CV
1 x 10 ⁸	19,04	0,6	3,1	19,52	0,80	4,1	19,28	0,3	1,8
1 x 10 ⁷	19,56	1,0	5,3	20,01	0,60	3,0	19,79	0,3	1,6
1 x 10 ⁶	23,80	0,2	0,8	23,03	0,08	0,3	23,41	0,5	2,3
1 x 10 ⁵	28,75	0,4	1,6	27,86	0,26	0,9	28,30	0,6	2,2
1 x 10 ⁴	33,46	2,0	5,9	33,41	0,15	0,4	33,43	0,0	0,1
1 x 10 ³	36,80	0,8	2,3	33,63	0,36	1,1	35,22	2,2	6,4
1 x 10 ²	-	-	-	35,95	0,11	0,3	35,95	-	-
1 x 10 ¹	-	-	-	39,49	-	-	39,49	-	-

Nota: Ct, ciclo umbral; DE: desviación estandar; Coeficiente de Variación intra e inter ensayos [CV = (DE/media) × 100]. La variación intraensayo, cada dilución de la curva estandar se probó por triplicado. La variación interensayo se realizó de 2 corridas experimentales independientes.

Figura 21 Curva estándar para la cuantificación de carga parasitaria por qPCR.

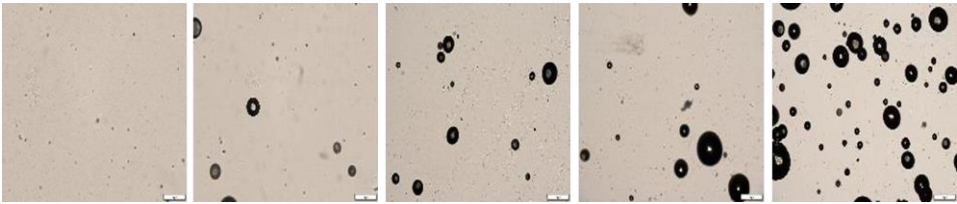
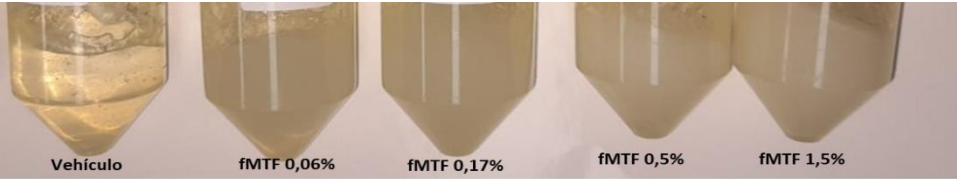
Nota: Esta gráfica representa la relación entre el ciclo umbral (Ct) y la concentración conocida de ADN parasitario (copias de ADN por reacción) para el gen *18s* de *Leishmania*. Cada punto en la curva corresponde a la media de los valores Ct obtenidos de réplicas técnicas ($n=3$) para cada concentración de ADN parasitario estándar, que varía de 1×10^2 a 1×10^8 copias por reacción. La línea de tendencia, representada por la línea sólida, muestra una correlación positiva con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,939, indicando una alta precisión y eficiencia del ensayo de qPCR para cuantificar la carga parasitaria. La pendiente de la línea de tendencia se utilizó para calcular la eficiencia de la reacción. Los valores de Ct para las muestras de control negativo y blanco no mostraron amplificación, validando la especificidad del ensayo.

2.3.2 Efecto de las diferentes dosis de MTF en la reducción de las lesiones y parásitos

2.3.2.1 Características fisicoquímicas de los hidrogeles

Los hidrogeles de MTF y el vehículo mostraron un aspecto traslucido homogéneo, incoloro y con formación de gran cantidad de burbujas al aumentar la cantidad de MTF. Presentaron un pH entre $5,84 \pm 0,53$ y $7,56 \pm 0,05$, viscosidad entre 0,82 y 1,38 cps y una consistencia semisólida a las 24 h después de la preparación. En la visualización al microscopio, se observaron burbujas de aires. No se observó formación de precipitados o acumulación de compuestos sin disolver (**Tabla 9**).

Tabla 9 Formulaciones tópicas utilizadas en el tratamiento de la LC.

	Hidrogeles de 1% carbopol				
	Vehículo	0,06% MTF	0,17% MTF	0,5% MTF	1,5% MTF
Color/Aspecto	Incoloro/traslucido			Incoloro/traslucido formación burbujas	
pH (media±DE)	6,96±0,7	5,84±0,53	6,66±6,69	6,69±0,03	7,56±0,05
Consistencia	Semisólido				
Viscosidad cps	1,14	1,11	0,91	0,82	1,38
MTF (mM)*	0	1,47	4,17	12,26	36,8
Visualización microscopia					
Recién preparado					



Nota: *Concentración MTF diaria administrada en 100 mg de hidrogel sobre las lesiones.

2.3.2.2 Efecto de los tratamientos en la reducción (R) de las lesiones

El promedio tamaño de lesión inicial del G5 tratado con 1,5% MTF o dosis/día de 36,8mM fue de $39,34 \pm 4,3 \text{ mm}^2$. Las lesiones tratadas con 1,5% MTF mostraron un % RLesión del de 61,2% al finalizar el tratamiento (25 dosis) y del 100% los 60 días p.t. A partir del día 16 de tratamiento hasta el día 60 p.t. se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la disminución del tamaño de lesiones con respecto al G1 tratado con el vehículo (**Tabla 10, Figura 22**). En las improntas y la biopsia de piel no se observó presencia de amastigotes (**Figura 23**). Las lesiones tratadas con 0,5% MTF (G4: 12,26 mM) mostraron un % RLesión del 14,5 % a los 8 días de tratamiento, 48,5 % al finalizar el tratamiento, del 70,9 % a los 8 días p.t., observándose la formación de cicatriz de aspecto fibroso e hipopigmentado. Del día 32 p.t. al día 60 p.t. se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la disminución del tamaño de lesiones con respecto al G1: vehículo. En las improntas y en las biopsias no se observaron amastigotes. En las biopsias, se observaron abundante cantidad de fibrosis en la dermis y restos celulares de amastigotes (**Tabla 10, Figura 22 y 23**). Las lesiones tratadas con 0,17% MTF (G3: equivalente a 4,17 mM de MTF) mostraron un % RLesión del 1,9% a los 8 días de tratamiento, 17,2 % al finalizar el tratamiento y de un máximo de 35,5%, a los 24 días p.t. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la disminución del tamaño de las lesiones con respecto al vehículo. En las improntas y biopsias se observaron abundantes amastigotes e

infiltrado inflamatorio difuso (**Tabla 10, Figura 22 y 23**). Las lesiones tratadas con 0,06% MTF no redujeron el tamaño de la lesión ($62,33 \pm 7.0 \text{ mm}^2$) al finalizar el tratamiento, sin embargo, a los 16 días p.t., se observó una reducción del 3.6%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la disminución del tamaño de las lesiones con respecto al vehículo (**Tabla 10 y Figura 22**). En las improntas y biopsias se observaron abundante cantidad de amastigotes e infiltrado inflamatorio difuso (**Figura 23**).

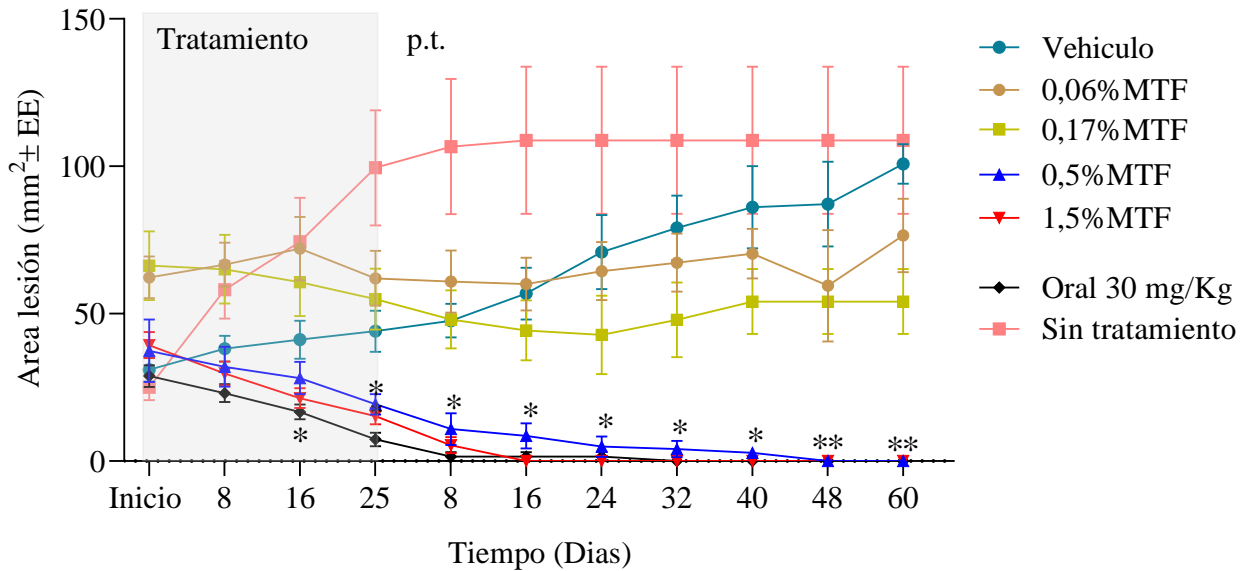
En cuanto al tratamiento oral con MTF (30 mg/kg/día), los animales mostraron un %RLesión del 42,1% al finalizar el tratamiento (15 dosis), alcanzando el 100% de reducción el día 15 p.t. En las improntas y la biopsia de piel no se observó presencia de amastigotes. En el grupo sin tratamiento, se observó un incremento en el tamaño de la lesión de $25,07 \pm 4,3 \text{ mm}^2$ a $138,47 \pm 27,43 \text{ mm}^2$, y presencia de abundante cantidad de amastigotes en las improntas y las biopsias. No se observó cura espontanea de las lesiones (**Figura 22 y 23**).

Tabla 10 Eficacia del tratamiento tópico con diferentes concentraciones de MTF en la reducción de lesiones de LC.

Tiempo (días)	Lesión	Grupo experimental: Concentración MTF (mM)					CE ₅₀	CE ₉₀		
		G1 : 0,0	G2 : 1,47	G3 : 4,17	G4 : 12,26	G5 : 36,8				
Tratamiento	0	mm ² ±EE	30,99±4,5	62,33±7,0	66,29±11,6	37,42±10,5	39,34±4,3	>36,8	>36,8	
		%RL	0	0	0	0	0			
	8	mm ² ±EE	38,16±4,3	66,69±7,4	65,05±11,6	32,02±6,7	29,74±4,0	>36,8	>36,8	
		%RL	0	0	1,9	14,5	24,4			
	16	mm ² ±EE	41,18±6,4	72,08±10,7	60,73±11,5	28,17±5,4	21,35±3,3*	>36,8	>36,8	
		%RL	0	0	8,4	24,7	45,7			
	25	mm ² ±EE	44,07±6,9	62,01±9,2	54,90±10,3	19,26±3,4	15,27±2,8*	18,25	>36,8	
		%RL	0	0,5	17,2	48,5	61,2			
	Post tratamiento	8	mm ² ±EE	47,65±5,7	60,90±10,5	48,06±9,83	10,86±5,3	5,40±2,7*	7,72	>36,8
			%RL	0	2,3	27,5	71,0	86,3		
		16	mm ² ±EE	56,82±8,7	60,05±8,8	44,35±10,1	8,57±4,2	0,0±0,0*	6,27	18,64
			%RL	0	3,7	33,1	77,1	100		
24		mm ² ±EE	70,88±12,5	64,46±9,8	42,77±13,3	4,90±3,4	0,0±0,0*	5,42	13,15	
		%RL								

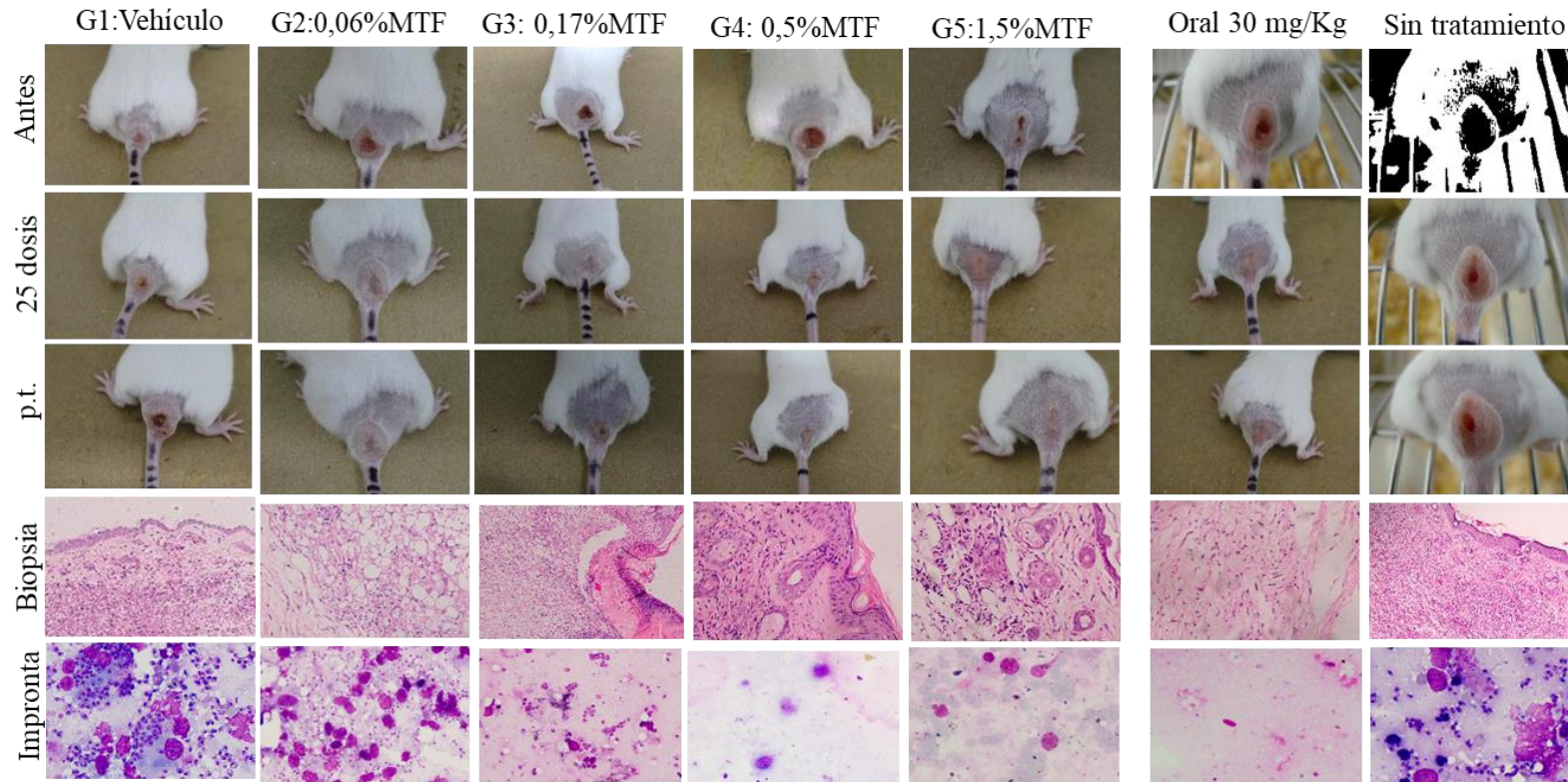
	%RL	0	0	35,5	86,9	100		
32	mm ² ±EE	79,10±10,9	67,32±9,8	47,90±12,6	4,07±2,7*	0,0±0,0*	5,85	12,50
	%RL	0	0	27,7	89,1	100		
40	mm ² ±EE	86,13±13,93	70,36±8,4	54,14±10,6	2,78±1,8*	0,0±0,0*	6,24	11,25
	%RL	0	0	18,3	92,5	100		
48	mm ² ±EE	101,39±11,5	59,47±18,9	102,68±13,2	0,0±0,0*	0,0±0,0**	4,45	4,90
	%RL	0	4,6	0	100	100		
60	mm ² ±EE	nd	76,53±12	nd	0,0±0,0**	0,0±0,0**	4,45	4,90
	%RL	0	0	0	100	100		

Nota: La tabla muestra la evolución del tamaño del área de las lesiones mm² (media ± error estándar) y el porcentaje de reducción de la lesión (%RL) en ratones BALB/c infectados, durante el tratamiento (25 dosis, 100mg/día) y seguimiento p.t. Los valores de CE₅₀ y CE₉₀ indican las concentraciones efectivas de MTF para lograr el 50% y el 90% de reducción de tamaño de lesión, respectivamente. Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una sola vía, seguida de la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples, revelando diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) en comparación con el grupo tratado con vehículo. nd: No determinado

Figura 22 Evolución del tamaño de las lesiones en ratones infectados con *L. amazonensis*.

Nota: La gráfica muestra la progresión del tamaño de las lesiones (mm^2) a lo largo del tiempo en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*. Los grupos de tratamiento incluyen ratones tratados tópicamente (25 dosis, 100 mg/día) con MTF-hidrogeles, vehículo, tratamiento oral (15 dosis, 100 μL /día) y un grupo sin tratamiento. La evaluación del tamaño de lesión en el tiempo se realizó en los días 0 a 25 de tratamiento (recuadro gris) y 8 a 60 días post tratamiento (p.t.). Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una sola vía, seguida de la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples, revelando diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) en comparación con el grupo tratado con vehículo. El tamaño total de la muestra fue de $n=48$ ratones.

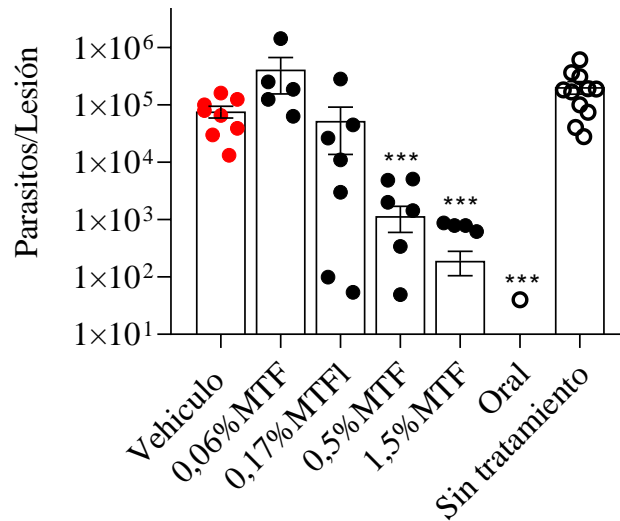
Figura 23 Evaluación de las lesiones, improntas y biopsias en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*.



Nota: La figura presenta una comparación visual entre los diferentes grupos experimentales sometidos a tratamientos con MTF-hidrogeles, vehículo, tratamiento oral y sin tratamiento. Cada columna representa un grupo experimental y su tratamiento correspondiente. Las tres primeras filas muestran registros fotográficos de las lesiones antes del tratamiento, después de 25 dosis (final del tratamiento) y p.t. En la cuarta fila, se muestran imágenes de las biopsias de piel tomadas de los ratones tratados de los diferentes grupos experimentales. La quinta fila exhibe las improntas obtenidas durante el sacrificio de los animales, 60 días p.t. Las imágenes mostradas en la figura son fotografías de un animal representativo de cada grupo experimental.

2.3.2.3 Efecto de los tratamientos tópico en la carga parasitaria

Los resultados de la carga parasitaria para los distintos grupos experimentales se muestran en la **Figura 24**. Se observó una reducción significativa en la carga parasitaria en los animales tratados con 0,5% MTF (1150 ± 550 parásitos/lesión, $p < 0,001$) y 1,5% MTF ($192,7 \pm 87,04$ parásitos/lesión, $p < 0,001$) en comparación con el grupo tratado con el vehículo (76836 ± 17801 parásitos/lesión). Esto representa una disminución del 98,50% y 99,74% en la carga parasitaria, respectivamente. Por otro lado, el grupo tratado con 0,17% MTF evidenció una reducción del 31,52%, con una carga parasitaria de 52613 ± 38822 parásitos/lesión ($p > 0,05$). En contraste, el tratamiento con 0,06% MTF-hidrogel no resultó en una disminución notable, registrando 412701 ± 257718 parásitos/lesión. Además, el tratamiento oral con MTF resultó en una disminución significativa de la carga parasitaria ($p < 0,001$) en comparación con el vehículo, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo tratado con 1,5% MTF-hidrogel ($p > 0,05$).

Figura 24 Evaluación de la carga parasitaria post tratamiento

Nota: La figura muestra la cantidad de parásitos/lesión de ratones 60 días p.t. con MTF hidrogel, vehículo, solución oral (30 mg/kg, 100µL/una dosis diaria/15 días). Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una sola vía, seguida de la prueba post hoc Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples, mostrando diferencias estadísticamente significativas (***) $p < 0,001$, entre los diferentes grupos experimentales MTF hidrogel (círculos negros) y el vehículo (círculos rojos). El grupo de tratamiento oral y sin tratamiento corresponden a los círculos negros vacíos.

2.3.2.4 Análisis dosis-respuesta del tratamiento tópico con MTF en ratones con LC.

Al final del estudio, el tratamiento tópico con MTF mostró un efecto de dosis respuesta en la eficacia estética (disminución del tamaño de las lesiones) y la eficacia parasitológica (**Tabla 11, Figura 25**). A concentraciones de 1,47 mM (gel de 0,06% MTF) no se observaron efectos en los dos parámetros, sin embargo, a 4,17 mM (gel de 0,17% MTF), las lesiones redujeron el 18,3% y la carga parasitaria el 31,52%. La eficacia del tratamiento aumentó en las concentraciones más altas donde a 12,26 mM (gel de 0,5% MTF) y 36,8 mM (gel de 1,5% MTF), redujeron el 100% el

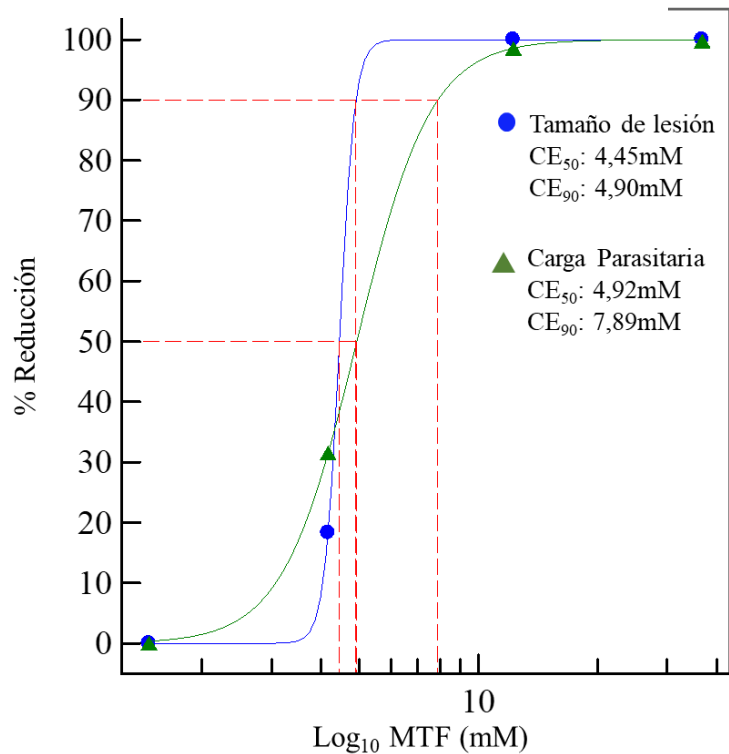
tamaño de la lesión y la carga parasitaria del 98,50% y 99,75%, respectivamente. Los valores de CE_{50} en relación con la reducción del tamaño de la lesión y la carga parasitaria fue de 4,45 mM y 4,93 mM, y los de CE_{90} fueron 4,90 mM y 7,90 mM respectivamente (**Figura 25**).

Adicionalmente, la eficacia del tratamiento tópico con MTF fue evaluada a través de la reducción del tamaño de las lesiones durante y después del tratamiento. En los primeros 16 días de tratamiento se observó una eficacia limitada con una reducción mínima o nula del tamaño de las lesiones (**Figura 26-a, b**). A partir del día 25 (fin de tratamiento), se observó una CE_{50} de 18,25 mM (**Figura 26-c**). En la fase post tratamiento, a los 8 días p.t. se disminuyó la CE_{50} a 7,72 mM y se aumentó la eficacia hasta el 100% (**Figura 26-d**). A partir de los 16, 24, 32 y 60 días p.t. se obtuvieron valores de CE_{50} de 6,27mM, 5,42mM, 5,85mM y 4,45mM y CE_{90} de 18,64 mM, 13,15mM, 12,50mM y 4,90mM, respectivamente, con una eficacia máxima de 100% (**Figura 26e-h**). La disminución de CE_{50} y CE_{90} en el tiempo, indica una mayor potencia a medida que se prolonga el periodo de observación y la eficacia máxima, indica la mayor respuesta posible en % de reducción (cura estética completa) de lesión a partir de día 16 p.t (**Figura 26-i**).

Tabla 11 Evaluación de la eficacia del tratamiento tópico con diferentes concentraciones de MTF.

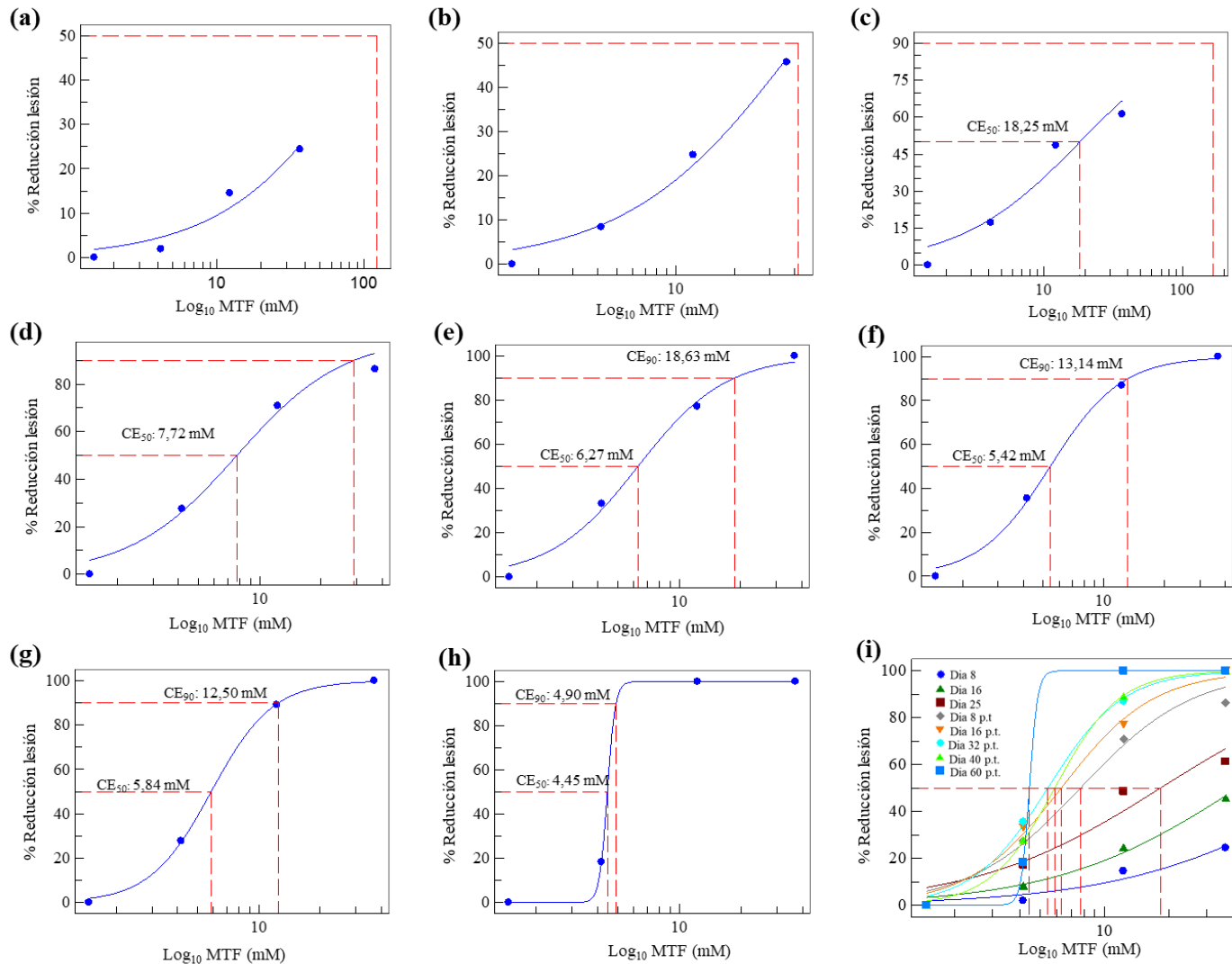
Formulación	MTF (mM)*	n	Eficacia estética			Eficacia parasitológica				Ef (Ee + Ep)	
			mm ²		% RL	Impronta	Biopsia	Carga parasitaria			% RP
			Antes	Después				qPCR			
Vehículo	0	6	30,99±4,5	100,79±6,6	0	+++	+++	76836±17801	0	No efectivo	
0,06%MTF	1,47	8	62,33±7,0	76,53±12,0	0	+++	+++	412701±257718	0	No efectivo	
0,17%MTF	4,17	8	66,29±11,6	54,14±10,6	0	+++	+++	52613±38822	31,53	No efectivo	
0,5%MTF	12,26	6	37,42±10,5	2,9±1,8	92,25	-	+	1150±550	98,5	Estable	
1,5%MTF	36,8	8	39,34±4,3	0,0±0,0	100	-	-	192,7±87,0	99,75	Parcial	
Solución Oral MTF	30mg/Kg	9	28,83±3,6	0,0±0,0	100	-	-	2,66±2,6	99,99	Parcial	

Nota: La tabla muestra la respuesta a diferentes concentraciones de MTF y al tratamiento oral. Se muestran el tamaño de la lesión (mm²) antes y después del tratamiento, el porcentaje de reducción del tamaño de la lesión (%RL), la carga parasitaria medida a través de qPCR, el porcentaje de reducción de la carga parasitaria (%RP) y la eficacia final del tratamiento (Ef). La eficacia final se categorizó como "No efectivo", "Estable" o "Parcial" basado en la combinación de los resultados de %RL y %RP. *Concentración MTF diaria administrada (100 mg de hidrogel) en las lesiones (dosis aplicada)

Figura 25 Curva dosis-respuesta del tratamiento tópico con MTF

Nota: La gráfica muestra la eficacia del tratamiento tópico con MTF en la reducción del tamaño de la lesión y la carga parasitaria. El eje X, en escala logarítmica base 10, representa las concentraciones de MTF (dosis aplicada), mientras que el eje Y muestra el porcentaje de reducción observado. Los círculos azules trazan la relación dosis-respuesta para la reducción del tamaño de la lesión, y los triángulos verdes representan la reducción de la carga parasitaria. Las líneas fragmentadas rojas indican la extrapolación para la determinación de las concentraciones efectivas CE₅₀ y CE₉₀ de la MTF necesaria para alcanzar el 50% y el 90% de reducción en ambos parámetros.

Figura 26 Análisis de la eficacia de la MTF tópica en ratones BALB/c con LC-NM durante y post tratamiento (p.t.).



Nota: Las curvas dosis-respuesta, muestran la relación entre el porcentaje de reducción del tamaño de las lesiones y el logaritmo de la concentración de MTF (mM) en diferentes puntos temporales, correspondientes a los días 8 (a), 16 (b) y 25 (c) del tratamiento y los días 8 (d), 16(e), 24(f), 32(g) y 60 (días) p.t. Además, se destaca la eficacia máxima alcanzada por la MTF en función del tiempo de observación (i). Las líneas fragmentadas rojas indican la extrapolación en ambos ejes para determinar las concentraciones efectivas 50 y 90 (CE50/90), ilustrando la potencia y eficacia de la MTF en cada tiempo evaluado.

2.4 Discusión

Para la determinación de la relación dosis respuesta del tratamiento tópico con MTF, fue necesario estandarizar inicialmente el modelo experimental de LC en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* con el fin de cuantificar dos efectos importantes de la enfermedad como fueron el tamaño y la carga parasitaria de las lesiones. La evolución de las lesiones y la carga parasitaria en los ratones infectados proporcionan una comprensión de la dinámica de la infección y de la respuesta a la intervención terapéutica.

La estandarización del modelo se inició con la caracterización de la especie de *Leishmania* utilizada. En este caso, se demostró que la especie correspondía a *L. amazonensis*. En el ámbito de la investigación es fundamental esta caracterización para validar los modelos experimentales y garantizar el control de calidad de las cepas de referencia utilizadas en el laboratorio. En el ámbito clínico y epidemiológico la diferenciación de las especies de *Leishmania* es utilizada con el fin de identificar las especies causantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y su distribución geográfica entre otros. Esta identificación influye en el pronóstico, la elección de opciones terapéuticas y la vigilancia de las poblaciones (Gow et al., 2022). El análisis PCR-RFLP utilizado en este trabajo ha sido ampliamente utilizado para identificar especies de *Leishmania* y su eficacia y bajos costos para su implantación son ampliamente reconocidas (Kato et al., 2019). Los genes *Its-1* y *Hsp70* son los principales objetivos en estos análisis (Koohsar et al., 2020; Garcia et al., 2004; Schönian et al., 2003). Sin embargo, se ha observado polimorfismo intraespecífico y perfiles similares entre especies en los patrones Hsp70-RFLP de aislados clínicos complicando la identificación (Espada et al., 2018). En cuanto al patrón *Its1*-RFLP es eficaz para diferenciar la mayoría de las especies de *Leishmania*, aunque es limitado para diferenciar las especies del complejo *L. braziliensis* (Roberts et al., 2015). No obstante, existen alternativas de múltiples

objetivos genéticos como los genes de isomerasa de fosfato de manosa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa (Kato et al, 2019; Gow et al., 2022). Estos genes han mostrado potencial para discriminar las especies dentro del complejo *L. braziliensis*. En nuestro estudio, las bandas obtenidas al identificar la cepa de referencia de *L. amazonensis* coinciden con los perfiles reportados para Hsp70-RFLP y *Its1*-RFLP (García et al., 2004; Schönian et al., 2003).

El uso del modelo experimental de LC con *L. amazonensis* ha sido junto con el modelo con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, los modelos más utilizados para evaluar fármacos antileishmania en LC-NM (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>, palabras claves leishmania + amazonensis + BALB +mice + drugs, 273 artículos). Esto ha sido realizado principalmente en ratones susceptibles BALB/c y parcialmente resistentes C57BL/6 (Tomiotto-Pellissier et al., 2021; Aoki et al., 2020; Almeida et al., 1996). Los trabajos con *L. amazonensis* son importantes no solo por el role que ella tiene en la LC-NM sino por su amplia distribución en las áreas endémicas de América Central y del Sur. En Colombia se han identificado varias especies de *Leishmania* en pacientes, vectores y reservorios de mamíferos domésticos y selváticos principalmente de *L. panamensis* y *L. braziliensis* seguida de *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Ramirez et al., 2016). Otra ventaja de esta cepa de parásitos para los estudios de LC-NM es su facilidad en cultivo *in vitro* (Aoki et al., 2020). En estudios comparativos entre ratones BALB/c y C57BL/6 infectados en la almohadilla plantar con *L. amazonensis* (10^5 promastigotes), los ratones BALB/c presentaron edema progresivo de 0 a 11 semanas p.i. con ulceración y alta carga parasitaria local (~ 2 a 3×10^6 parásitos) a la semana 11 p.i, en cambio los ratones C57BL/6 presentaron edema inicial que se estabilizó a las 6 semanas p.i y disminuyó a las 11 semanas p.i, sin lesiones ulceradas y menor carga parasitaria (2×10^5 parásitos) (Tomiotto-Pellissier et al., 2021). En otro experimento, ratones

BALB/c y C57BL/6 infectados con 2×10^6 promastigotes de *L. amazonensis*, mostraron cargas parasitarias, tamaños de lesiones e infiltrados similares hasta 6 semanas p.i, sin embargo, después de eso, sólo los ratones C57BL/6 controlaron la infección (Velasquez et al., 2016). Por otro lado, la infección de ratones BALB/c con aislados clínicos de *L. amazonensis* obtenidos de pacientes con LC y LCM desarrollaron lesiones ulcerosas en las almohadillas plantar con macrófagos cargados de parásitos, destrucción extensa del tejido y en algunos casos se observó metástasis cutáneas, diseminación del parásito al bazo y niveles elevados de anticuerpos antileishmania (Almeida et al., 1996). Nuestro modelo experimental en ratones BALB/c fue consistente y reproducible en la inducción de lesiones de LC al ser infectados con una concentración de 5×10^5 promastigotes en fase estacionaria en la base de la cola, mostrando una fase asintomática hasta la semana 4 p.i seguida de la formación de la lesión la cual va aumentando gradualmente debido al infiltrado inflamatorio y la multiplicación del parásito. La mayoría empiezan a ulcerarse (77% de los ratones) en la semana 10 p.i. aumentando hasta el tiempo final de observación (22 semanas p.i), sin observar control o curación espontánea de la enfermedad ni diseminación a órganos.

Los métodos moleculares, como la qPCR han sido empleados para determinar la carga parasitaria de la infección, el diagnóstico y la evolución de tratamientos (de Almeida et al., 2017). Este método es cada vez más utilizado debido a su simplicidad, rapidez y sensibilidad, que permite detectar bajas concentraciones de parásitos en una amplia variedad de muestras, como tejidos, sangre, médula, ganglios y frotis directo. Además, es menos propenso a la variabilidad (Verrest et al., 2017). Para la detección molecular, se han evaluado varios *primers* dirigidos a dianas genéticas, incluyendo ITS-1, kDNA, HSP70, ADNr 18S, miniexón, entre otros. Estos varían en su sensibilidad y especificidad, dependiendo del propósito del estudio (detección o identificación), la región geográfica (debido a la variabilidad entre especies de *Leishmania* en diferentes regiones) y

la naturaleza de la muestra (León et al., 2017). La qPCR utilizando ADNr 18S ha demostrado ser capaz de detectar y cuantificar ADN de *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. amazonensis*, las principales especies causantes de LC-NM (Filgueira et al., 2020), y en la evaluación de tratamientos en casos de LV (Mota et al., 2022). Nuestros resultados reportan la implementación y validación de una qPCR dirigida al gen ADNr 18S de *Leishmania* spp, utilizando el sistema SYBR Green, un colorante fluorescente de unión al ADN. Aunque otros estudios utilizan el sistema TaqMan (con sondas marcadas fluorescentemente) por su precisión y exactitud, el sistema SYBR Green ha demostrado tener una mayor sensibilidad en tejidos e hisopos (Gomes et al., 2017). Nuestro ensayo reveló parámetros de la curva estándar similares a los reportados en otras investigaciones que utilizan la cepa de *L. braziliensis*, con una pendiente de -3,45, un intercepto de 28,41, un R^2 de 0,99 y una eficiencia del 94,92% (Filgueira et al., 2020). Además, los coeficientes de variación inter-ensayos aceptados son de hasta el 20% para el gen diana ADNr 18S en cepas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. infantum* (León et al., 2017). Estos resultados sugieren que este método podría ser una herramienta útil y una alternativa diagnóstica prometedora para su aplicación en el diagnóstico clínico, permitiendo determinar la carga parasitaria en pacientes con LC-NM.

Los hidrogeles de MTF fueron traslúcidos e incoloros, aunque al aumentar la concentración de MTF incrementaba la aparición de burbujas. Los valores de pH de los hidrogeles variaron entre 5,84 y 7,56. En un estudio previo hidrogeles de MTF al 0,5% y sin MTF mostraron diferencias en el pH de 5.91 y 5.41, indicando que la concentración de MTF afecta el pH de la formulación debido posiblemente características fisicoquímicas de la MTF. Sobre la viscosidad de los hidrogeles esta disminuyó con concentraciones intermedias de MTF (0,17 y 0,5% de MTF) y aumentó en las más bajas y altas. Microscópicamente se observaron las burbujas de aire, pero no precipitados ni

compuesto sin disolver. Además, los geles mantuvieron sus características fisicoquímicas al menos por tres meses a 4 °C, pero se deshidrataron a temperaturas más altas debido al recipiente plástico en que se almacenaron (caja de Petri). En relación con la actividad antioxidante, el gel de MTF, el vehículo y el DMSO tuvieron poca actividad en la reducción del radical DPPH con valores entre el 0.26% y el 2.20%. Esto contrasta con el ácido ascórbico, que como control positivo mostró una reducción del radical la que aumentaba con la concentración (Neira et al., 2019). La consistencia, la ausencia de precipitados y el presentar un pH en un rango adecuado para uso tópico sugieren que los hidrogeles de MTF son prometedores como tratamiento tópico en dermatología.

En este trabajo se demostró la eficacia (definida como la capacidad de producir un resultado o efecto deseado) del tratamiento tópico de los hidrogeles de MTF en la reducción de las lesiones y en la reducción de la carga parasitaria. Las concentraciones más elevadas de MTF (1,5% y 0,5% p/v) lograron una disminución significativa tanto del tamaño de las lesiones como de la carga parasitaria con una eficacia final parcial y estable, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de 0,17% y 0,06% fueron no efectivas. El tratamiento oral con MTF también resultó eficaz (eficacia máxima 100 %), indicando que la administración de MTF en el modelo puede aplicarse al menos por estas dos vías. La eficacia de MTF aplicada tópicamente ha sido evaluada por algunos autores, donde ratones BALB/c con LC por *L. amazonensis* al ser tratados con tres formulaciones conteniendo MTF al 0,5%: gel, liposomas convencionales y liposomas ultrafluidos mostraron que el gel de MTF detuvo el crecimiento de la lesión en la última semana de tratamiento e indujo una reducción casi total de la lesión y una inhibición de la carga parasitaria del 99,8%. Sin embargo, los liposomas ultrafluidos potenciaron la eficacia del MTF, con una inhibición parasitaria del 100% (Peralta et al., 2022). En otro estudio en el modelo de BALB/c infectados con *L. amazonensis*, cuatro formulaciones de MTF al 6% (en agua, dimetil isosorbida,

octilsalicilato y una mezcla de las dos últimas), demostraron permeación cutánea y actividad antileishmania *in vitro*; sin embargo, al ser aplicadas tópicamente *in vivo* no fueron eficaces y mostraron irritación cutánea. Contrariamente, el control AmBisome aplicado IV, logró reducir de manera significativa el tamaño de la lesión y la carga parasitaria (Van Bocxlaer et al., 2016). La ineficacia *in vivo* de la MTF podría atribuirse a diferencias en las formulaciones empleadas, la concentración de MTF o las condiciones experimentales. Es esencial tener en cuenta estas variables al evaluar la eficacia de la MTF y otros tratamientos tópicos para la LC.

Teniendo en cuenta el tratamiento con las formulaciones conteniendo diferentes concentraciones de MTF (de 0 a 36,8 mM) en 100 mg de hidrogel, es decir, la dosis aplicada/día, el tratamiento mostró un efecto de dosis respuesta con valores de CE₅₀ y CE₉₀ de 4,45 mM y 4,90 mM en relación con la reducción de las lesiones y de CE₅₀ y CE₉₀ 4,92 mM y 7,89 mM con relación a la carga parasitaria. Dado que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CE para la reducción de las lesiones y la carga parasitaria, se puede decir que la potencia de la MTF para estos dos marcadores es similar, indicando una eficacia constante en el tratamiento de la LC a través de estas dos variables. Sin embargo, se necesita más concentración de MTF para destruir los parásitos de forma efectiva. Esto subraya la dificultad de lograr una cura completa en la LC, especialmente teniendo en cuenta la posibilidad de infección latente, donde los parásitos pueden permanecer viables dentro del huésped, lo que complica aún más la erradicación completa de la enfermedad (Mendonça et al., 2004).

En el modelo de LC en BALB/c- *L. amazonensis* utilizando diferentes dosis de MTF (2,5–50 mg/kg/día x 21 días oralmente) encontraron que las dosis \geq a 30 mg/kg/día que teóricamente equivalen a concentraciones de 18,40 a 22,10 mM en ratones con pesos corporales de 25 a 30 gramos respectivamente fueron eficaces observándose una cura parasitológica y estética

(carga parasitaria medida por qPCR) después de 250 días de observación (Godinho et al., 2012). Nosotros en nuestro estudio determinamos DE_{90} 4 a 5 veces menores (de 4,90 y 7,89 mM) en la reducción del tamaño de las lesiones y carga parasitaria, respectivamente. Estos valores indican una potencia considerable de la MTF aplicada tópicamente y resaltan la ventaja de necesitar menores concentraciones del fármaco para lograr los efectos terapéuticos deseados en el sitio de la lesión.

En el modelo experimental de LV en BALB/c-*L. donovani* dosis de MTF de 30, 10, 3, 1 mg/kg oral por 5 días mostraron también un efecto de dosis-respuesta con DE_{50} y DE_{90} de 3,98 y 27,13 mg/kg/dosis, respectivamente, lo que corresponde a concentraciones equivalentes a 2,44 y 16,6 mM. La eficacia del tratamiento se determinó comparando el número de amastigotes por 500 células hepáticas, multiplicado por el peso del órgano (en miligramos), conocido como unidad Leishman Donovan (LDU), en ratones tratados y no tratados (Escobar et al., 2001).

El presente estudio indica que tanto el porcentaje de reducción de las lesiones (%RL) como la carga parasitaria (%RP), determinados respectivamente por medición del área de la lesión y qPCR, pueden servir como biomarcadores de eficacia en el tratamiento de la LC. Los estudios del efecto de un fármaco en LC se ha determinado en la evaluación marcadores cuantitativos o semicuantitativos antes y después del tratamiento como la determinación de la carga parasitaria, bioluminiscencia, o el recuento de parásitos LUD en extendidos, y la eficacia clínica con la medida de lesiones (Palić et al., 2023; Wijnant et al., 2018). Se ha realizado utilizando por ejemplo qPCR en tiempo real (ARNr 18S) como análisis, pacientes con LC por *L. major* o en un paciente con LV por *L. infantum* tratados con MTF (150 mg/día por 28 días, oral), mostraron una tasa de eliminación del parásito de 1 log por semana (en un factor de 10 semanalmente) con eliminación completa de los parásitos 22 días p.t. en biopsias o en sangre (Dorlo et al., 2011, de Vries et al.,

2006). En nuestros estudios, el efecto máximo de reducción del tamaño de las lesiones se observó a partir de los 16 días p.t, lo que indica un efecto directo de la MTF en las lesiones. La MTF posee una vida media terminal superior a 30 días, resultando en altas concentraciones plasmáticas durante un período prolongado tras finalizar el tratamiento de 28 días (Dorlo et al., 2008). Desafortunadamente, en este trabajo no se cuantificaron los niveles de MTF en las lesiones (dermis/epidermis) ni su biodistribución después del tratamiento tópico, por lo que se desconoce si la eliminación continua del parásito se debe a la acumulación del fármaco en el tejido o a una respuesta inmunológica inducida por la MTF. La búsqueda de nuevos biomarcadores utilizando pruebas rápidas y no invasivas que permitan determinar la eficacia de los tratamientos en LC, es prioritaria (Carrillo et al., 2019). Estos podrían utilizarse para reducir los tiempos de tratamiento y prevenir recaídas, ayudar a ajustar las dosis y ser útil en la investigación de nuevos tratamientos o combinaciones de medicamentos actuales (Alves et al., 2018). Algunos biomarcadores como anticuerpos IgG1-específicos para *Leishmania*, producción de IFN γ , factores de crecimiento EGF, TGF1, PDGF y FGF, marcadores de activación de macrófagos como la neopterina han sido estudiados y relacionados con cura post tratamiento.

La relación entre potencia, eficacia máxima, y tiempo en el tratamiento tópico con MTF de la LC, evidenció una clara relación dosis-respuesta, destacando que concentraciones elevadas (26 y 36,8 mM administrados durante 25 días) condujeron a una reducción más pronunciada tanto en el tamaño de las lesiones como en la carga parasitaria. Este hallazgo subraya la notable potencia de la MTF, aunque es importante resaltar que la obtención de la eficacia máxima no se logra simplemente con el incremento de la dosis. Específicamente, la concentración de 36,8 mM demostró ser la más eficaz, sugiriendo que aumentos adicionales en la dosis no se traducen necesariamente en mejoras proporcionales en la respuesta terapéutica. Adicionalmente, el tiempo

de tratamiento emerge como un componente crítico en la efectividad del tratamiento. La significativa reducción de las lesiones tras varias semanas de aplicación indica que la MTF necesita de un período p.t para manifestar su máximo potencial terapéutico. Este aspecto resalta la necesidad de considerar la duración del tratamiento al evaluar su eficacia máxima. La potencia de la MTF, reflejada en su habilidad para inducir una respuesta terapéutica a CE_{50} bajas, es un atributo esencial que facilita su aplicación tópica. No obstante, la eficacia máxima de este tratamiento no solo se mide por la reducción de la carga parasitaria sino también por la mejora estética en las lesiones cutáneas, un factor de considerable importancia para los afectados por LC. La aplicación tópica de MTF no solo acelera la curación y mejora la adherencia al tratamiento, sino que también previene la diseminación del parásito, ofreciendo una estrategia terapéutica optimizada y centrada en el paciente para el manejo de esta enfermedad (Van Bocxlaer et al., 2016).

2.5 Conclusiones

Se estandarizó un modelo murino de LC utilizando *L. amazonensis*. La verificación de la especie de *Leishmania* mediante análisis de RFLP para los genes Hsp70 y Its1 confirmó la identidad de las cepas de referencia, asegurando la validez del modelo experimental. Las lesiones en los ratones infectados evolucionaron de manera predecible y reproducible, con un aumento progresivo en el tamaño y la aparición de úlceras, lo que refleja la relevancia del modelo para estudiar la patogénesis y la respuesta terapéutica en la LC-NM. La técnica de qPCR se validó como un método eficiente y específico para la cuantificación de la carga parasitaria, con una alta eficiencia y baja variabilidad inter e intra-ensayo.

La MTF tópica demostró ser efectiva en la reducción del tamaño de las lesiones y la carga parasitaria en una manera dosis-dependiente. Las concentraciones más altas de MTF en hidrogeles

fueron eficaces, logrando una reducción significativa en la carga parasitaria y la resolución completa de las lesiones. Tanto la administración tópica como la oral de MTF resultaron efectivas en el tratamiento de la LC-NM en ratones, con una notable reducción en la carga parasitaria y la mejora de las lesiones cutáneas. Esto indica el potencial de la MTF para ser utilizada en diferentes formulaciones y vías de administración.

El análisis dosis-respuesta del tratamiento con MTF reveló que concentraciones más bajas son suficientes para lograr una reducción significativa en el tamaño de las lesiones y la carga parasitaria, lo que sugiere que la dosificación puede ser optimizada para maximizar la eficacia y minimizar los efectos secundarios.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen importantes implicaciones para la práctica clínica y la investigación futura, proporcionando una base sólida para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas y seguras para el tratamiento de la LC.

El método qPCR para la cuantificación de la carga parasitaria ha demostrado ser un paso crítico en la mejora del diagnóstico y la evaluación de la eficacia del tratamiento. Los resultados obtenidos reflejan la sensibilidad y especificidad del método, lo que permite una detección precisa incluso en muestras con baja cantidad de ADN parasitario. La determinación de la carga parasitaria y la progresión de las lesiones cutáneas han sido evidenciadas, proporcionando un indicador importante para la evaluación de la respuesta al tratamiento.

Referencias

Abdeladhim, M., Kamhawi, S., & Valenzuela, J. G. (2014). What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation, and immunity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 691-703. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.028>

Aguirre Crespo, F. J., & Sánchez Salgado, J. C. (2010). ¿Qué sabe Ud. acerca de... la curva dosis-respuesta? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 57-59.

Akhoundi, M., Kuhls, K., & Cannet, A. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>

Almeida, R. P., Barral-Netto, M., De Jesus, A. M., De Freitas, L. A., Carvalho, E. M., & Barral, A. (1996). Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54(2), 178-184. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.178>

Alves, F., Bilbe, G., Blesson, S., Goyal, V., Monnerat, S., Mowbray, C., Muthoni Ouattara, G., Pécoul, B., Rijal, S., Rode, J., Solomos, A., Strub-Wourgaft, N., Wasunna, M., Wells, S., Zijlstra, E. E., Arana, B., & Alvar, J. (2018). Recent development of visceral leishmaniasis treatments: Successes, pitfalls, and perspectives. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00048-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00048-18>

Aoki, J. I., Hong, A., Zampieri, R. A., Floeter-Winter, L. M., & Laranjeira-Silva, M. F. (2020). In vivo infection with *Leishmania amazonensis* to evaluate parasite virulence in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 156, e60617. <https://doi.org/10.3791/60617>

Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Junior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., & Carvalho, E. M. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(5), 536-546. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.536>

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., & Sacks, D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology*, 165(2), 969-977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.969>

Butenko, A., Kostygov, A. Y., Sádlová, J., Kleschenko, Y., Bečvář, T., Podešvová, L., Macedo, D. H., Žihala, D., Lukeš, J., Bates, P. A., Volf, P., Opperdoes, F. R., & Yurchenko, V. (2019). Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia)*. *BMC Genomics*, 20(1), 726. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6126-y>

Carneiro, M. B., & Peters, N. C. (2021). The paradox of a phagosomal lifestyle: How innate host cell-*Leishmania amazonensis* interactions lead to a progressive chronic disease. *Frontiers in Immunology*, 12, 728848. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728848>

Carrillo, E., & Moreno, J. (2019). Editorial: Biomarkers in leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 388. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00388>

Carvalho, E. M., Barral, A., Costa, J. M., Bittencourt, A., & Marsden, P. (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 56(4), 315-325. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90103-1)

Castellucci, L., Jamieson, S. E., Almeida, L., Oliveira, J., Guimaraes, L. H., Lessa, M., Fakiola, M., Jesus, A. R., Miller, E. N., Carvalho, E. M., & Blackwell, J. M. (2012). Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5), 1102-1110. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.017>

Castellucci, L. C., Almeida, L. F., Jamieson, S. E., Fakiola, M., Carvalho, E. M., & Blackwell, J. M. (2014). Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: A critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(3), 279-288. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140028>

Convit, J., Pinaridi, M. E., & Rondon, A. J. (1972). Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 603-610. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(72\)90306-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(72)90306-9)

Costa, J. M., Marsden, P. D., Llanos-Cuentas, E. A., Netto, E. M., Carvalho, E. M., Barral, A., Rosa, A. C., Cuba, C. C., Magalhaes, A. V., & Barreto, A. C. (1986). Disseminated

cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 319-323.

Costa-da-Silva, A. C., Nascimento, D. O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-de-Lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-de-Lima, C. G. (2022). Immune responses in leishmaniasis: An overview. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(4), 54. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>

Couppie, P., Clyti, E., Sainte-Marie, D., Dedet, J. P., Carme, B., & Pradinaud, R. (2004). Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: Case of a patient with 425 lesions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 558-560.

Dasgupta, B., Roychoudhury, K., Ganguly, S., Kumar Sinha, P., Vimal, S., Das, P., & Roy, S. (2003). Antileishmanial drugs cause up-regulation of interferon-gamma receptor 1, not only in the monocytes of visceral leishmaniasis cases but also in cultured THP1 cells. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 97(3), 245–257. <https://doi.org/10.1179/000349803235001714>

de Almeida, M. E., Koru, O., Steurer, F., Herwaldt, B. L., & da Silva, A. J. (2016). Detection and differentiation of *Leishmania* spp. in clinical specimens by use of a SYBR Green-based real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(1), 281-290. <https://doi.org/10.1128/JCM.01764-16>

de Oliveira Cardoso, F., de Souza, C. S., Mendes, V. G., Abreu-Silva, A. L., Gonçalves da Costa, S. C., & Calabrese, K. S. (2010). Immunopathological studies of *Leishmania*

amazonensis infection in resistant and in susceptible mice. *Journal of Infectious Diseases*, 201(12), 1933-1940. <https://doi.org/10.1086/652870>

de Oliveira, C. I., & Brodskyn, C. I. (2012). The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in Immunology*, 3, 145. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00145>

de Vries, P. J., van der Meide, W. F., Godfried, M. H., Schallig, H. D., Dinant, H. J., & Faber, W. R. (2006). Quantification of the response to miltefosine treatment for visceral leishmaniasis by QT-NASBA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(12), 1183-1186. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.01.002>

Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576-2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>

Dorlo, T. P., van Thiel, P. P., Huitema, A. D., Keizer, R. J., de Vries, H. J., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2008). Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2855-2860. <https://doi.org/10.1128/AAC.00014-08>

Dorlo, T. P., van Thiel, P. P., Schoone, G. J., et al. (2011). Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12), e1436. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001436>

el Tai, N. O., Osman, O. F., el Fari, M., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575-579. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2)

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>

Escobar, P., Yardley, V., & Croft, S. L. (2001). Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1872-1875. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1872-1875.2001>

Escobar, P., Matu, S., Marques, C., & Croft, S. L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine), and amphotericin B. *Acta Tropica*, 81(2), 151-157. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(01\)00197-8](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(01)00197-8)

Espada, C. R., Ortiz, P. A., Shaw, J. J., et al. (2018). Identification of *Leishmania* (*Viannia*) species and clinical isolates of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91(4), 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.004>

Farinde, A. (2023). Dose-response relationships. In *MSA Manual*.
<https://www.msmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacodynamics/dose-response-relationships>

FDA. (2003). Guidance for Industry, “Exposure-Response Relationships-Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications”. *U.S. Food and Drug Administration*.
<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064982.htm>

FDA. (2015). U.S. database: Inactive ingredient search for approved drug products. *U.S. Food and Drug Administration*.
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm>

Filgueira, C. P. B., Moreira, O. C., Cantanhêde, L. M., de Farias, H. M. T., Porrozi, R., Britto, C., Boité, M. C., & Cupolillo, E. (2020). Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American tegumentary leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(10), e0008750.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008750>

Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Wilber Quispe Tintaya, K., & Dujardin, J. C. (2004). Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(5), 2294-2297.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>

Godinho, J. L., Simas-Rodrigues, C., Silva, R., Ürmenyi, T. P., de Souza, W., & Rodrigues, J. C. (2012). Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.11.008>

Gomes, C. M., Cesetti, M. V., de Paula, N. A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R. N. R., et al. (2017). Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 526–534. <https://doi.org/10.1128/JCM.01954-16>

Gow, I., Smith, N. C., Stark, D., & Ellis, J. (2022). Laboratory diagnostics for human *Leishmania* infections: A polymerase chain reaction-focused review of detection and identification methods. *Parasites & Vectors*, 15(1), 412. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z>

Grimaldi, G., Jr., Tesh, R. B., & McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(6), 687–725. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.687>

Hashiguchi, Y., Gomez, E. L., Kato, H., Martini, L. R., Velez, L. N., & Uezato, H. (2016). Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical Medicine and Health*, 44, 2. <https://doi.org/10.1186/s41182-016-0002-0>

Instituto Nacional de Salud. (2023). *Protocolo de vigilancia de Leishmaniasis (Versión 6)*. Instituto Nacional de Salud. <https://doi.org/10.33610/IMYH4569>

IUPHAR. (2023). *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Dose-response relationships*. Disponible en <https://www.pharmacologyeducation.org/pharmacology/dose-response-relationships>

Kato, H., Gomez, E. A., Seki, C., et al. (2019). PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007403>

Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604-615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

Koohsar, F., Hajjarian, H., Heidari, S., et al. (2020). Molecular identification of *Leishmania* species isolated from patients with cutaneous leishmaniasis in Gonbad Kavoods, northeastern Iran, using hSP70 and ITS-based PCR-RFLP. *Annals of Parasitology*, 66(3), 339-346. <https://doi.org/10.17420/ap6603.272>

Lalonde, R. L., Kowalski, K. G., Hutmacher, M. M., Ewy, W., Nichols, D. J., Milligan, P. A., et al. (2007). Model-based drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(1), 21-32.

León, C. M., Muñoz, M., Hernández, C., et al. (2017). Analytical performance of four polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01907>

Lipoldova, M., & Demant, P. (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 294-305. <https://doi.org/10.1038/nrg1832>

Lucas, C. M., Franke, E. D., Cachay, M. I., Tejada, A., Cruz, M. E., Kreutzer, R. D., et al. (1998). Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(2), 312–317. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.312>

Luque-Ortega, J. R., & Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1327-1332. <https://doi.org/10.1128/AAC.01268-06>

Malherbe, L., et al. (2000). Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity*, 13(6), 771–782.

Marks, R., Gebauer, K., Shumack, S., et al. (2001). Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results of a multicenter 6-week dose-response trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44(5), 807-813. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.113689>

Mendonça, M. G., de Brito, M. E., Rodrigues, E. H., Bandeira, V., Jardim, M. L., & Abath, F. G. (2004). Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure? *Journal of Infectious Diseases*, 189(6), 1018-1023. <https://doi.org/10.1086/382135>

Mota, T. F., Brodskyn, C. I., Morello, L. G., et al. (2022). Multiplex qPCR assay to determine *Leishmania infantum* load in *Lutzomyia longipalpis* sandfly samples. *Medical and Veterinary Entomology*, 36(2), 176-184. <https://doi.org/10.1111/mve.12564>

Nakamura, H. (2013). BALB/c Mouse. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 290-292). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1634-1641. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz049>

Oliveira, W. N., Ribeiro, L. E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 66(1), 127-132.

Osorio, L. E., Castillo, C. M., & Ochoa, M. T. (1998). Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: Clinical characteristics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(1), 49-52. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.49>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2023). *Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas* (Núm. 12, diciembre del 2023). OPS. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59156>

Palić, S., Bhairosing, P., Beijnen, J. H., & Dorlo, T. P. C. (2019). Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through Immunomodulation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(7), e02507-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02507-18>

Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(3), 852-859. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.852-859.2004>

Peralta, M. F., Usseglio, N. A., Bracamonte, M. E., et al. (2022). Efficacy of topical miltefosine formulations in an experimental model of cutaneous leishmaniasis. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(1), 180-196. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00896-8>

Perez, H., Malave, I., & Arredondo, B. (1979). The effects of protein malnutrition on the course of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice: Nutrition and susceptibility to leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 38(3), 453-460.

Peixoto, F., Nascimento, M. T., Costa, R., Silva, J., Renard, G., Guimarães, L. H., Penna, G., Barral-Netto, M., Carvalho, L. P., Machado, P. R. L., & Carvalho, E. M. (2020). Evaluation of the Ability of Miltefosine Associated with Topical GM-CSF in Modulating the Immune Response of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of immunology research*, 2020, 2789859. <https://doi.org/10.1155/2020/2789859>

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 Ca²⁺ Channel. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(1), e01614-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-17>

Ponte, C. B., Alves, E. A., Sampaio, R. N., Urdapilleta, A. A., Kückelhaus, C. dos S., Muniz-Junqueira, M. I., & Kückelhaus, S. A. (2012). Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *International immunopharmacology*, 13(1), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.03.016>

Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., & González, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of cutaneous leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 6, 28266. <https://doi.org/10.1038/srep28266>

Roberts, T., Barratt, J., Sandaradura, I., Lee, R., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J., & Stark, D. (2015). Molecular epidemiology of imported cases of leishmaniasis in Australia from 2008 to 2014. *PLoS One*, *10*(3), e0119212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119212>

Rocha, F. J., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G., & Bogdan, C. (2007). Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infection and Immunity*, *75*(8), 3823–3832.

Rubiano, L. C., Miranda, M. C., Muvdi Arenas, S., Montero, L. M., Rodríguez-Barraquer, I., Garcerant, D., et al. (2012). Noninferiority of miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. *Journal of Infectious Diseases*, *205*(4), 684-692.

Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, *2*(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>

Santrich, C., Segura, I., Arias, A. L., & Saravia, N. G. (1990). Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *42*(1), 51–55. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.51>

Schmidt-Ott, R., Klenner, T., Overath, P., & Aebischer, T. (1999). Topical treatment with hexadecylphosphocholine (Miltex) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *93*(1), 85–90.

Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., Presber, W., & Jaffe, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterisation of *Leishmania* in local and imported

clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1), 349–358.

[https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2)

Schriefer, A., Wilson, M. E., & Carvalho, E. M. (2008). Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis.

Current Opinion in Infectious Diseases, 21(5), 483–488.

<https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32830d0ee8>

Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1296.

<https://doi.org/10.3390/ijms18061296>

Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581-592.

<https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>

Shupack, J. L., Kassimir, J. J., Thirumoorthy, T., Reed, M. L., & Jondreau, L. (1987). Dose-response study of topical minoxidil in male pattern alopecia. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 16(3 Pt 2), 673-676. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(87\)70086-](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(87)70086-3)

3

Soto, J., & Soto, P. (2006). Miltefosine: Oral treatment of leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 4(2), 177-185. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.177>

Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., et al. (2004). Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266-1272.

Soto, J., Toledo, J., Gutierrez, P., Nicholls, R. S., Padilla, J., Engel, J., et al. (2001). Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 57-61.

Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., et al. (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 347(22), 1739-1746.

Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M. M., Silva, T. F., Bortoleti, B. T. D. S., Gonçalves, M. D., Concato, V. M., Rodrigues, A. C. J., Detoni, M. B., Costa, I. N., Panis, C., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2021). Murine susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection is influenced by Arginase-1 and macrophages at the lesion site. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 687633. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.687633>

Unger, C., Peukert, M., Sindermann, H., Hilgard, P., Nagel, G., & Eibl, H. (1990). Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Cancer Treatment Reviews*, 17(2-3), 243–246. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(90\)90054-j](https://doi.org/10.1016/0305-7372(90)90054-j)

Urbina J. A. (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100 Suppl 1, S9–S16. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.03.010>

Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., & Croft, S. L. (2016). Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(7), 862-872. <https://doi.org/10.1111/jphp.12548>

Velasco, O., Savarino, S. J., Walton, B. C., Gam, A. A., & Neva, F. A. (1989). Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *41*(3), 280–288. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.280>

Velasquez, L. G., Galuppo, M. K., De Rezende, E., et al. (2016). Distinct courses of infection with *Leishmania (L.) amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology*, *143*(6), 692-703. <https://doi.org/10.1017/S003118201600024X>

Vera, A.-M., Mantilla, J.-C., & Escobar, P. (2021). Anti-leishmanial activity of 29 daily sessions of intralesional-pentavalent antimony administration on *Leishmania (Viannia)*-infected BALB/c mice. *Revista de Biología Tropical*, *69*(4), 1179-1188. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i4.47368>

Verrest, L., Kip, A. E., Musa, A. M., et al. (2021). Blood parasite load as an early marker to predict treatment response in visceral leishmaniasis in Eastern Africa. *Clinical Infectious Diseases*, *73*(5), 775-782. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab124>

Vincent, I. M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T. K., & Ouellette, M. (2014). Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *4*(1), 20-27.

Ware, J. M., O'Connell, E. M., Brown, T., et al. (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>

Wijnant, G. J., Croft, S. L., de la Flor, R., Alavijeh, M., Yardley, V., Braillard, S., Mowbray, C., & Van Bocxlaer, K. (2019). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the

nitroimidazole DNDI-0690 in mouse models of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(9), e00829-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00829-19>

Wilson, M. E., Recker, T. J., Rodriguez, N. E., Young, B. M., Burnell, K. K., Streit, J. A., & Kline, J. N. (2002). The TGF- β response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *European Journal of Immunology*, 32(12), 3556–3565. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200212\)32:12<3556::AID-IMMU3556>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200212)32:12<3556::AID-IMMU3556>3.0.CO;2-Q)

Wortmann, G., Miller, R. S., Oster, C., Jackson, J., & Aronson, N. (2002). A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. *Clinical Infectious Diseases*, 35(3), 261-267. <https://doi.org/10.1086/341406>

Zang, Y. N., Jiang, D. L., Cai, L., et al. (2016). Use of a dose-response model to guide future clinical trial of benvitimod cream to treat mild and moderate psoriasis. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 54(2), 87-95. <https://doi.org/10.5414/CP202486>

Zeisig, R., Rudolf, M., Eue, I., & Arndt, D. (1995). Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 121(2), 69–75. <https://doi.org/10.1007/BF01202215>

3. Aspectos inmunológicos, histopatológicos, ultraestructurales e de la leishmaniasis cutánea: evaluación antes, durante y después del tratamiento tópico de miltefosina fMTF.

3.1 Generalidades: respuesta inmune (RI) en LC

Varios componentes de la RI innata y adaptativa participan en la defensa del hospedero contra las diferentes especies de *Leishmania*. Factores dependientes del parásito (especie de *Leishmania*), del huésped (aspectos genéticos) y sus interacciones (RI) determinan la patogénesis de la LC ya sea para controlar la infección, producir infecciones asintomáticas o evolucionar en una o más de sus diversas manifestaciones clínicas. En el sitio de entrada, componentes de la saliva de la mosquita son introducidos junto con parásitos que presentan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como por ejemplo el lipofosfoglicanos (LPG) y glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) para los cuales son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR i.e. receptores Toll) (Andrade et al., 2007). Compuestos o extractos de la saliva de los flebótomos, como el maxadilán, *promastigote secretory gel*, adenosina pueden inducir eritema, vasodilatación o la modulación de factores quimiotácticos y de citoquinas como IL-10 (asociada a una respuesta reguladora Th2) o citoquinas proinflamatorias regulándolas algunas favoreciendo principalmente la diferenciación macrófagos M2 y alguna a M1 (Norsworthy et al., 2004; Abdeladhim et al., 2011; Tomiotto-Pellissier et al., 2018). Los PRR están presentes en las células centinelas como macrófagos, queratinocitos, mastocitos y las células de Langerhans que al ser activados inician la RI innata (liberación de quimioquinas) y adquirida por el huésped y en consecuencia la activación de los mecanismos de defensa de los parásitos (Costa-da-Silva et al., 2022). Rápidamente llegan neutrófilos y monocitos inflamatorios los primeros con funciones duales (protectoras/deletérea dependiendo de la especie de parásito y del huésped), los segundos protectores (fagocitan, destruyen, y presentan antígenos CD4+ T helper 1 (Th1) (Scott & Novais,

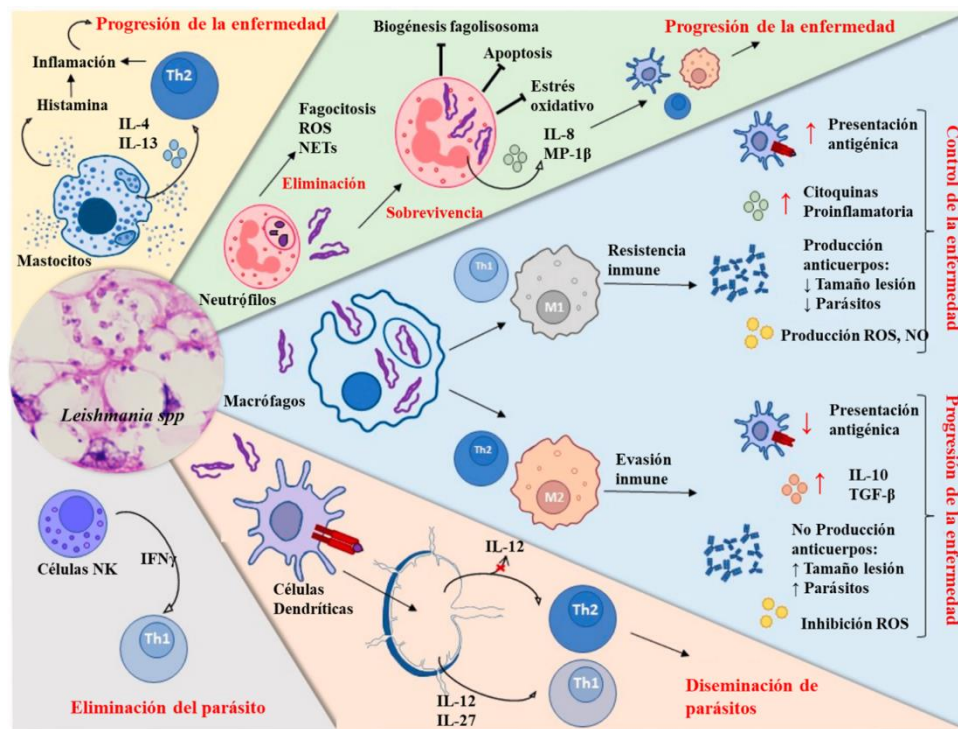
2016). Los neutrófilos fagocitan aprox. del 80-90% los parásitos y pueden eliminarlos mediante la liberación de radicales libres (ROS), degranulación y de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Sin embargo, el parásito puede sobrevivir inhibiendo la biogénesis del fagolisosoma, el estrés oxidativo y retrasando la apoptosis (Laskay et al., 2003; Carlsen et al., 2015). Se conoce que en infecciones por *L. braziliensis* y *L. amazonensis*, los neutrófilos interactúan con macrófagos infectados favoreciendo su destrucción, pero en infecciones por *L. major*, la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos y células dendríticas (CD), limita la activación de estas células contribuyendo a la replicación del parásito (de Souza & Bariberi, 2010; Van Zandbergen et al., 2004). Los monocitos inflamatorios y las CD llegan rápidamente al sitio de infección atraídos por la quimioquina CCL2. Los monocitos se infectan e inducen altos niveles de ROS y se pueden diferenciar en CD (Goncalves et al., 2011; Sott & Novais, 2016). Los ROS generados por el estallido respiratorio y el óxido nítrico (ON) inducido por la activación de ON-sintasa (iNOS) mediada por IFN γ son los mecanismos de muerte de la RI innata. Otras células de la RI innata son las *natural killer* (NK) células productoras de IFN γ especialmente en los nódulos linfáticos; regulada por la producción de TGF β y de gránulos tóxicos de granzima B (Laouar et al., 2005; Messlinger et al., 2018); los mastocitos con su rol dual en protección/patogénesis siendo la primera línea de defensa al liberar mediadores proinflamatorios y reclutar macrófagos pero también capaces de producir IL-4 y IL-13, respuesta Th2 (Wershil et al, 1994; Naqvi et al., 2017); y los queratinocitos como barrera física y produciendo IL-12, IL-1 β , osteopontina, IL-4, e IL-6 (Ehrchen et al., 2010).

Los macrófagos son células cruciales para la supervivencia, replicación y diferenciación del parásito y para su eliminación. Normalmente se encuentra en los tejidos como macrófagos no activados (M0). Producen citoquinas y reclutan células proinflamatorias (neutrófilos, mastocitos y eosinófilos), fagocitan, generan ROS, ON y procesan y presentan antígenos de *Leishmania* a las

células T junto con las CD (Scott & Novais, 2016). Las CD, tanto las células de Langerhans, las CD de la dermis, pero especialmente las derivadas de monocitos inflamatorios llegan a los nódulos linfáticos para presentar antígenos del parásito a las células T vírgenes. Pueden inducir la diferenciación de células Th1 mediante la secreción de IL-12 e IL-27, promoviendo el control de la infección, o inducir respuestas Th2 bloqueando la secreción de IL-12 (Von Stebut et al., 1988), favoreciendo la diseminación del parásito. Además, las células NK al secretar IFN γ refuerza la respuesta Th1 (protectiva) y es crucial para el control de la enfermedad, como se ha demostrado en varios modelos experimentales de infección por *Leishmania* (Costa-Da-silva et al., 2022). Durante la infección por *Leishmania spp.*, según el microambiente, los macrófagos pueden diferenciarse en M1 y/o M2 (Parisi et al, 2018). En presencia de citoquinas como IFN γ y TNF α , adquieren un fenotipo proinflamatorio (M1) capaces de producir iNOS, ROS, CXCL9 y CXCL10, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, o IFN tipo I, siendo altamente fagocíticos y destructores. Cuando son activados por IL-4 o IL-13, IL-10, IL-21 and IL-33, TGF- β , M-CSF, vitamina D3 o inmunocomplejos, se asocian con una función de cicatrización de heridas, antiinflamatoria o inmunoreguladora tipo M2 (subdividida en a-d) expresando moléculas como Relm α , Ym1, CCL24,17,22 y produciendo Arg1 (argininasa, biosíntesis de poliaminas benéfico para el parásito), IL-10, TGF β , glucocorticoides dependiendo del subtipo de M2 (Arango et al., 2014; Tomiotto-Pellissier et al., 2018; Li et al., 2018) .Los macrófagos M1 promueven las respuestas Th1, lo que contribuye al control de la enfermedad. En contraste, los macrófagos M2 aumentan la producción de IL-10 y TGF β , respaldando las respuestas Th2 y la progresión de la enfermedad, además de inhibir la producción de ROS y aumentar el tamaño de las lesiones (Costa-Da-silva et al., 2022). Para ilustrar las complejas interacciones entre la *Leishmania* y las células de la RI innata y su rol en protección o en progresión de la enfermedad se muestra la **Figura 27**. Los **mastocitos**

protegiendo, pero también, secretando IL-4 e IL-13 (Th2), favoreciendo la supervivencia del parásito. Los **neutrófilos** reclutados fagocitando, induciendo ROS y NETs pero también liberando citoquinas proinflamatorias/quimiotáctica (IL-8 y MIP1 β) y el parásito protegiéndose, inclusive cuando el neutrófilo apoptótico es fagocitado por los macrófagos. Los **macrófagos**, la célula hospedera por excelencia del parásito, su diferenciación y asociación con la respuesta Th1 y Th2. Las células dendríticas (CD), célula presentadora, su rol en la diferenciación de las células T Th1 o Th2. Finalmente, las **células NK** células protectoras secretoras de IFN γ (Th1) (Costa-Da-silva et al., 2022).

Figura 27 Interacciones entre *Leishmania* y células inmunitarias innatas del huésped mamífero



Nota: Grafica modificada de (Costa-Da-silva et al., 2022)

En infecciones por *L. major*, la resistencia a la infección (lesiones pequeñas que sanan espontáneamente) en unas cepas de ratones esta mediada por una respuesta CD4⁺ Th1 (i.e. cepas

como C57BL/6, C3H y CBA) mientras que en otras cepas de ratones (i.e. BALB/c) la susceptibilidad a la infección (lesiones y metástasis a hígado y bazo) está mediada por CD4⁺ Th2. En general, la IL-12 mostró ser esencial para el desarrollo de células CD4⁺ Th1 y la IL-4 promovió el desarrollo de células Th2 en ratones (en humanos es menos conocido). La inmunidad mediada por células T, CD4⁺ Th1 células producen IFN γ , activa la producción de ON por macrófagos, algunos parásitos pueden persistir dada la regulación por IL-10 y la presencia de células T de memoria (Coplitts et al., 2009). Por otro lado, es importante tener en cuenta que una respuesta de Th1 exacerbada (o mal modulada) puede causar daños tisulares graves y a la presentación clínica de leishmaniasis. En infecciones por *L. tropica* y en leishmaniasis mucosa por *L. braziliensis* y *L. amazonensis* las citoquinas proinflamatorias como IFN γ y TNF α aumentan su liberación (Kumar et al., 2010; Bacellar et al., 2002).

El perfil inmunológico de la LC en humanos varía desde una respuesta de células T robusta, caracterizada por una reacción DTH⁺ y altos niveles de IFN- γ , como en los casos de infección por *L. braziliensis*, hasta pacientes con una respuesta humoral predominante y niveles elevados de anticuerpos, pero sin una respuesta efectiva de células T, como ocurre en algunos casos de infección por *L. amazonensis* (Carvalho et al., 1994; Saravia et al., 2002). La activación de los macrófagos por IFN γ es esencial para la eliminación del parásito. Por este motivo, los individuos con una fuerte respuesta de DTH presentan una baja carga parasitaria en las lesiones, mientras que la respuesta humoral, por sí sola, resulta ineficaz para el control de la carga parasitaria. Por lo tanto, los pacientes con una respuesta ineficaz de células T pueden desarrollar formas más graves de la enfermedad, como la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), mientras que aquellos con una respuesta inmunitaria exagerada pueden progresar a la leishmaniasis mucosa (LM). En un punto intermedio se encuentran los pacientes que desarrollan lesiones que pueden autocurarse o, en

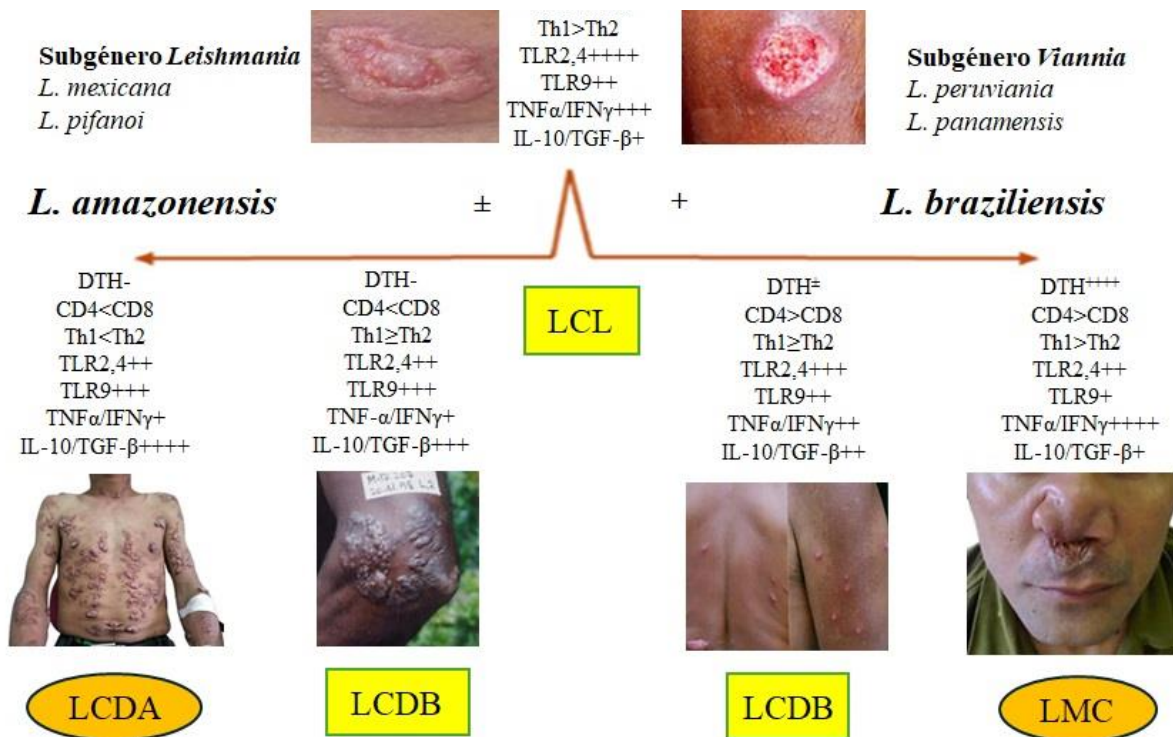
algunos casos, evolucionar a lesiones crónicas como en leishmaniasis cutánea localizada (LCL). Estos pacientes tienden a presentar respuestas de células T y niveles de anticuerpos moderados (Carvalho et al., 2012). Los estudios en modelos murinos han permitido identificar patrones inmunológicos de cura, en los que predominan las respuestas CD4+ Th1 protectoras, y patrones de susceptibilidad, caracterizados por respuestas CD4+ Th2 no protectoras (Tripathi et al., 2007).

3.1.1 Heterogeneidad de la LC

Como se mencionó en el capítulo anterior, la LC es una enfermedad con una notable heterogeneidad. La LCL es la forma más común, observándose en el 70 a 80% de los casos. Comienza como una pápula eritematosa que evoluciona a un nódulo y posteriormente se ulcera. Las úlceras, generalmente indoloras, pueden ser simples o múltiples, con bordes bien definidos y gruesos y un fondo granuloso de apariencia volcánica. En ocasiones, pueden ser dolorosas si se sobre infectan con microorganismos y suelen ubicarse principalmente en áreas expuestas a los vectores, como la cara y las extremidades (Rodríguez et al., 2016). En algunos casos, estas lesiones pueden resolver espontáneamente después de 3 a 4 meses, especialmente aquellas causadas por *L. mexicana*, o bien, evolucionar hacia lesiones crónicas no cicatrizantes que requieren tratamiento (Burza et al., 2018). En Brasil, se ha identificado la influencia de diversas especies de *Leishmania* de los tres subgéneros en el espectro clínico de la LC; por ejemplo, *L. braziliensis* se asocia con LM o LC y una hipersensibilidad retardada severa (DTH ++++), mientras que *L. amazonensis* se relaciona con la LCDA y una DTH negativa. La LCL típica muestra una respuesta DTH+/++, y entre la LCDA y la LM se observa una forma intermedia denominada LCDL con DTH+/- y una supresión parcial o incompleta de la respuesta inmunitaria de células T (Silveira et al., 2023) (**Figura 28**). La LCDA es una presentación rara de la enfermedad caracterizada por un crecimiento

descontrolado de los parásitos en lesiones que se extienden por la piel, donde los pacientes, al carecer de una respuesta celular adecuada, suelen ser refractarios a la quimioterapia. Contrariamente, la LCL causada por *L. braziliensis* u otras especies del subgénero *Viannia* típicamente muestra una úlcera con borde elevado sobre un fondo granulomatoso después de uno o dos meses de evolución de la enfermedad. En contraste, las lesiones causadas por *L. amazonensis* generalmente presentan un nódulo o placa con una base y borde muy infiltrados, con una ulceración menos pronunciada que no presenta las características típicas de las lesiones ulcerativas de *L. braziliensis*. Estas diferencias clínicas reflejan mecanismos patogénicos distintos en la interacción entre los antígenos específicos de cada especie de *Leishmania* y la respuesta inmunitaria de células T humanas (CD4+/CD8+). Mientras que *L. braziliensis* induce una respuesta DTH+ /+++ de moderada a severa, facilitando la necrosis dérmica como mecanismo defensivo para eliminar al parásito, *L. amazonensis* suprime esta respuesta (DTH±/-), resultando en una mayor carga parasitaria y un proceso ulcerativo menos intenso (Silveira et al., 2004).

Figura 28 Espectro de la LC causadas por *L. braziliensis* y *L. amazonensis*



Nota: gráfica y fotografías modificadas de Silveira et al., 2023. LCDA, leishmaniasis cutánea difusa anérgica; LCDL, leishmaniasis cutánea diseminada limítrofe; LCL, leishmaniasis cutánea localizada; LMC, leishmaniasis mucosa; DTH, reacción de hipersensibilidad de tipo retardado; CD4+, linfocito T CD4; CD8+, linfocito T CD8; Th1, respuesta inmunitaria de tipo Th1; Th2, respuesta inmunitaria de tipo Th2; TLR, receptores 2, 4 y 9; TNFα, factor de necrosis tumoral alfa; IFNγ, interferón gamma; IL-10, interleucina-10; TGFβ, factor de crecimiento tumoral beta. (-) ninguna reacción; (±) reacción límite; (+) reacción débil; (++) reacción moderada; (+++) fuerte reacción; y (+++++) reacción exacerbada.

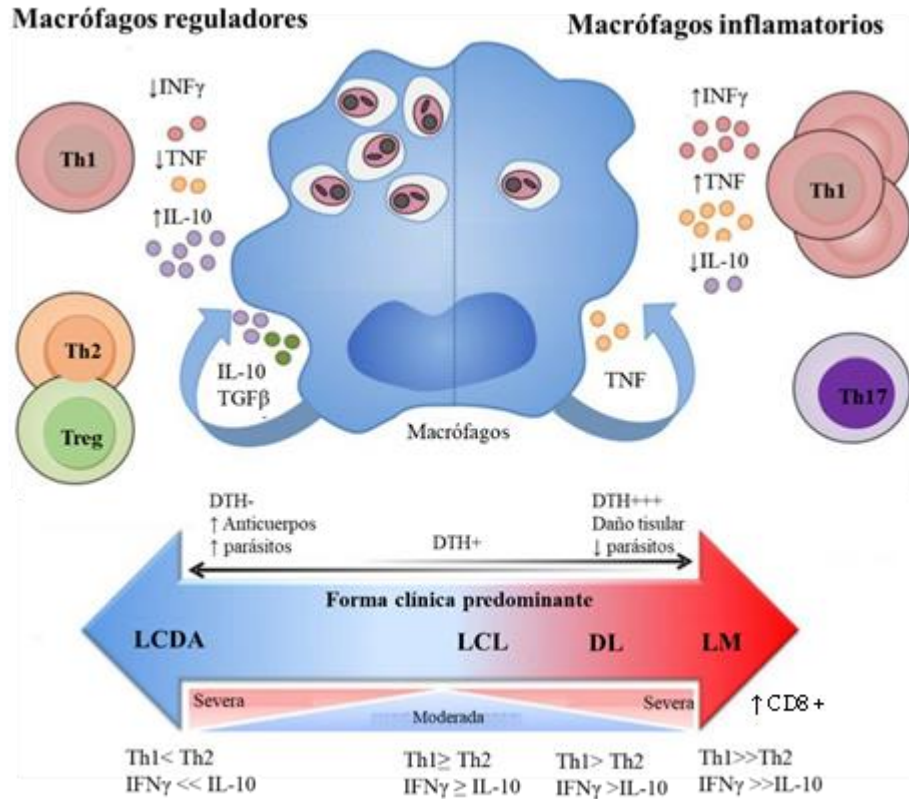
Aunque no está bien definido qué determina las diferencias en el resultado clínico de la infección por *Leishmania*, se sabe que influyen factores dependientes del parásito involucrado

(virulencia); el estado inmune del huésped con mayor riesgo de diseminación en pacientes inmunosuprimidos por desnutrición, coinfección con VIH u otras enfermedades debilitantes; y a las características los vectores involucrados debido por ejemplo a sus preferencias alimentarias o a la presencia de componentes hemostáticos e inmunomoduladores de la saliva (Abdeladhim et al., 2014; Castellucci et al., 2012; Castellucci et al., 2014). En el caso de la inmunidad del huésped se ha observado que pacientes inmunocompetentes desarrollan LCL, al contrario de pacientes con deficiencia en la respuesta celular que presentan LCD en infecciones por *L. amazonensis* (Carvalho et al., 1994).

El equilibrio entre factores proinflamatorios y antiinflamatorios determina la progresión y manifestación de la enfermedad durante la infección por *Leishmania* (Oliveira et al., 2014). Los macrófagos infectados con los parásitos están influenciados por las citocinas inducidas en la lesión. Las citocinas inflamatorias de la respuesta Th1, como el $IFN\gamma$ y el $TNF\alpha$, inducen la producción de ROS inhibiendo la replicación del parásito dentro del fagolisosoma. En la LCL, se ha observado un aumento de las células Th17 y transcripciones de quimioatrayentes y marcadores de activación clásica de los macrófagos en las lesiones las cuales promueven la respuesta inmune mediada por células para la eliminación del parásito y la respuesta proinflamatoria. Sin embargo, en un ambiente regulatorio, predominan la respuesta Th2, con la producción de IL-10 y factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$), que contrarrestan los efectos de $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ lo cual se relaciona con la evasión inmune, la cronicidad de la infección y la diseminación del parásito. Los linfocitos T reguladoras (Treg) y los receptores inhibidores presentes en las células T $CD4^+$ o $CD8^+$ están asociados con la supresión de la respuesta inmune y el agotamiento de las células T, respectivamente (Scorza et al., 2017). La LCDA y LM son formas graves de la enfermedad que se encuentran en extremos opuestos del espectro inmunológico. El espectro inmunológico varía desde

niveles altos de inmunidad mediada por células hasta niveles altos de anticuerpos. Aunque todas las formas clínicas requieren respuestas del Th1 para curar la enfermedad, una respuesta exagerada del tipo Th1 y un número aumentado de células T citotóxicas CD8⁺ se asocian con una mayor gravedad de la enfermedad. La consecuencia de una respuesta celular extremadamente exagerada es el desarrollo de LM causando lesiones desfigurantes. En contraste, los pacientes con LCDA en el otro extremo del espectro tienen altos números de parásitos dentro de las lesiones, lo cual es una consecuencia de bajos niveles de citocinas Th1 y con altos títulos de anticuerpos. Además, los pacientes con LCDA producen altos niveles de la IL-10, mientras que los pacientes con leishmaniasis mucosa tienen bajos niveles de IL-10 (Scott et al., 2016) (**Figura 29**).

Figura 29 Regulación inmune de macrófagos que contribuyen al espectro de manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea humana.



Nota: Figura tomada y modificada de Scorza et al., 2017. LCDA, leishmaniasis cutánea difusa anérgica; LCDL, leishmaniasis cutánea diseminada limítrofe; LCL, leishmaniasis cutánea localizada; LMC, leishmaniasis mucosa; DTH, reacción de hipersensibilidad de tipo retardado

3.1.2 Patrones histopatológicos de la LC

Los parámetros histopatológicos encontrados en biopsias de piel principalmente en la dermis de las lesiones de pacientes con LC han tratado de ser clasificados en patrones según varios factores como la intensidad del infiltrado inflamatorio, predominio celular del infiltrado, daño a los tejidos conectivos y la duración de las lesiones. Ridley et al. 1980 establecieron una

clasificación con cinco patrones histopatológicos, considerando la respuesta inflamatoria celular y el daño a los tejidos conectivos. i. El patrón no reactivo se caracteriza por macrófagos cargados de parásitos sin una respuesta celular significativa, lo que indica un estado de anergia y se asocia con poca ulceración. ii. El patrón reactivo presenta granulomas con necrosis central y una densa infiltración de linfocitos y células plasmáticas, acompañado de liberación de amastigotes por la necrosis de macrófagos. iii. El patrón infiltrativo incluye infiltrados de linfocitos y macrófagos, con lisis de estos últimos y cambios fibrinoides en el tejido conectivo. iv. El patrón tuberculoide se caracteriza por la formación de células gigantes de Langhans, y está asociado a una mayor tendencia a la curación espontánea. Finalmente, v. el patrón hipersensible muestra una intensa respuesta inflamatoria, destrucción tisular extensa y escasa presencia de parásitos. Venkataram et al. 2001 propusieron otra clasificación que incluye cuatro patrones histopatológicos. i. El patrón de infiltración difusa de macrófagos sin necrosis se caracteriza por la presencia de un infiltrado difuso de macrófagos en la dermis sin evidencia de necrosis tisular. ii. En el patrón de infiltración de macrófagos con necrosis, además del infiltrado de macrófagos, se observa necrosis en los tejidos afectados. iii. El granuloma reactivo temprano corresponde a la fase inicial de formación de granulomas, que refleja una respuesta inmunitaria temprana frente a la infección. iv. En etapas más avanzadas, aparece el granuloma epiteliode establecido, con granulomas bien formados de tipo epiteliode, lo que indica una respuesta inflamatoria crónica más organizada. Rodríguez et al. 2016 clasificaron los patrones en cuatro tipos basados en el tipo de infiltrado inflamatorio. i. En la dermatitis difusa, la epidermis es hiperplásica y a menudo ulcerada, con escamocostras, mientras que el infiltrado dérmico es denso y compuesto principalmente por macrófagos vacuolados, linfocitos y plasmocitos, con abundantes amastigotes en las primeras etapas. ii. En la dermatitis granulomatosa epiteliode, se observan granulomas epitelioides bien definidos, con pocas células

gigantes y una baja cantidad de amastigotes, lo que refleja una respuesta inmune más activa. iii. La dermatitis granulomatosa tuberculoide presenta grandes áreas de necrosis fibrinoide rodeadas por granulomas de células epiteloides y linfocitos, siendo este patrón difícil de distinguir de la tuberculosis. Finalmente, iv. la dermatitis difusa con macrófagos vacuolados muestra una epidermis normal o atrófica, con macrófagos vacuolados que contienen numerosos amastigotes, y es característico de la leishmaniasis difusa, una forma más severa de la enfermedad. Finalmente, Kurban et al. 1966 clasificaron los patrones según la duración de la enfermedad. i. En la fase temprana (hasta un año de duración), se observó un infiltrado masivo de histiocitos y leucocitos mononucleares en la dermis, junto con amastigotes visibles en las tinciones, además de cambios epidérmicos como hiperqueratosis, atrofia y acantosis. ii. En la fase tardía (lesiones de más de un año), se desarrollaron túberculos de células epiteloides y células gigantes de Langhans, con menos amastigotes y un infiltrado inflamatorio de menor intensidad, lo que indica una respuesta inflamatoria más organizada y crónica.

En los casos de lesiones de LCL producida por cepas del subgénero *Viannia* se ha observado una reacción inflamatoria crónica, granulomatosa, con presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, mastocitos y amastigotes intracelulares en el fagolisosoma de los macrófagos en ocasiones (Rodríguez et al., 2016). En estudios de pacientes con LC por *L. panamensis* se ha observado una reacción inflamatoria intensa en la dermis, caracterizada por infiltrados inflamatorios de tipo linfoplasmocítico, linfocitohistiocítico y granulomatoso, con una distribución tanto difusa como focal, predominando los linfocitos, seguidos de histiocitos y células plasmáticas. En la epidermis, las biopsias revelan alteraciones como acantosis, espongirosis, exocitosis, paraqueratosis e hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Además, se observó la presencia de úlceras y formación de granulomas definidos en algunos casos (González et al., 2018). En

pacientes con lesiones cutáneas por *L. amazonensis* se ha observado la formación de un denso infiltrado celular compuesto principalmente por macrófagos parasitados, vacuolados, escasos linfocitos y células plasmáticas y fibras de colágeno que rodean el infiltrado (Sampaio et al., 2021; Silveira et al., 2005).

En los modelos murinos se observan patrones similares dependiendo del tiempo de la infección. Los ratones BALB/c infectados con *L. panamensis* muestran inflamación inicial discreta, que progresa a inflamación extensa con numerosos macrófagos vacuolados y amastigotes, así como la formación de granulomas en ganglios linfáticos. Además, se presentan lesiones que se diseminan y proliferación de fibroblastos en la dermis profunda. Los patrones histopatológicos varían desde infiltrados inflamatorios hasta necrosis y granulomas (Rojas et al. 1993; Abreu-Silva et al. 2004). En ratones BALB/c con LC por *L. amazonensis* se ha observado la presencia de una reacción inflamatoria con intensa carga parasitaria en macrófagos vacuolados y linfocitos, además de zonas de necrosis focal y en ratones C57BL/6 se ha observado la formación de granuloma con macrófagos infectados y fibrosis dérmica (Cupolilo et al., 2003).

3.1.3 Ultraestructura del parásito y de la lesión de LC

La *Leishmania*, al igual que otros tripanosomátidos, presentan una ultraestructura celular compleja y especializada. La membrana celular está compuesta por un periplasto, que consiste en tres capas. Las dos capas exteriores corresponden a la bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos de aproximadamente 100 Å de espesor que corren paralelas y están muy próximas entre sí. La tercera capa del periplasto se encuentra debajo de la membrana interna y está formada por fibrillas tubulares finas, con un diámetro de aproximadamente 230 Å. Estas fibrillas están presentes tanto en amastigotes como en promastigotes (Rudzinska et al., 1964). El núcleo de estos parásitos tiene

una organización similar a la de otras células eucariotas, localizado centralmente en el cuerpo celular. En las formas amastigote y promastigote, el núcleo tiene una forma redondeada. El genoma abarca entre 43 y 50 Mb, genera entre 30 y 40 bandas cromosómicas que varían de 0,45 a 4,0 Mb (Johnston et al. 1999). Además, posee un único flagelo que emerge de una invaginación denominada bolsillo flagelar (FP). Este flagelo presenta una estructura básica de microtúbulos axonemales y su longitud varía desde 1 μm en la forma amastigote hasta 30 μm en las formas de promastigotes (Martinez-Palomo et al. 1976; De Souza et al. 1978). El FP es una invaginación de la membrana plasmática desde donde emerge el flagelo, y se considera un compartimento extracelular especializado debido a su intensa actividad endocítica y exocítica, su falta de microtúbulos subpeliculares y su composición proteica (Simpson 1972; Webster & Russel 1993). Además, poseen un cinetoplasto, una estructura electrodensa ubicada cerca del núcleo, cuya organización varía según la etapa del parásito (Shapiro & Englund 1995; Lukes et al. 2002). Este cinetoplasto está formado por el ADN mitocondrial (k-ADN), compuesto por minicírculos y macrocírculos que participan en el proceso de edición de ARN y son análogos estructurales y funcionales al ADN mitocondrial de eucariotas superiores (Shapiro & Englund 1995; De Souza & Cavalcanti 2008). El aparato de Golgi, compuesto por cisternas aplanadas y vesículas localizado cerca al cinetoplasto. Además, en el citoplasma se observan inclusiones lipídicas y acidocalcisomas que se distribuyen, mientras que los glucosomas generalmente se agrupan en el extremo posterior de las células. Por último, los acidocalcisomas aparecen como pequeños orgánulos redondos con una matriz electrodensa homogénea, los cuales varían según la fase de crecimiento y especie del parásito (Corrêa et al., 2007; Castro et al., 2017).

Las observaciones ultraestructurales de las lesiones cutáneas por LC muestran la relación entre los parásitos y las células del huésped, en términos de morfología durante la infección. En pacientes ecuatorianos con LC por *L. guyanensis* y *L. panamensis*, las lesiones revelan la presencia de amastigotes adheridos a la membrana del fagolisosoma, tanto dentro como fuera de los macrófagos. Los parásitos, de forma redondeada u ovalada, presentan una longitud de 2,62 μm y un ancho de 2,18 μm . Se evidenció la degeneración de los parásitos dentro de las vacuolas parasitóforas en los macrófagos, lo que indica un proceso activo de destrucción intracelular. Asimismo, los linfocitos se encontraban en estrecho contacto con los macrófagos parasitados y los parásitos (Bhutto et al., 1992). En los modelos experimentales murinos infectados con *L. major* y *L. lainsoni*, los hallazgos ultraestructurales mostraron la presencia de amastigotes dentro de vacuolas parasitóforas en los macrófagos y, en algunos casos, extracelularmente en las lesiones cutáneas. En ratones BALB/c infectados con *L. major*, los amastigotes presentaban una forma esférica u ovalada, con una membrana plasmática intacta, un núcleo esférico con heterocromatina, microtúbulos subpeliculares, un cinetoplasto en forma de bastón, un bolsillo flagelar e inclusiones lipídicas (Maha et al., 2012). En los hámsteres infectados con *L. lainsoni*, las lesiones crónicas mostraron una desorganización tisular severa, con edema, necrosis y depósito de colágeno. Aproximadamente el 40% de los amastigotes se encontraron libres en el sitio de la lesión, y también se observaron eosinófilos (Corrêa et al., 2007). Los fagolisosomas se pueden clasificar en dos tipos según las especies de *Leishmania*: vacuolas individuales pequeñas (tipo I) y vacuolas comunales grandes (tipo II). Estas vacuolas han sido analizadas en diversas especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo, utilizando modelos experimentales en ratones y cultivos de macrófagos derivados de médula ósea. En *L. major*, los amastigotes residen en vacuolas tipo I, donde la membrana se ajusta estrechamente alrededor del parásito (Castro et al., 2006). Los

estudios *in vitro* y en ratones han demostrado que los amastigotes permanecen en vacuolas separadas. En *L. tropica* se forman vacuolas pequeñas y ajustadas, similares a las de *L. major* (Castro et al., 2006). Por otro lado, las especies del Nuevo Mundo, como *L. amazonensis* y *L. mexicana*, forman vacuolas tipo II, que son grandes, espaciosas y albergan múltiples amastigotes. Estas vacuolas permiten la observación de varios parásitos, con los amastigotes adheridos a la membrana vacuolar en puntos específicos. Mientras que las vacuolas del Viejo Mundo tienden a ser más pequeñas y contener un solo amastigote, las vacuolas del Nuevo Mundo son más grandes y comunales, albergando varios parásitos (Castro et al., 2006). También se ha observado eritrofagocitosis, donde amastigotes viables se encuentran en contacto cercano con la membrana de los glóbulos rojos, monocitos y plaquetas sanguíneas. Además, se observan amastigotes libres en las proximidades de otras reacciones celulares inflamatorias de mastocitos y eosinófilos (Eid et al., 2014). En algunos casos de LC, se observan amastigotes dentro de vesículas epidérmicas, acompañados de linfocitos y otras células mononucleares cercanas. Estos parásitos también se encuentran dentro y entre los queratinocitos, adheridos a células mononucleares que contienen gránulos de melanina. Los parásitos también están presentes en el citoplasma de eosinófilos y neutrófilos, sin vacuolas celulares (Bhutto et al., 1992).

3.1.4 Mecanismo de acción de la MTF: efecto directo y efecto inmunomodulador

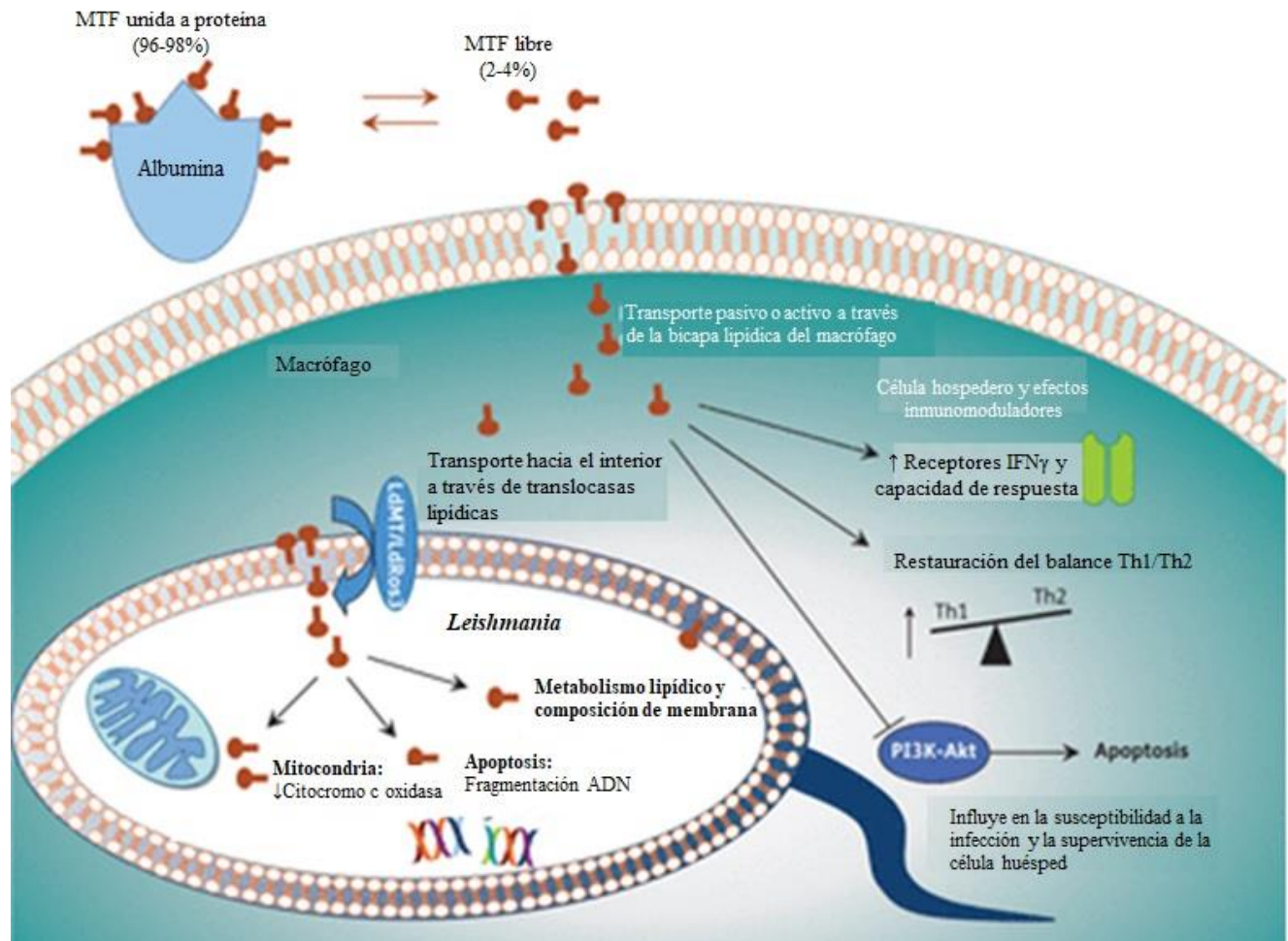
El mecanismo de acción de la MTF, aunque no ha sido completamente esclarecido, destaca por su doble efecto: uno directo contra el parásito y otro indirecto como inmunomodulador en el huésped. En la **Figura 30** se observa que la MTF se une a la albúmina en el plasma (Kip et al., 2017). Esta unión facilita su transporte a través del torrente sanguíneo, prolongando su vida media en circulación y modulando su disponibilidad para alcanzar los tejidos infectados. Parte de la MTF

puede quedar libre ingresa a las células mediante mecanismos de transporte pasivo o activo. Se ha demostrado que la MTF puede acumularse en las balsas lipídicas de las membranas celulares (Malta De Sá et al., 2015), donde aumenta la fluidez de la membrana y modula la señalización dependiente de estas estructuras. Entre estas señales se incluyen la activación de quinasas y la inhibición de la fosfatidilcolina sintasa, lo que afecta la síntesis de lípidos esenciales para la supervivencia del parásito (Weller et al., 2009; Moreira et al., 2014).

Una vez en el citoplasma, la MTF es transportada al parásito a través de la translocasa lipídica LdMT y su subunidad LdRos3. LdMT pertenece a la subfamilia P4 de las ATPasas de tipo P, las cuales transportan lípidos hacia el interior de las membranas (Weingärtner et al., 2010), facilitando la acumulación de MTF en las membranas del parásito. Esto altera la homeostasis lipídica, lo que eventualmente conduce a la muerte celular. En el parásito, la MTF inhibe la biosíntesis de fosfolípidos y la citocromo c oxidasa mitocondrial, induce apoptosis mediante la fragmentación del ADN, y afecta la señalización celular dependiente de lípidos, así como la homeostasis intracelular del Ca^{2+} (Urbina et al., 2006; Luque-Ortega & Rivas, 2007; Paris et al., 2004; Pinto-Martínez et al., 2017). A nivel del huésped, la MTF aumenta la expresión de los receptores de $\text{IFN}\gamma$ en los macrófagos, mejorando la capacidad de respuesta inmune y restaurando el equilibrio Th1/Th2. Esto promueve una respuesta Th1 favorable para la eliminación del parásito. Además, la MTF influye en la vía PI3K-Akt, afectando la susceptibilidad a la infección y la supervivencia de las células huésped, induciendo apoptosis (**Figura 29**) (Dorlo et al., 2002).

En cuanto a sus propiedades inmunomoduladoras, la MTF ejerce sus efectos a través del receptor del factor de agregación plaquetaria (PAF), lo que aumenta la producción de IL-12, la expresión del receptor de $\text{IFN}\gamma$, y reduce la respuesta Th2, que incluye la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. También activa la producción de $\text{IFN}\gamma$ y estimula la inmunidad celular del

huésped (Pálic et al., 2019). Se ha observado que la MTF genera interacciones entre varias células inmunitarias, incluidas neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células NK y macrófagos. En cuanto a los mecanismos de la línea granulocítica, la MTF promueve la eliminación de parásitos mediante la fagocitosis por neutrófilos, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y el aumento en la producción de CXCL8. La activación de eosinófilos reduce la inflamación y el daño tisular, suprimiendo las reacciones efectoras eosinofílicas. Además, inhibe la desgranulación de mastocitos, la reorganización de microtúbulos y la quimiotaxis, mientras modula las balsas lipídicas e incrementa la expresión de CD16 y CD68 en monocitos. Finalmente, la MTF potencia la actividad de los macrófagos M1, lo que aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO) y ROS, reforzando las respuestas Th1 y creando un entorno hostil para la supervivencia del parásito (Benaim & Paniz-Mondolfi, 2024).

Figura 30 Mecanismo de acción e inmunomodulatorio de la MTF

Nota: grafica modificada de Dorlo et al., 2012.

En modelos de células cancerígenas, la MTF actúa inhibiendo la vía de señalización PI3K/Akt (Ruiter et al., 2003) lo que contribuye a controlar el crecimiento y proliferación celular. Además, se ha observado que induce respuestas Th1 dependientes de IL-12 (Wadhone et al., 2009), reforzando la respuesta inmunitaria contra el cáncer. En cultivos primarios de humanos, los efectos de la MTF han sido descritos en células T (Bäumer et al., 2010), mastocitos (Weller et al., 2009) y la regulación de la inflamación eosinofílica *in vitro* e *in vivo* (Knuplez et al., 2021).

También se ha demostrado que la MTF muestra efectos antiinflamatorios en las células endoteliales, disminuyendo la inflamación vascular (Fang et al., 2019). En estudios preclínicos, se ha observado que la MTF atenúa la inflamación alérgica en modelos de inflamación dérmica en ratones dependientes de células T (Bäumer et al., 2010). Además, mejora la dermatitis local en pacientes con dermatitis atópica (Dölle et al., 2010). También se ha demostrado que la MTF inhibe la activación y desgranulación de los mastocitos, lo que contribuye a reducir significativamente la manifestación de enfermedades alérgicas en pacientes (Magerl et al., 2013; Maurer et al., 2012; Rubíková et al., 2018).

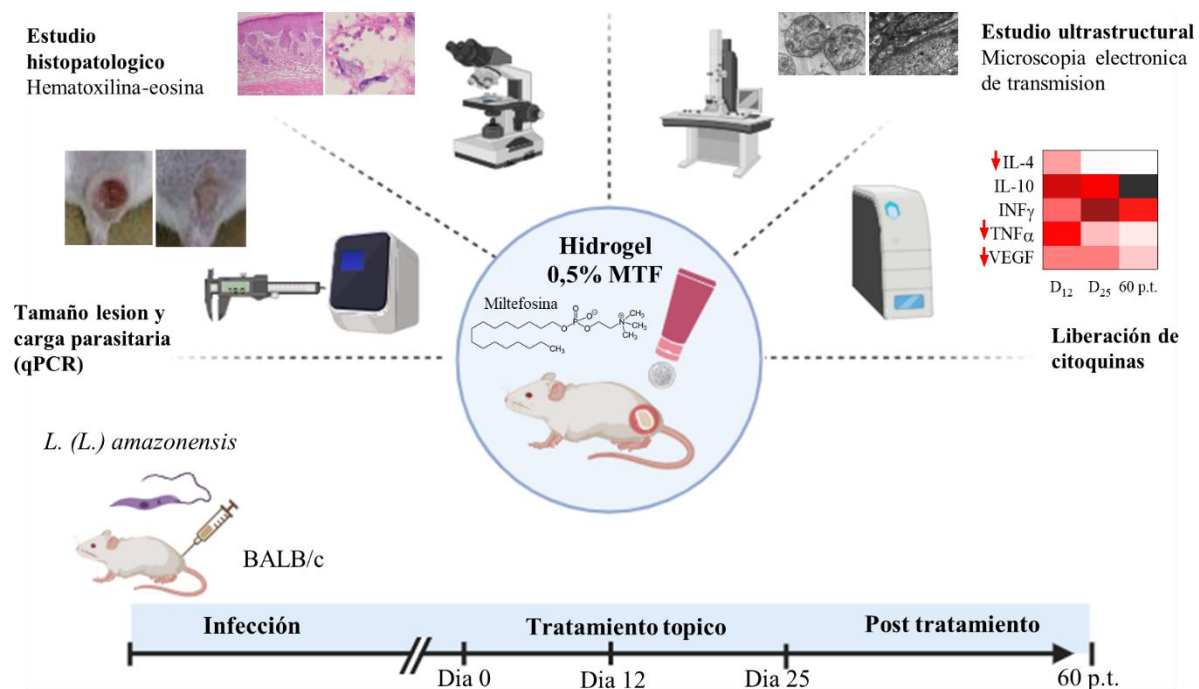
Teniendo en cuenta la eficacia de la MTF como agente inmunomodulador y antiparasitario, así como su capacidad para reducir la carga parasitaria y modular la respuesta inmune del huésped en modelos experimentales de LC y continuando en la vía de la implementación de la MTF de uso tópico en LC, la pregunta que se quiere resolver en este capítulo es ¿Cuáles son los efectos *in situ* del tratamiento con fMTF aplicada directamente sobre lesiones de LC en diferentes tiempos del tratamiento y postratamiento? Y el objetivo fue examinar los aspectos histopatológicos, inmunológicos y ultraestructurales de las lesiones de LC en el proceso de cicatrización en diferentes tiempos de tratamiento y p.t. con fMTF tópica.

3.2 Metodología

Este capítulo detalla la metodología empleada en un estudio experimental *in vivo*, donde se evaluaron los efectos macroscópicos, histopatológicos, ultraestructurales e inmunomodulatorios de la MTF tópica en modelos de ratones BALB/c con LC. El estudio se llevó a cabo en diversas fases: antes, durante y después del tratamiento, con el fin de monitorear la respuesta del tratamiento tópico. Las formulaciones tópicas de MTF (fMTF) y los ensayos de liberación de citoquinas se

realizaron en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP-UIS. Por otro lado, los estudios histológicos se condujeron en el Laboratorio del Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la UIS, contando con el apoyo y asesoría del profesor Julio Cesar Mantilla. Además, el análisis ultraestructural se efectuó en el laboratorio de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud, bajo la coordinación del Doctor Orlando Torres. Todos los experimentos realizados recibieron el aval ético del Comité de Ética de la UIS (CIENCI), asegurando la conformidad con los principios de bienestar animal. La **Figura 31** ilustra el diseño metodológico adoptado para este estudio.

Figura 31 *Diseño experimental utilizado en este capítulo*



3.2.1 *Formulación de miltefosina (fMTF)*

Se utilizó una formulación de MTF (fMTF 0,5% p/v) y el vehículo (sin MTF), preparados y caracterizados según lo descrito en el Capítulo 1.

3.2.2 Grupos experimentales y tratamiento

Los ratones BALB/c ($n=40$), sanos de 7-8 semanas fueron infectados en la parte dorsal vía subcutánea con 5×10^5 promastigotes en fase estacionaria de *L. amazonensis*. Cuando las lesiones (nódulos y/o úlceras) tuvieron un área $>20 \text{ mm}^2$ fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: el grupo 1 tratado con la fMTF al 0,5% y el grupo 2 con el vehículo (**Tabla 12**). Los ratones fueron tratados tópicamente, sobre las lesiones con una dosis de 10 mg/día por 25 días y fueron observados para determinar cambios en el comportamiento y signos del estrés, además fueron pesados. Los ratones fueron sacrificados en diferentes momentos Dosis 0: D0 (inicio tratamiento); Dosis 12: D12 (mitad de tratamiento); Dosis 25: D25 (fin de tratamiento) y pt: 60 días post tratamiento (**figura 31, tabla 13**). Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina y sacrificados por dislocación cervical. Se tomaron improntas del sitio de la lesión y fragmentos (biopsias) de piel/lesión. Las improntas fueron teñidas con Giemsa para determinar la presencia de parásitos y las biopsias fueron separadas en segmentos para la cuantificación de la carga parasitaria y la realización los estudios histopatológicos, ultraestructurales e inmunomodulador.

Tabla 12 Grupos experimentales y tamaño de muestra (n)

Grupo	Parásito	n	Formulación	% MTF	Extracción de muestras (n)			
					D0	D12	D25	pt
1	<i>L. amazonensis</i>	24	fMTF	0,5	6	6	6	6
2		16	Vehículo	0	4	4	4	4

Nota: n: número de ratones por grupo; D0: dosis 0, Inicio tratamiento; D12: Dosis 12, mitad del tratamiento; D25: Dosis 25, Fin del tratamiento; pt: 2 meses post tratamiento.

3.2.3 Determinación del tamaño de lesión y la carga parasitaria

Las lesiones fueron medidas cada semana utilizando un caliper digital. El área de la lesión se calculó mediante la fórmula del área de una elipse $A: \pi \times r1 \times r2$, donde r1: es el radio longitudinal y r2: es el radio transversal. Los resultados fueron expresados como la media del área de las lesiones (mm^2) \pm error estándar (EE). Adicionalmente se llevó registro fotográfico. Para la carga parasitaria después del sacrificio y en cada tiempo estudiado se recolectaron fragmentos de lesión los cuales fueron congelados a -80°C . La carga parasitaria fue determinada por qPCR (ver protocolo descrito en capítulo 2). La cuantificación de los parásitos de *Leishmania* se obtuvo trazando las concentraciones de parásitos contra los valores de CT por regresión lineal. Los resultados fueron expresados como la media de concentración del número de parásitos /lesión \pm EE.

3.2.4 Análisis histopatológico

Después del sacrificio y en cada tiempo estudiado (0, 12, 25 días de tratamiento y 60 día pt.) las biopsias de aprox 5-10 μm fueron fijadas en formol tamponado al 10% (formaldehído al 37% en agua destilada pH:7, fosfato de sodio monobásico, $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$ y fosfato de sodio di básico, $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$). Después de 24 h, fueron sometidas a un proceso de deshidratación utilizando una serie de soluciones alcohólicas de menor a mayor concentración. Posteriormente fueron embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 μm de grosor utilizando un micrótopo y se colocaron en láminas portaobjetos. Finalmente, fueron coloreadas con hematoxilina y eosina

(H-E). El procesamiento de las biopsias se realizó de acuerdo con el manual de procesos y procedimientos del Laboratorio de Patología de la UIS. Para el procedimiento, lectura e interpretación de las láminas histológicas se contó con la colaboración del personal del Laboratorio de Patología, UIS.

Las alteraciones histopatológicas o variables evaluadas en la epidermis fueron: acantosis (aumento de la multiplicación y aumento del grosor de la epidermis), espongiosis (edema intraepidérmico), hipergranulosis (engrosamiento del estrato granular debido a un aumento de queratinocitos con gránulos de queratohialina en el citoplasma), hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo), paraqueratosis (persistencia de núcleos en el estrato córneo), papilomatosis (hiperplasia de los queratinocitos) y queratinocitos reactivos. En la dermis fueron: fibrosis (desarrollo excesivo de tejido conectivo fibroso), angiogénesis, infiltrado inflamatorio (regular, irregular, difuso), tipo celular presente en el infiltrado (linfocitos, plasmocitos, células polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, células gigantes, mastocitos y granulomas), y cantidad de amastigotes. La lectura de las láminas se realizó utilizando un microscopio óptico (aumento 10x, 40x y 100x). Se utilizó una escala cualitativa categórica con cruces para evaluar cada variable, donde se asignaron los siguientes valores: (-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) severo. Los resultados fueron registrados en una base de datos y se realizó registro fotográfico de los hallazgos histológicos más relevantes.

3.2.5 Análisis ultraestructural de las biopsias

Después del sacrificio y en cada tiempo estudiado, un fragmento de la lesión cutánea fue fijado con glutaraldehído al 3%. Las muestras se dividieron en varios fragmentos, se lavaron con buffer fosfato 0,1 M pH 7,2 y se fijaron en tetraóxido de osmio OsO₄ al 1%. Después de lavar en buffer fosfato se realizó deshidratación en un gradiente de etanol de 50 a 100 %. El tejido se infiltró

con una mezcla de óxido de propileno C_3H_6O y Epón Araldita® en una relación de 2:1, 1:1 y resina pura. Finalmente se incluyó en resina epóxica Epón –Araldita. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 nm utilizando un ultramicrotomo, que se contrastaron con acetato de uranilo $UO_2(C_2H_3O_2)_2$ y citrato de plomo $(C_6H_5O_7)_2Pb$. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Zeiss EM 109 a 80kV a 3000x, 4400x y 7000x aumentos. Los resultados fueron expresados cualitativamente como cambios ultraestructurales en los macrófagos dérmicos infectados con *L. (L.) amazonensis* (núcleo, membrana celular, vacuolas parasitófora, mitocondria y parásitos) y cambios ultraestructurales en amastigotes intracelulares del parásito (Núcleo, membrana celular, vacuolas y cinetoplasto) en ratones tratados tópicamente con fMTF. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Morfología Celular del Instituto Nacional de Salud.

3.2.6 Cuantificación de proteínas y citoquinas

3.2.6.1 Homogenizado de piel

Se recolectaron fragmentos de piel/lesión de los animales tratados con fMTF al 0,5%, vehículo y sin infección los cuales fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Los tejidos se descongelaron y se dejaron en una solución de lisis (PBS pH:7.0; Tritón X-100 0,2 % v/v) con inhibidores de proteasas (Tabletas SIGMAFAST™, Sigma-Aldrich, USA) por 30 min, seguidamente fueron homogenizados utilizando ULTRA-TURRAX® (Ika, Campinas, Brasil) realizando 4 ciclos de 15 segundos cada uno. Después de la lisis, las muestras fueron centrifugadas a 10000 g por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se colectó el sobrenadante en alícuotas y se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.2.6.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales de los homogenizado se analizaron por el método colorimétrico del ácido bicinónico BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (BIO BASIC, NY, USA). Se realizó la curva de calibración utilizando como estándar la albumina suero bovino. Se realizaron diluciones del estándar en la solución de lisis (2500 a 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en viales de 1,5 mL, se transfirieron a una placa de 96 pozos 25 μL de las diluciones del estándar y muestras. Seguidamente, se agregó 200 μL del reactivo de trabajo BCA suministrado en el kit en cada pozo, mezclando suavemente y dejando incubar por 30 min a 37 °C. Se midió la absorbancia a 562 nm utilizando un lector de placas Synergy H1. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Los resultados fueron expresados como la media (mg/mL) \pm EE de proteínas.

3.2.6.3 Cuantificación de citoquinas

La determinación cuantitativa de las citocinas TNF- α , INF- γ , VEGF, IL-4 e IL-10 se realizó mediante el inmunoensayo para múltiples analitos de un kit múltiplex MCYTOMAG-70K (Millipore, Burlington, MA) acoplado a la plataforma la tecnología Luminex® xMAP® en formato de perlas magnéticas, adquirida comercialmente. La detección y cuantificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como la media \pm E.E de citoquina/mg de proteínas en dos experimentos independientes realizados por triplicado. Homogeneizados de piel de ratones no infectados se utilizaron como control. El Índice de Regulación de Citoquinas de infección (siglas en inglés, ICRI) se calculó dividiendo las citoquinas producidas en las lesiones de LC por aquellas producidas en la piel sana. El ICR de tratamiento (ICRt) se calculó dividiendo las citoquinas producidas en respuesta al tratamiento con fMTF por aquellas producidas en respuesta al tratamiento con vehículo.

3.2.7 *Análisis de resultados*

La evolución del tamaño de lesiones de cada grupo fue analizada utilizando la prueba ANOVA de una sola vía comparando las medias de las diferentes dosis evaluadas (D0, D12, D25 y pt) del tratamiento con fMTF 0,5%. Las pruebas post hoc aplicadas para los ensayos *in vitro* e *in vivo* fueron la prueba de comparación múltiple Turkey o Dunnett, respectivamente. Los hallazgos histopatológicos de la epidermis (Acantosis, espongirosis, hipergranulosis, hiperqueratosis, paraqueratosis, papilomatosis y queratinocitos reactivos) y en la dermis (Fibrosis, angiogénesis, necrosis e infiltrado inflamatorio difuso y el predominio celular) se compararon con los grupos experimentales, antes, durante, final y pt mediante la prueba de chi-cuadrado. Se realizó una descripción de los hallazgos ultraestructurales observados en el parásito y el macrófago. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si la distribución de las variables continuas tales como carga parasitaria y concentración de citoquinas eran paramétrica o no paramétrica. Se realizó los análisis de cuantificación de citoquinas asumieron una distribución no paramétrica y se realizó una comparación entre grupos (D0, D12, D25 y pt) del tratamiento con fMTF 0,5% utilizando pruebas estadísticas de comparación múltiple de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism® Versión 8,0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

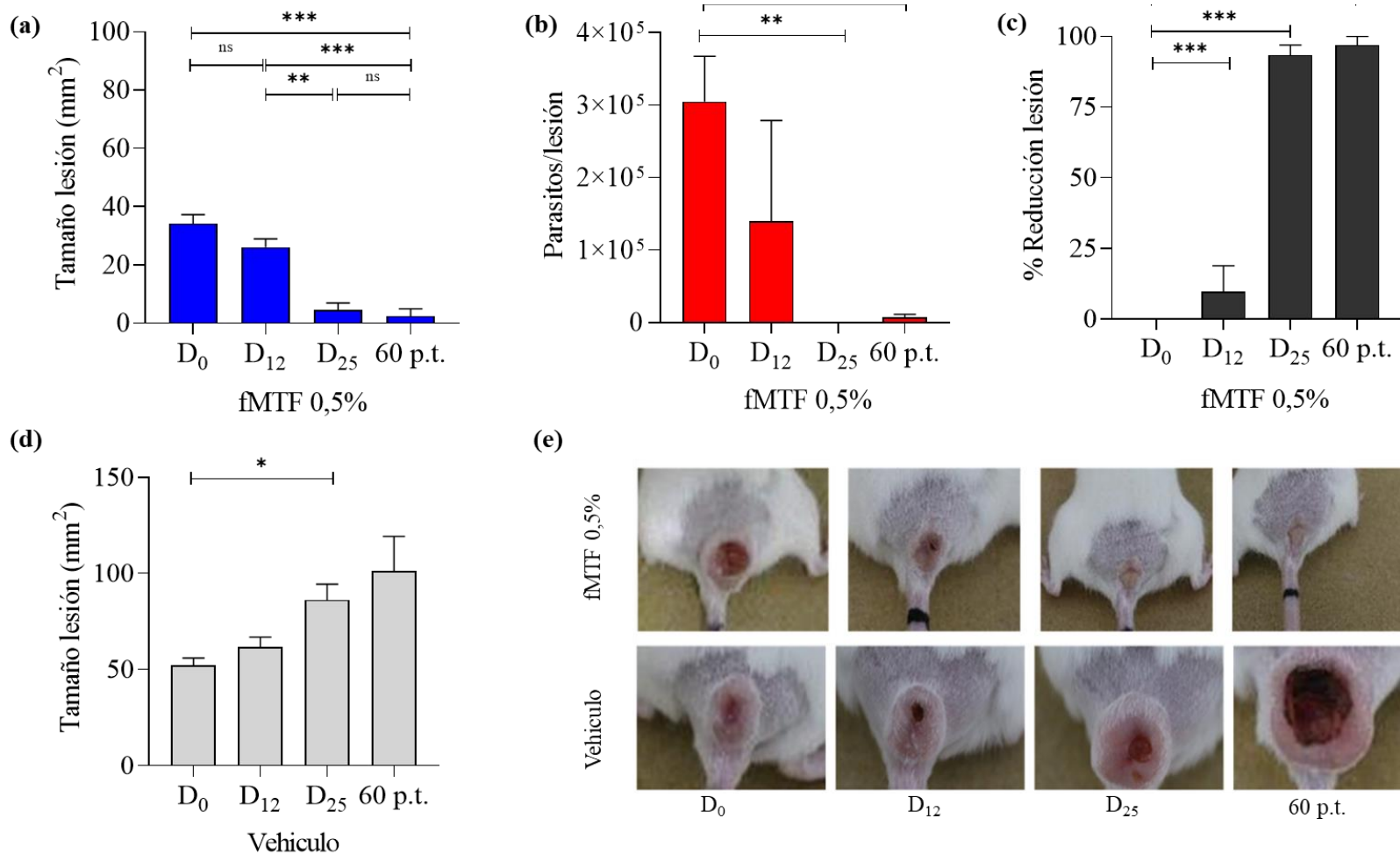
3.3 Resultados

3.3.1 *Efecto del tratamiento en la reducción de las lesiones y carga parasitaria en cada tiempo estudiado*

Las lesiones causadas por *L. amazonensis* se desarrollaron a partir de los 30 días de infección. A los 60 días p.i se observaron lesiones nodulares y ulceradas en mayoría de los casos. El tratamiento se inició con lesiones entre 20,58 y 50,30 mm². En el grupo 1, tratado con fMTF 0,5%, a los 12 y 25 días de tratamiento y a los 60 días pt, se observó una reducción del tamaño de lesión y de la carga parasitaria del 23,67%, 86,88 % y 92,78% y del 54,1%, 99,99% y 97,7% respectivamente. Las lesiones fueron disminuyendo de 34,22±3,1 mm², a 26,12±2,8 mm², 4,49±2,5 mm², 2,47±2,4 mm² (**Figura 32a,c**) y la carga parasitaria de 304862±62655 a 140005±138877, 3,51±3,5 y 6976±4687 parásitos/lesión (**Figura 32d**).

En el grupo 2, tratado con el vehículo, se observó un aumento en el tamaño las lesiones en los diferentes tiempos evaluados de 52,16±3,7mm² a 61,78±5,1 mm², 86,20±8,2 mm² y 101,2±18,12 mm², respectivamente (**Figura 32b**). La carga parasitaria osciló en los grupos experimentales entre 106473±25613 y 180907±111468. En cuanto a los aspectos morfológico de las lesiones se observó una reducción en los tamaños de las úlceras y posterior aplanamiento de los nódulos hasta observarse la formación de cicatriz o reepitalización completa (**Figura 32e**).

Figura 32 Evaluación (Dosis 0: D0, Dosis12: D12, Dosis 25: D25 y 60 días p.t.) tratamiento con fMTF 0,5%.



Nota: La figura muestra el efecto del fMTF sobre el tamaño de las lesiones a. fMTF, b. Vehículo. c. % de reducción de las lesiones tratadas con fMTF. d. Carga parasitaria. E. Lesiones cutáneas de ratones tratados con fMTF. Prueba de comparación múltiple Turkey. *Diferencias significativas p<0,05 ** p<0,01 ***p< 0,005.

3.3.2 Características histopatológicas de las biopsias de lesiones antes durante y después del tratamiento tópico con fMTF 0.5%

Los cambios estructurales en las diferentes capas de la piel (epidermis y dermis) se muestran en la **Tabla 13**. Al iniciar el tratamiento, la epidermis presentó severa acantosis, espongirosis, hiperqueratosis, gran cantidad de queratinocitos reactivos, moderada hipergranulosis y paraqueratosis, las cuales fueron disminuyendo su intensidad durante y al final de tratamiento y 60 días pt. Aspecto interesante, fue el hallazgo de papilomatosis durante y al final del tratamiento, la cual desapareció en el tiempo pt, lo que indica una irritación reversible del tratamiento (OECD, 2015). En cuanto a la dermis, al inicio del tratamiento se observó severa fibrosis, angiogénesis, necrosis e infiltrado inflamatorio difuso con predominio celular de linfocitos, plasmocitos, macrófagos vacuolados con abundante cantidad de amastigotes, estos aspectos de la dermis fueron disminuyendo durante, final del tratamiento, y pt. Aspectos como la aparición de células gigantes, granuloma y mastocitos fueron observados durante y al final del tratamiento, los cuales disminuyeron en el tiempo pt (**Figura 33 y 34**).

En cuanto al tratamiento con el vehículo (sin MTF), las alteraciones histopatológicas se muestran en la **tabla 14**. Los hallazgos histopatológicos en la epidermis y dermis persistieron en durante los diferentes tiempos de estudio. A diferencia del tratamiento tópico con la fMTF 0,5%, el vehículo mostró una leve aparición de papilomatosis a las 12 dosis de tratamiento en la epidermis. En la dermis, no se observó la presencia de células gigantes, mastocitos y granulomas (**Figura 33**).

Tabla 13 Características e intensidad de las variables histopatológicas estudiadas en lesiones de ratones con LC tratados vía tópica con fMTF.

	0				12 dosis				25 dosis				60 días Pt			
	n=6 (%)				n=6 (%)				n=6 (%)				n=6 (%)			
Epidermis	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)
Acantosis*	6(100)	0	0	0	1(17)	4(67)	1(17)	0	0	1(17)	5(83)	0	2(33)	0	2(33)	2(33)
Espongiosis*	6(100)	0	0	0	1(17)	3(50)	1(17)	1(17)	0	1(17)	2(33)	3(50)	0	1(16,7)	1(17)	4(67)
Hipergranulosis																
*	0	5(83,3)	1(17)	0	3(50)	1(17)	2(33)	0	3(50)	1(17)	2(33,3)	0	0	0	2(33)	4(67)
Hiperqueratosis																
*	3(50)	3(50)	0	0	0	4(67)	2(33)	0	1(17)	4(67)	1(17)	0	0	0	3(50)	3(50)
Paraqueratosis*	3(50)	1(17)	2(33)	0	1(17)	2(33)	3(50)	0	0	3(50)	3(50)	0	0	0	2(33)	4(67)
Papilomatosis*	0	0	0	6(100)	0	2(33)	1(17)	3(50)	0	2(33)	4(67)	0	0	0	1(16)	5(83)
QR*	6(100)	0	0	0	6(100)	0	0	0	2(33)	(33)	2(33)	0	2(33)	0	3(50)	1(17)
Dermis	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)
Fibrosis	3(50)	3(50)	0	0	4(67)	2(33)	0	0	3(50)	2(33)	0	1(17)	2(33)	0	2(33)	2(33)
Angiogénesis	3(50)	1(17)	2(33)	0	3(50)	2(33)	1(17)	0	0	2(33)	1(17)	3(50)	0	1(17)	2(33)	3(50)
IID*	6(100)	0	0	0	6(100)	0	0	0	2(33)	0	4(67)	0	0	2(33)	4(66)	0

Necrosis	3(50)	2(33)	1(17)	0	2(33)	1(17)	2(33)	1(17)	0	0	3(50)	3(50)	0	1(17)	1(16)	4(67)
<i>Predominio Celular</i>																
Linfocitos	6(100)	0	0	0	6(100)	0	0	0	5(83,3)	0	1(17)	0	2(33)	1(17)	3(50)	0
Plasmocitos*	6(100)	0	0	0	2(33)	4(67)	0	0	1(17)	2(33)	3(50)	0	2(33)	1(17)	2(33)	1(17)
PMN	0	0	3(50)	3(50)	0	0	6(100)	0	0	0	3(50)	3(50)	0	0	2(33)	4(67)
Macrófagos*	6(100)	0	0	0	5(83)	1(17)	0	0	4(67)	0	2(33)	0	1(17)	3(50)	1(17)	1(17)
Células gigantes	0	0	0	6(100)	0	2(33)	4(67)	0	0	0	4(66)	2(33)	0	0	1(17)	5(83)
Mastocitos*	0	0	0	6(100)	0	1(17)	3(50)	2(33)	0	5(83)	1(16)	0	0	6(100)	0	0
Granuloma*	0	0	0	6(100)	0	0	1(17)	5(83)	0	0	4(66)	2(33)	0	0	2(33)	4(66)
Amastigotes*	6(100)	0	0	0	0	2(33)	3(50)	1(17)	0	0	3(50)	3(50)	0	1(17)	2(33)	3(50)

Nota: La tabla muestra la intensidad [(-): ausencia, +(1-15/campo): leve, ++(16-30/campo): moderado, +++(>30/campo): severo] de las variables encontradas en la epidermis y la dermis a los 0, 12, 25 dosis y 60 días pt. Observación en 50 campos microscópicos, aumentos de 1000x. QR: queratinocitos reactivos; IID: infiltrado inflamatorio difuso; PMN: polimorfonucleares. * $\rho < 0,05$ Diferencias estadísticamente significativas

Tabla 14 Características e intensidad de las variables histopatológicas estudiadas en lesiones de ratones con LC tratados vía tópica con el vehículo (sin MTF).

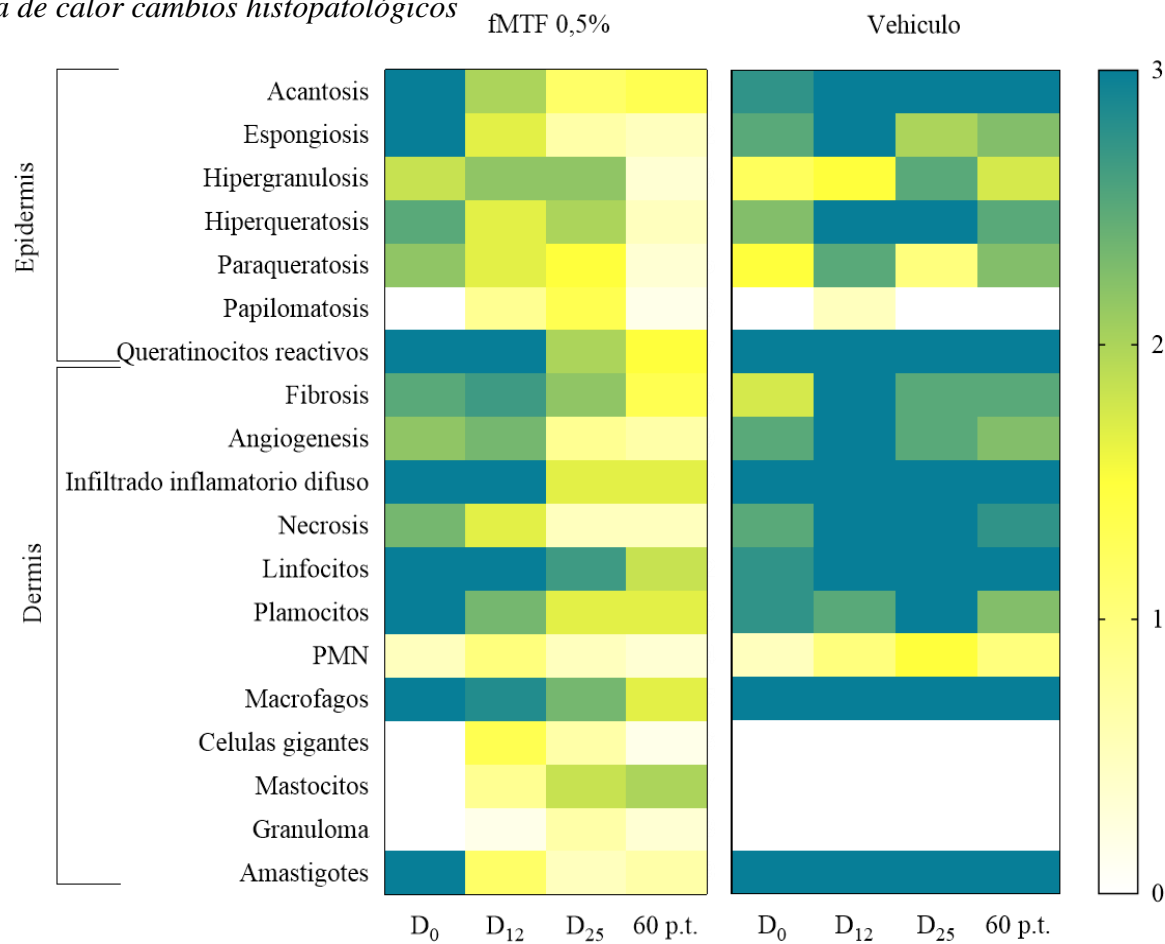
	Inicio	12 días	25 días	60 días post infección
--	--------	---------	---------	------------------------

	n=4 (%)				n=2 (%)				n=2 (%)				n=2 (%)			
	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)
Epidermis																
Acantosis	3(75)	1(25)	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0
Espongiosis	3(75)	0	1(25)	0	2(100)	0	0	0	1(50)	0	1(50)	0	1(50)	1(50)	0	0
Hipergranulosis	0	1(25)	3(75)	0	0	1(50)	1(50)	0	1(50)	1(50)	0	0	0	2(100)	0	0
Hiperqueratosis	1(25)	3(75)	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	1(50)	0	1(50)	0
Paraqueratosis	1(25)	0	3(75)	0	1(50)	1(50)			0	0	2(100)	0	1(50)	0	1(50)	0
Papilomatosis	0	0	0	4(100)	0	0	1(50)	1(50)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)
QR	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0
<hr/>																
Dermis	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)	(+++)	(++)	(+)	(-)
Fibrosis	1(25)	1(25)	2(50)	0	2(100)	0	0	0	1(50)	1(50)	0	0	1(50)	1(50)	0	0
Angiogénesis	3(75)	0	1(25)	0	2(100)	0	0	0	1(50)	1(50)	0	0	1(50)	1(50)	0	0
IID	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0
Necrosis	2(50)	2(50)	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0
<i>Predominio Celular</i>																
Linfocitos	3(75)	1(25)	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0
Plasmocitos	3(75)	1(25)	0	0	1(50)	1(50)	0	0	2(100)	0	0	0	1(50)	1(50)	0	0
PMN	0	0	2(50)	2(50)	2(100)	0	0	0	0	1(50)	1(50)	0	0	0	2(100)	0

macrófagos	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0
Células gigantes	0	0	0	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)
Mastocitos	0	0	0	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)
granuloma	0	0	0	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)
Amastigotes	4(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0	2(100)	0	0	0

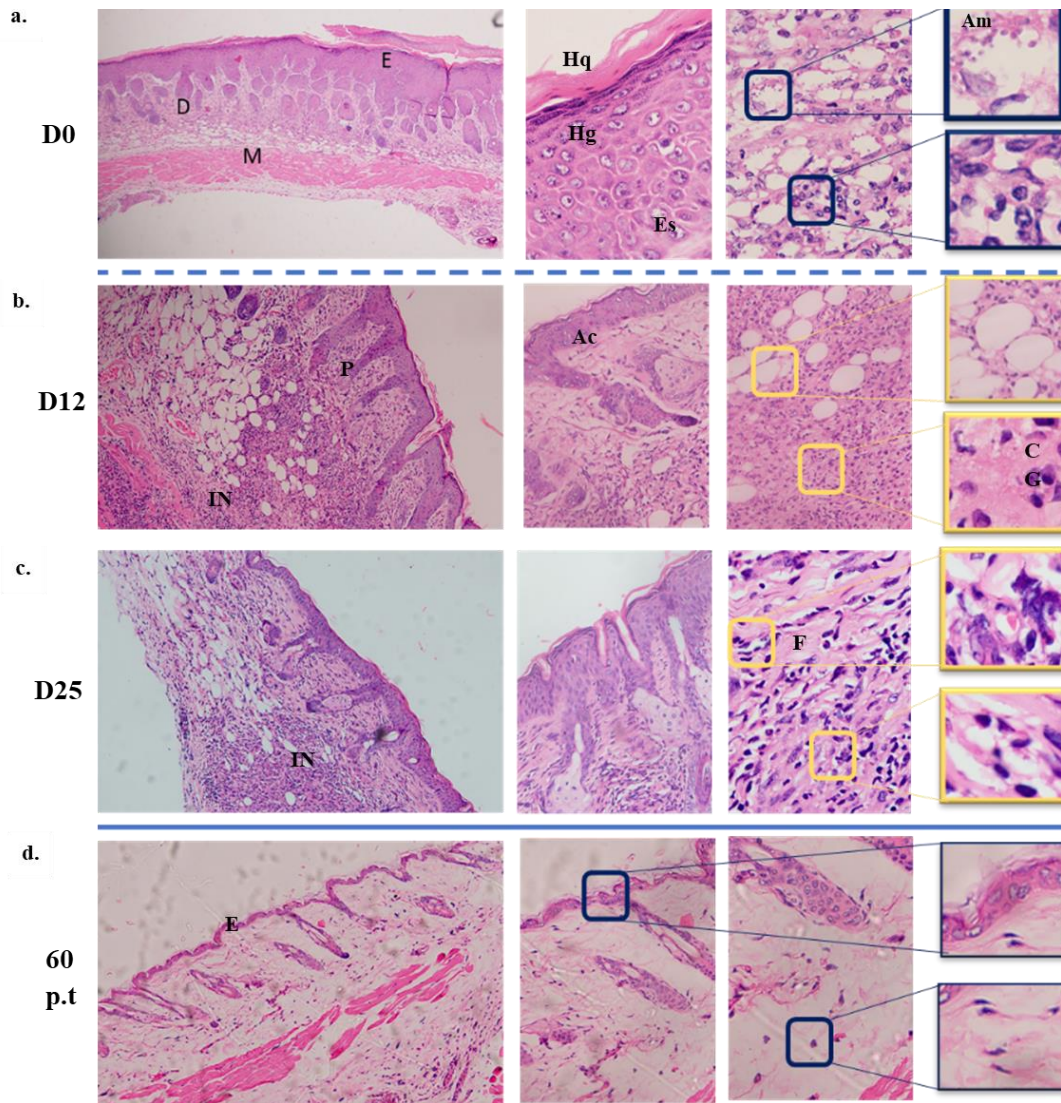
Nota: La tabla muestra la intensidad [(-): ausencia, +(1-15/campo): leve, ++(16-30/campo): moderado, +++(>30/campo): severo] de las variables encontradas en la epidermis y la dermis a los 0, 12, 25 dosis y 60 días pt. Observación en 50 campos microscópicos, aumentos de 1000x. QR: queratinocitos reactivos; IID: infiltrado inflamatorio difuso; PMN: polimorfonucleares.

Figura 33 Mapa de calor cambios histopatológicos



Nota: Cambios histopatológicos antes, durante, final y pt con fMTF (izquierda) y vehículo (derecha) en ratones infectados con *L. amazonensis*. El gradiente de color se obtuvo de la media del grado de intensidad (3+,2+,1+ y 0) de las características histopatológicas evaluadas cada grupo experimental.

Figura 34 Hallazgos histopatológicos en lesiones de LC producida por *L. amazonensis* y tratamiento con fMTF

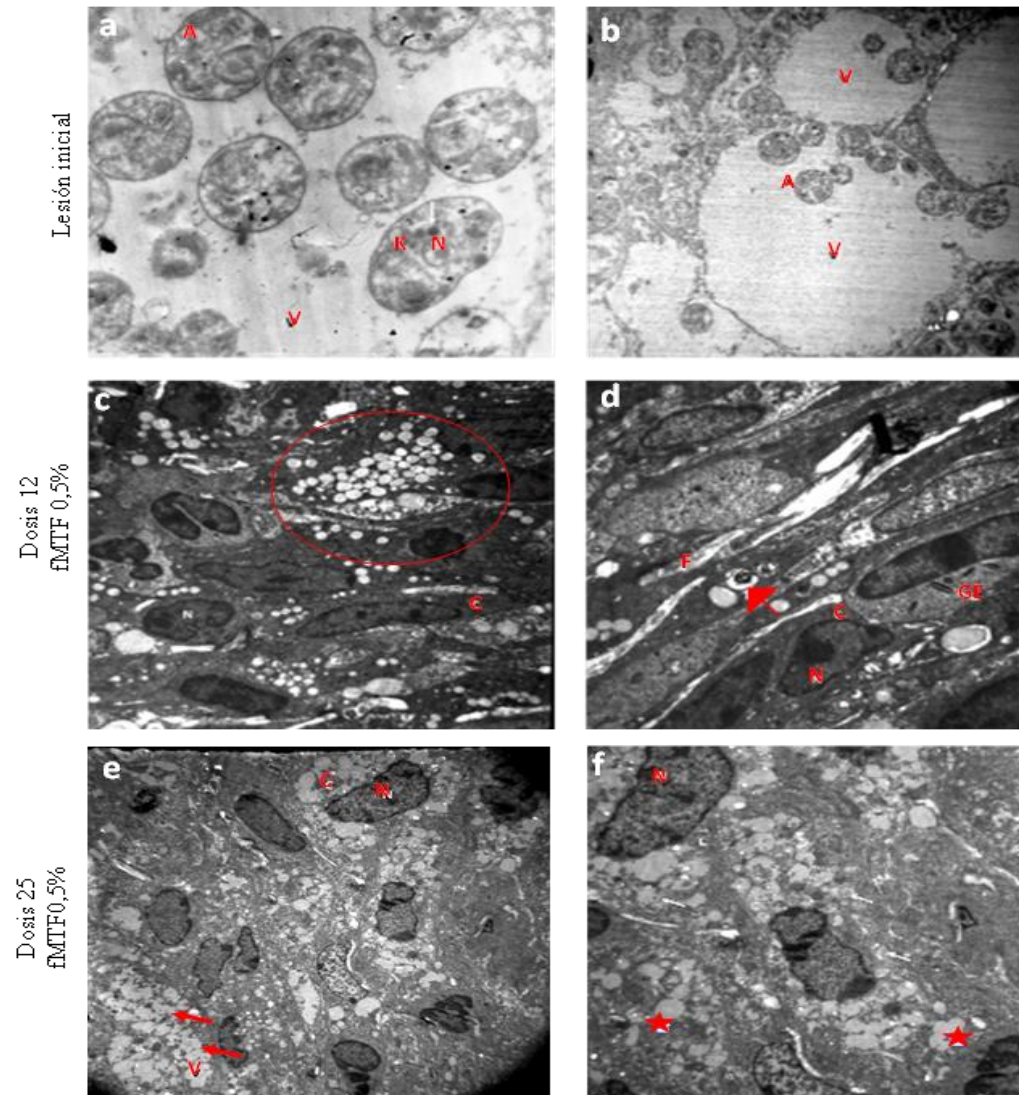


Nota: a. D0: Infección antes de iniciar el tratamiento b. D12: 12 dosis de tratamiento. c. 25 dosis (fin tratamiento). d. 60 días p.t. E: Epidermis, D: Dermis, M: musculo, Ac: Acanthosis, Es: espongirosis, Hp: hiperqueratosis, Hg: hipergranulosis, P:papilomatosis, Ms: mastocitos, CG: células gigantes, F: fibrosis, IN: infiltrado inflamatorio, Am: amastigotes. Imágenes representativas por grupo experimental. Aumentos columnas: 100x, 200x, 400x. recuadros 1000x.

3.3.3 *Análisis ultraestructural*

La evaluación de las alteraciones ultraestructurales en los tejidos fue realizada para determinar el efecto del tratamiento con fMTF 0,5% en las estructuras celulares del tejido (piel/lesión) del huésped y del parásito. En el tejido infectado (sin tratamiento) se observó gran cantidad de macrófagos con vacuolas parasitóforas de diferentes tamaños, con amastigotes, algunos libres y otros adosados a la membrana (**Figura 35**). Los amastigotes presentaron núcleos con distribución de cromatina normal, membranas celulares integra, cinetoplasto y membranas mitocondriales sin alteraciones evidentes (**Figura 35a-b**). En el tejido obtenido después de 12 dosis de fMTF, los macrófagos presentaron una gran cantidad de vacuolas en su citoplasma, la mayoría llenas de un material electrodense y otras con figuras de mielina. No se observaron amastigotes en las muestras evaluadas (**Figura 35c-d**). Al final del tratamiento (25 dosis), se observaron células con gran cantidad de vacuolas en su citoplasma, varias vacuolas con material electrodense muy particulado y material electrodense homogéneo en menor cantidad. No se identificaron amastigotes en la muestra (**Figura 35e-f**).

Figura 35 Alteraciones ultraestructurales de tejidos infectados con *L. amazonensis* tratados tópicamente con fMTF 0,5%.

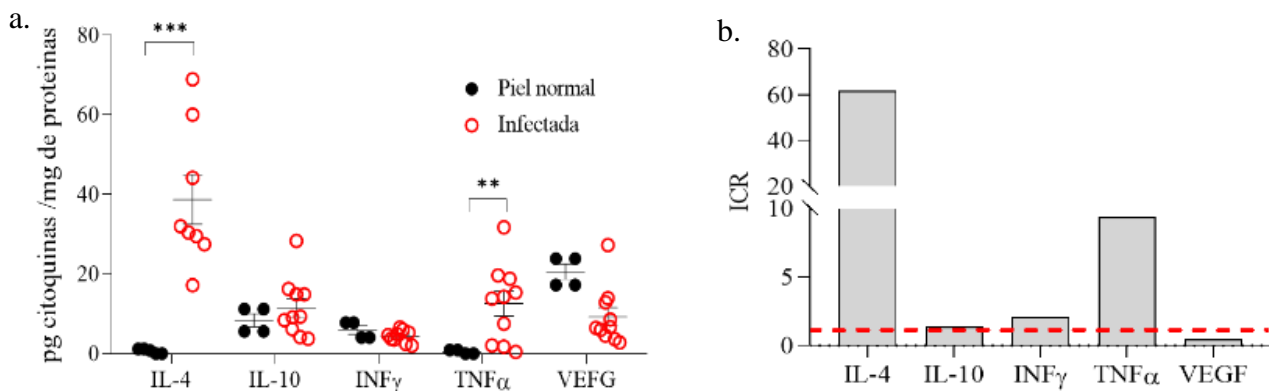


Nota: a-b. Control infección, sin tratamiento. 4400x y 3000x. c-d. Mitad de tratamiento, 12 Dosis 3000X y 7000X. e-f. Fin de tratamiento, 25 dosis 3000x y 7000x. A: amastigotes. C: citoplasma. V: vacuolas parasitóforas, N: núcleo, K: cinetoplasto. F: fibra de colágeno, GE: gránulo de eosinófilo. Estrella: vacuolas con material electrodenso homogéneo. Punta flecha: mielina. Flecha: vacuolas con material particulado. TEM: microscopia electrónica de transmisión.

3.3.4 Cuantificación de citoquinas en los tejidos

Después de 4 a 6 semanas de infección, las lesiones de LC presentaron un tamaño promedio de 40 mm². Los análisis de los lisados de estas lesiones revelaron concentraciones de IL-4, IFN γ , IL-10, TNF α y VEGF de $38,71 \pm 6,2$, $12,55 \pm 3,1$, $11,52 \pm 2,3$, $4,35 \pm 0,5$ y $9,28 \pm 2,3$ pg/mg de proteína, respectivamente. Por otro lado, en la piel no infectada (piel sana), los niveles de estas citoquinas fueron de $0,63 \pm 0,3$, $5,93 \pm 1,1$, $8,38 \pm 1,6$, $0,46 \pm 0,26$ y $20,56 \pm 1,9$ pg/mg de proteína, respectivamente (**Figura 36a**). Se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-4 y TNF α entre las lesiones de LC y la piel sana, siendo considerablemente más altos en las lesiones ($p < 0,001$) con índices de relación de concentraciones (ICR) de 61,4 y 9,5, respectivamente. Los niveles de IFN γ también fueron superiores en las lesiones, aunque en menor medida (ICR 2,1). Por su parte, IL-10 presentó niveles similares en ambas condiciones, con un ICR de 1,4. En contraste, el VEGF mostró una regulación negativa en las lesiones cutáneas, con un ICR de 0,45 (**Figura 36b**).

Figura 36 Regulación de citoquinas en lesiones de leishmaniasis cutánea (LC) causadas por *L. amazonensis* en ratones BALB/c.



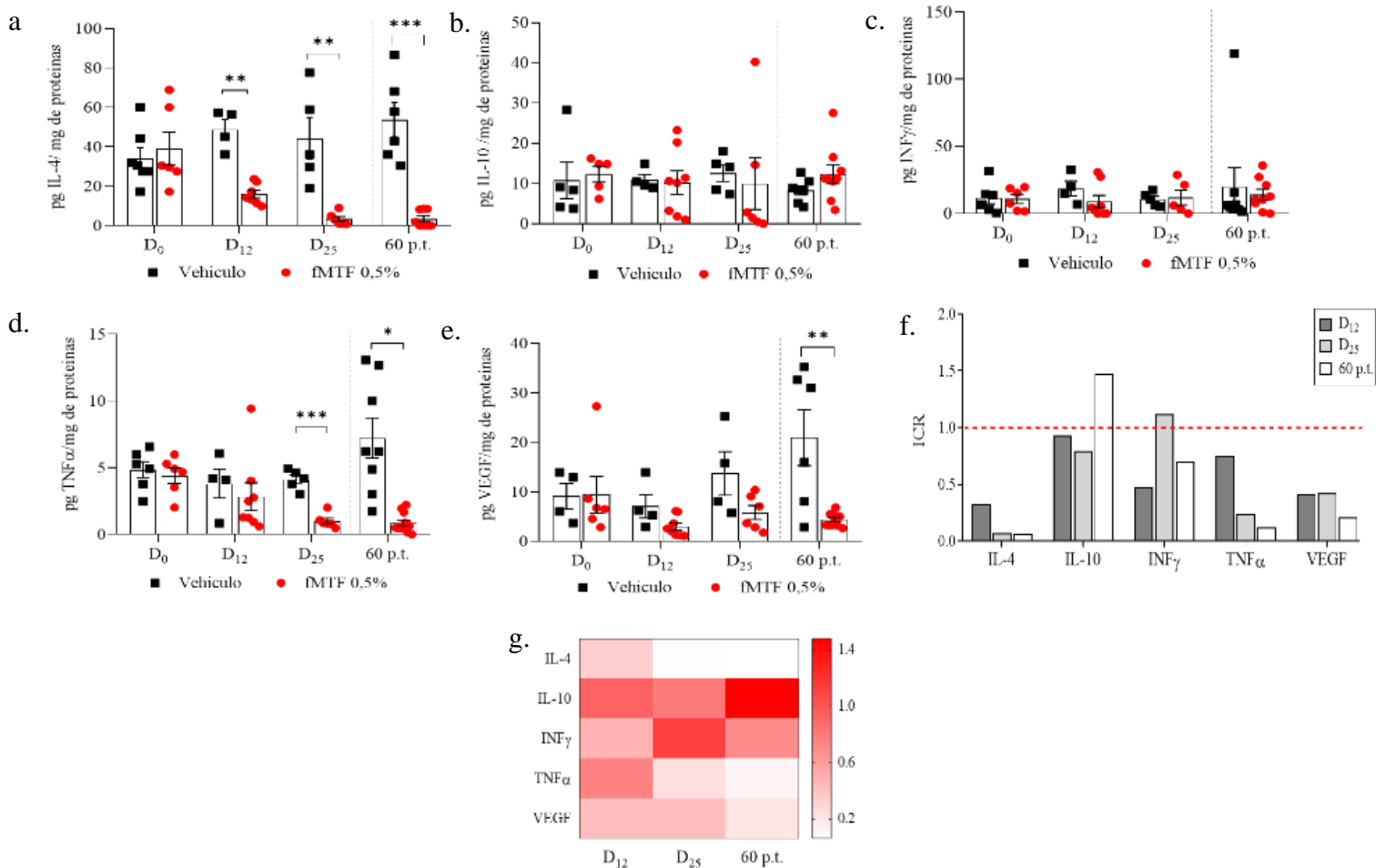
Nota: Concentración de citoquinas en piel no infectada e infectada (a). Índices de regulación de citoquinas (ICR). La línea punteada roja indica $IRC = 1$, es decir, cuando los niveles de citoquinas en la piel infectada y normal fueron iguales. (b). Los ICR se calcularon dividiendo los niveles de citoquinas en la lesión de LC por aquellos en la piel no infectada. Los datos se analizaron utilizando la prueba *t* no pareada para determinar diferencias significativas. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En cuanto al tratamiento con fMTF, los niveles de IL-4, TNF α y VEGF disminuyeron. Antes del tratamiento, en el día 0, los niveles de citoquinas en los tejidos de los grupos experimentales tratados con fMTF al 0,5% o vehículo fueron similares, con índices de relación de concentraciones (ICR) aproximados de 0,9 y 1,1. A los 12, 25 y 60 días p.t., los ICRs para IFN γ e IL-10 aumentaron y disminuyeron ligeramente, registrando valores de ICR de 0,48, 1,12 y 0,70 para IFN γ y de 0,93, 0,79 y 1,48 para IL-10, respectivamente, en los tiempos evaluados de 12, 25 y 60 días p.t. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IFN γ e IL-10 entre los grupos tratados con MTF y vehículo (**Figura 37 f,g**). En el grupo de MTF, los niveles de IFN γ fueron 8,94, 11,87 y 14,02 pg/mg de proteína, mientras que los niveles de IL-10 fueron 10,23, 9,94 y 12,29 pg/mg de proteína, respectivamente, en los diferentes tiempos evaluados. En el grupo de vehículo, los niveles de IFN α fueron 18,63, 10,61 y 20,02 pg/mg de proteína, mientras que los niveles de IL-10 fueron 10,97, 12,57 y 8,32 pg/mg de proteína (**Figura 37b,c**).

La situación respecto a la regulación tisular de IL-4, TNF α y VEGF a través del tratamiento con fMTF fue diferente. Los ICRs disminuyeron. Los valores de los ICRs fueron 0,41, 0,07 y 0,06 para IL-4; 0,75, 0,24 y 0,13 para TNF α ; y 0,42, 0,42 y 0,21 para VEGF, a los 12, 25 y 60 días p.t., respectivamente (**Figura 37f,g**). Se demostraron diferencias estadísticas para IL-4 y TNF α (a los

25 y 60 días p.t.) y para VEGF (al día 60 p.t.). Los niveles de citoquinas para el grupo de MTF versus el grupo de vehículo fueron de 15,95, 3,25 y 3,38 pg/mg de proteína frente a 48,69, 44,21 y 53,64 pg/mg de proteína para IL-4 (**Figura 37a**); de 2,84, 0,99 y 0,86 frente a 3,78, 4,10 y 7,20 pg/mg de proteína para TNF α (**Figura 37d**); y para VEGF, de 2,96, 5,78 y 4,37 frente a 7,08, 13,68 y 20,94 pg/mg de proteína (**Figura 37e**). Los resultados mostraron que los niveles de IL-4, TNF α y VEGF disminuyeron después del tratamiento con fMTF.

Figura 37 Monitoreo de citoquinas liberadas después del tratamiento tópico con fMTF al 0.5% y vehículo en diferentes intervalos de tiempo.



Nota: Las figuras muestran la liberación de IL-4 (a), IL-10 (b), INF_γ (c), TNF_α (d) y VEGF (e) Los días de tratamiento se separaron de los días p.t por la línea punteada gris. La media ± EE. de la concentración de citoquinas producida por ratones tratados con MTF al 0,5% (n = 6) y vehículo (n = 4). Las diferencias entre grupos se determinaron utilizando la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey. Diferencias significativas: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Los índices de regulación de citoquinas (IRC) inducidos por la MTF

en comparación con el vehículo. La línea punteada roja indica $IRC = 1$, es decir, cuando los niveles de citoquinas después de los tratamientos con MTF y vehículo fueron equivalentes (f). Un mapa de calor basado en los IRC (0 = blanco, disminución máxima: 1–1,5 = rojo, similar o mínima diferencia comparada con el vehículo), a los 12, 25 y 60 días p.t. (g).

3.4 Discusión

Con el fin de comprender el efecto *in situ* del tratamiento con fMTF aplicada directamente sobre las lesiones de LC, en diferentes tiempos de tratamiento y hasta dos meses pt, se evaluaron 4 efectos: en las lesiones, en la carga parasitaria, las características histopatológicas, ultraestructurales y el perfil de citoquinas.

El cierre de las heridas se evidenció desde la dosis D₁₂ disminuyendo la elevación del nódulo y cerrando la ulcera, el cual fue acelerando hasta el final del tratamiento, observando una lesión aplanada que en algunos casos la formación de cicatriz, el cual desapareció a los 60 días pt. Resultados similares fueron encontrados en el mismo modelo de *L. amazonensis* en donde un hidrogel de MTF 0,5% aplicado en 2 dosis/diarias por 21 días indujo el cierre de la herida y disminución de parásitos viables (99,8 % inhibición parasitaria) al final del tratamiento y cura estética y parasitológica al 100% 30 días pt (Peralta et al., 2022). En ratones infectados con *L. major*, el tratamiento con formulaciones liposomales conteniendo MTF a concentraciones de 0,5, 2 y 4 % aplicada tópicamente a 2 dosis diarias por 28 días, no lograron inhibir al 100% la carga parasitaria (evaluada por dilución límite) ni al final del tratamiento ni al final del tiempo de seguimiento, presentado valores de 5050 y 7750000, 105 y 100 y 519±265 y 51625±18314 parásitos/lesión respectivamente para cada concentración (Kavian et al., 2019). El efecto terapéutico de la fMTF después de suspender el tratamiento podría corresponder a la acumulación del fármaco y la larga vida media de eliminación de la MTF. En tratamientos orales de 100 mg de MTF durante 28 días, se han reportado una concentración máxima media de 70 µg/mL en adultos y 24 µg/mL en niños a los 23 días de tratamiento y una vida media de eliminación del fármaco entre los 150 y 200 h (aprox 7 días) (Dorlo et al., 2012).

En nuestro estudio, antes del tratamiento, las lesiones cutáneas presentaban alta intensidad en casi todos los parámetros histopatológicos estudiados tanto en la epidermis como en la dermis. Tras la aplicación tópica fMTF al 0,5%, se observó una disminución en la intensidad de casi todos los parámetros evaluados, a diferencia de los ratones tratados solo con el vehículo, donde no se notó reducción alguna. Los efectos destacados del tratamiento con MTF incluyeron un incremento sostenido en mastocitos, formación leve de granulomas, cura parasitológica incompleta y papilomatosis transitoria. En contraste, en los ratones tratados con el vehículo no se observaron estos efectos, lo que sugiere un impacto terapéutico específico de la MTF en las lesiones cutáneas estudiadas.

El papel de los mastocitos en la regulación o exacerbación de las infecciones por *Leishmania* ha sido objeto de estudio, destacando su ubicación tisular y la capacidad de liberar gránulos citoplasmáticos preexistentes, incluyendo enzimas, histamina, NO y TNF α , así como moléculas tipo Th1/Th2 tras la estimulación, lo que indica su papel clave tanto en las respuestas inmunes innatas como adaptativas contra la leishmaniasis (Rodríguez et al., 2014). El tratamiento con fMTF 0,5% condujo a una respuesta adecuada, con un incremento en el número de mastocitos y una formación leve de granulomas, mientras que el tratamiento con el vehículo no mostró aumentos en mastocitos ni en la formación de granulomas a los 12, 25 y 60 días p.t. en los dos ratones analizados, sugiriendo la necesidad de un mayor tamaño de muestra para detectar diferencias significativas entre los grupos tratados con el vehículo. Los mastocitos han sido implicados en la formación temprana de granulomas al liberar TNF α , que recluta y activa a los neutrófilos para liberar quimiocinas, facilitando el reclutamiento de macrófagos en los granulomas cutáneos en desarrollo (Von-Stebut et al., 2003). En ratones BALB/c susceptibles a la infección por *L. amazonensis*, así como en pacientes con LCDA causada por *L. amazonensis*, la infección

resulta en lesiones no cicatrizantes caracterizadas por una reacción inflamatoria difusa y altos conteos de parásitos. En contraste, la presencia de células epiteloides, células gigantes multinucleadas, células plasmáticas, linfocitos, mastocitos o granulomas bien formados se ha relacionado con el control de la enfermedad (Eid et al., 2014). Un estudio mostró que en más del 50% de los casos investigados de infecciones por *L. tropica* y *L. major* (LC del Viejo Mundo), los pacientes presentaron granulomas completamente formados e histiocitos epiteloides, llevando a la cicatrización dentro de 4,0 a 6,2 meses (Aebischer et al., 1993). Se demostraron también cambios en los patrones histopatológicos (de susceptible a parcialmente resistente) después de la vacunación con antígenos de promastigotes solubilizados de *L. amazonensis*. Ninguno de los ratones BALB/c vacunados mostró áreas extensas de macrófagos vacuolados y parasitados (como tejido adiposo); presentaron necrosis coagulativa pero no fibrinoide. Sin embargo, en contraste, se observó una reacción inflamatoria mixta focalizada de pequeños linfocitos, macrófagos, plasmocitos y eosinófilos con fibrosis difusa, formación de células gigantes y macrófagos parasitados dispersos en ratones vacunados. Además, se observó también una reacción granulomatosa con macrófagos, células epiteloides, células gigantes multinucleadas, necrosis fibrinoide focal desintegrando parásitos, y pocas células dentro de las áreas necróticas (Barral-Neto et al., 1987). La formación de granulomas transitorios, especialmente en casos de *L. amazonensis*, podría jugar un papel interesante en la efectividad anti-*Leishmania* de la MTF.

Inicialmente, las células infectadas con *Leishmania* presentan vacuolas parasitóforas de diversos tamaños conteniendo amastigotes bien preservados, adheridos a la membrana de la vacuola o libres, con características celulares intactas. No se detectaron parásitos fuera de las vacuolas. Tras 12 días de tratamiento con un fMTF al 0,5%, los macrófagos conservados mostraron múltiples vacuolas citoplasmáticas sin amastigotes y contenían material lipídico electron-denso o

restos parasitarios. Se observaron además fibroblastos, fibras de colágeno y eosinófilos. Al completar 25 dosis del tratamiento, se observaron numerosas vacuolas en el citoplasma de las células, algunas con material electron-denso particulado y otras con menor cantidad de material electron-denso homogéneo. No se detectaron amastigotes en estas muestras.

Al igual que nuestros hallazgos, se observaron macrófagos vacuolados sin parásitos después de la aplicación tópica de liposomas de AmB-MTF dos veces al día durante cuatro semanas en lesiones de LC en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* (Dar et al., 2020). Se estudiaron los cambios ultraestructurales en las lesiones cutáneas después del tratamiento oral con MTF (20 mg/kg por día durante 20 días) en ratones BALB/c infectados con *L. major* (Maha et al., 2012). En el día 0, se encontraron parásitos conservados fuera y dentro de las vacuolas. En el día 20 (final del tratamiento), los amastigotes mostraron signos de desintegración de la membrana plasmática, desaparición parcial de microtúbulos subpeliculares y la ausencia de una envoltura nuclear con una distribución anormal de heterocromatina. Adicionalmente, se observaron cavidades sin membrana, mientras que las mitocondrias del parásito se conservaron. La condensación de cromatina y del núcleo (picnosis), que podría estar relacionada tanto con la muerte celular apoptótica como necrótica, se observó en algunos macrófagos (Maha et al., 2012). Estudios in vitro en macrófagos infectados con *L. amazonensis* tratados con edelfosina, un alquil-lisofosfolípido, revelaron varios cambios en los parásitos, como vesículas citoplásmicas, hinchazón de las mitocondrias con una alteración en la organización de la membrana interna, parásitos multinucleados, vacuolas parasitóforas con intensa vesiculación de la membrana y restos de parásitos (Santa-Rita et al., 2006). Además, la MTF tuvo un impacto directo en la ultraestructura de *Angomonas deanei* (un protozoo tripanosomátido), incluyendo el desarrollo de ampollas y desprendimiento de la membrana plasmática, así como la hinchazón de las mitocondrias con

crestas agrandadas y vacuolización celular significativa (Freitas-Junior et al., 2012). El análisis ultraestructural de este trabajo utilizando monoterapia con MTF mostró el daño o fragmentación de las membranas celulares de los parásitos, posiblemente inducido por una mejor acción en la respuesta oxidativa del macrófago durante el tratamiento, y que, además de la apoptosis celular, indica que el crecimiento y desarrollo parasitario observado en la disminución de la carga parasitaria está inhibido.

En lesiones de LC causadas por *L. amazonensis*, se observó un cambio significativo en la regulación de citoquinas 4 a 6 semanas p.i. Se encontraron aumentos notables en los niveles de IL-4 y TNF α , y una disminución en VEGF comparado con piel no infectada, reflejando una respuesta inmunológica proinflamatoria intensificada y una regulación negativa en la angiogénesis dentro de las lesiones. En modelos experimentales similares, es decir, para la infección por *L. major*, los ratones BALB/c son susceptibles y producen altos niveles de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2), mientras que los ratones C57BL/6 son resistentes y producen altos niveles de IFN γ pero no de IL-4 ni IL-10 (respuesta Th2)(Sacks et al., 2002). Para la infección por *L. amazonensis*, como con otras especies de LC-NM, ambas cepas de ratones son susceptibles, y la dicotomía Th1/Th2 no siempre se observa. En un estudio sobre ratones C57BL/6, se encontró que las lesiones ulcerativas crónicas estaban vinculadas a altos niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias, como IL-12, TNF α e IFN γ , así como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) durante la fase tardía de la infección (Cardoso et al., 2020). En nuestra investigación, observamos un aumento en los niveles de TNF α (ICR 9,5), incremento de los niveles de IFN γ (ICR 2,1), ningún cambio en los niveles de IL-10 y, como en la infección por *L. major* en BALB/c susceptibles, un aumento en IL-4 (ICR 62,4).

En estudios con *L. major* y *L. amazonensis*, se ha observado que los ratones BALB/c y C57BL/6 muestran diferentes respuestas inmunológicas. Para *L. major*, los BALB/c son susceptibles con una respuesta Th2, caracterizada por altos niveles de IL-4 e IL-10, mientras que los C57BL/6 son resistentes y muestran una respuesta dominada por IFN γ , sin producción de IL-4 e IL-10. Sin embargo, con la infección por *L. amazonensis*, ambas cepas son susceptibles y la clara distinción entre las respuestas Th1 y Th2 no siempre es evidente. Nuestra investigación reveló un incremento en TNF α y IFN γ , sin cambios en IL-10 y un aumento en IL-4 en ratones C57BL/6 durante la fase tardía de infección por *L. amazonensis*, indicando una compleja interacción entre las respuestas Th1 y Th2.

La liberación de citoquinas en el tratamiento con MTF ha sido demostrada en varios estudios *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos, especialmente en leishmaniasis por *L. donovani* (Palic et al., 2019). En un paciente con PKDL, los transcritos de los genes IFN γ , IL-10 y TNF α estaban presentes en el tejido de la lesión antes del tratamiento (Ansari et al., 2008). Sin embargo, después del tratamiento con MTF, se observó un aumento significativo en los transcritos de IFN γ y una disminución en los de TNF α e IL-10. En otro estudio, después de cuatro meses de tratamiento con MTF a una dosis de 100 mg/día, pacientes con PKDL ($n = 12$) mostraron aumentos en TNF α y disminuciones en IL-10, con niveles de IL-4 permaneciendo aproximadamente iguales. Además, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes tratados con MTF mostraron niveles más altos de TNF α y más bajos de IL-10 que los pacientes no tratados (Mukhopadhyay et al., 2011). Otro estudio mostró que los niveles de IL-10 disminuyeron en el grupo tratado, correlacionándose con la desaparición de lesiones dérmicas y la ausencia de carga parasitaria (Sengupta et al., 2021). En un estudio *in vitro* usando células THP-1 infectadas con *L. donovani* o PBMC de pacientes con LV en diferentes momentos del tratamiento con MTF, el tratamiento con

MTF o la estimulación con antígeno de *Leishmania* mostró un aumento en citoquinas proinflamatorias (IL-12, TNF α e IFN γ), NO y una disminución en IL-10 y TGF β (Mukherjee et al., 2012). Nuestro trabajo presenta una visión diferente en comparación con estudios previos. Encontramos que los niveles de IFN γ e IL-10 fueron similares, mientras que los niveles de TNF α disminuyeron en lesiones de LC después del tratamiento con MTF. Estas diferencias podrían atribuirse a varios factores, incluyendo las manifestaciones clínicas específicas bajo investigación (LV, PKDL vs. LC), los tipos de muestras utilizadas y los métodos empleados para cuantificar los niveles de citoquinas. Hay estudios limitados respecto al impacto de la MTF en la inmunomodulación de LC-NM en humanos. En un ensayo clínico con pacientes infectados por *L. braziliensis*, se recolectaron PBMC antes y durante el tratamiento con MTF oral. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IFN γ , TNF α e IL-10 antes o durante el tratamiento (Peixoto et al., 2020). En un estudio con hámster infectados por *L. infantum*, esplenocitos estimulados por antígenos y obtenidos 15 días después de un tratamiento oral de 28 días con MTF resultaron en un aumento en el número total de esplenocitos T-CD4 que produjeron IFN γ y TNF α . Sin embargo, hubo una disminución en el número total de esplenocitos que produjeron IL-10 (Carvalho et al., 2022). En cuanto a la regulación a la baja de VEGF, el remodelado vascular visto en lesiones podría explicar asociaciones entre VEGF y CL. Este remodelado generalmente ocurre dentro de un microambiente hipóxico e inflamatorio. Ciertas especies de *Leishmania*, incluidas *L. major*, *L. amazonensis* y *L. donovani*, han sido vinculadas a la activación directa del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) dentro de la piel. Esta activación indujo citoquinas y la liberación de factores de crecimiento como VEGF por macrófagos (Weinkopff et al., 2022). En nuestro estudio, el tratamiento con MTF resultó en una disminución tanto de VEGF como de infiltrado inflamatorio en el tejido. La disminución en los niveles de VEGF observada después del

tratamiento con MTF contrasta con el aumento continuo en los niveles de VEGF observado después del tratamiento con vehículo.

3.5 Conclusiones

Este capítulo se realizó un monitoreo sobre las lesiones de LC causadas por *L. amazonensis* tratadas con fMTF al 0,5%. Los resultados obtenidos muestran una reducción significativa tanto en el tamaño de las lesiones como en la carga parasitaria tras el tratamiento con fMTF. Además, el tratamiento con fMTF no solo mostró un impacto notable en la cura estética, sino también en a nivel tisular. Histopatológicamente, se reportaron mejoras significativas en la epidermis y dermis, con una disminución de acantosis, espongirosis, hiperqueratosis. Además, se observó formación de granulomas, y aumento en mastocitos. La presencia inicial de papilomatosis y la posterior reducción de esta indican también una respuesta inflamatoria reversible inducida por el tratamiento. Estos cambios sugieren que fMTF no solo actúa en la reducción de la carga parasitaria, sino que también modula favorablemente la respuesta inmune local, facilitando la resolución de la inflamación y la cicatrización de las lesiones.

Desde una perspectiva ultraestructural, el tratamiento con fMTF llevó a una notable reducción de la viabilidad de los amastigotes dentro de los macrófagos, con cambios degenerativos en las estructuras de los parásitos, lo cual corrobora la eficacia antiparasitaria de la MTF. Además, se observaron ajustes en las estructuras celulares del tejido del huésped que apoyan un proceso de curación tisular.

En cuanto a la regulación de citoquinas, el tratamiento con fMTF indujo una modulación en los perfiles de citoquinas, destacando una disminución en los niveles de IL-4, TNF- α y VEGF contribuyendo posiblemente a la mitigación de la inflamación y la inducción a un entorno para la

curación y regeneración del tejido. Estos resultados resaltan la capacidad de la MTF no solo como un fármaco anti-*Leishmania* sino también como modulador inmune, ofreciendo una doble vía terapéutica en el manejo de la LC.

Por tanto, estos hallazgos proporcionan una base sólida para el uso de MTF al 0,5% como una opción de tratamiento eficaz y segura para la LC, destacando su capacidad para inducir la curación de las lesiones y la reducción de la carga parasitaria con efectos inmunomoduladores beneficiosos. Estos resultados también sugieren la necesidad de futuros estudios a largo plazo y en diferentes formulaciones para optimizar aún más su eficacia y comprender los mecanismos subyacentes de su acción terapéutica.

Referencias

Abdeladhim, M., Ben Ahmed, M., Marzouki, S., Belhadj Hmida, N., Boussoffara, T., Belhaj Hamida, N., Ben Salah, A., & Louzir, H. (2011). Human cellular immune response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* is mediated by IL-10-producing CD8⁺ T cells and Th1-polarized CD4⁺ lymphocytes. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(10), e1345. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001345>

Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. S., Cupolilo, S. M., Cardoso, F. O., Souza, C. S., & Gonçalves da Costa, S. C. (2004). Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Veterinary Parasitology*, 121(3-4), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.002>

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>

Andrade, B. B., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2007). Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01964.x>

Ansari, N. A., Ramesh, V., & Salotra, P. (2008). Immune response following miltefosine therapy in a patient with post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2, 1160–1162.

Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, *5*, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>

Atta, A. M., D'Oliveira, A., Correa, J., Atta, M. L. B., Almeida, R. P., & Carvalho, E. M. (1998). Anti-leishmanial IgE antibodies: A marker of active disease in visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *59*(3), 426–430. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.426>

Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., De Jesus, A. R., Dutra, W. O., Gollob, K. J., & Carvalho, E. M. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, *70*(12), 6734–6740. <https://doi.org/10.1128/iai.70.12.6734-6740.2002>

Bäumer, W., Wlaź, P., Jennings, G., & Rundfeldt, C. (2010). The putative lipid raft modulator miltefosine displays immunomodulatory action in T-cell dependent dermal inflammation models. *European Journal of Pharmacology*, *628*(1–3), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.018>

Benaim, G., & Paniz-Mondolfi, A. (2024). Unmasking the mechanism behind miltefosine: Revealing the disruption of intracellular Ca²⁺ homeostasis as a rational therapeutic target in leishmaniasis and Chagas disease. *Biomolecules*, *14*(4), 406. <https://doi.org/10.3390/biom14040406>

Bhutto, A. M., Okada, S., Nonaka, S., Gomez, E. A., & Hashiguchi, Y. (1992). Ultrastructural studies on cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 20(1), 11–21.

Botelho, A. C. C., Tafuri, W. L., Genaro, O., & Mayrink, W. (1998). Histopathology of human American cutaneous leishmaniasis before and after treatment. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(1), 11–18. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821998000100002>

Britta, E. A., Scariot, D. B., Falzirolli, H., Ueda-Nakamura, T., Silva, C. C., Filho, B. P. D., Borsali, R., & Nakamura, C. V. (2014). Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0236-0>

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *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)

Cardoso, F. O., Zaverucha-do-Valle, T., Almeida-Souza, F., & Abreu-Silva, A. L. (2020). Modulation of cytokines and extracellular matrix proteins expression by *Leishmania amazonensis* in susceptible and resistant mice. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01986>

Cardozo, R. S., García-Montero, P. P., Chicharro, C., & Tardío, J. C. (2020). Cutaneous leishmaniasis: A pathological study of 360 cases with special emphasis on the contribution of immunohistochemistry and polymerase chain reaction to diagnosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, 47(11), 1018–1025. <https://doi.org/10.1111/cup.13785>

Carlsen, E. D., Jie, Z., Liang, Y., Henard, C. A., Hay, C., Sun, J., de Matos Guedes, H., & Soong, L. (2015). Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. *Journal of innate immunity*, 7(4), 354–363. <https://doi.org/10.1159/000373923>

Carvalho, E. M., Barral, A., Costa, J. M. L., Bittencourt, A., & Marsden, P. (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 56(4), 315–325. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90103-1)

Carvalho, L. M., Gusmão, M. R., Costa, A. F., de Brito, R. C., Aguiar-Soares, R. D., Cardoso, J. M., Reis, A. B., Carneiro, C. M., & Roatt, B. M. (2022). Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: Combinatorial action of miltefosine plus LBSapMPL vaccine improves adaptive Th1 immune response with control of splenic parasitism in experimental hamster model. *Parasitology*, 149(3), 371–379. <https://doi.org/10.1017/S0031182021002352>

Castellano, L. R., Filho, D. C., Argiro, L., Dessen, H., Prata, A., Dessen, A., & Rodrigues, V. (2009). Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Human Immunology*, 70(6), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.007>

Castro Jalca, J., Marcillo Carvajal, C. P., & Moran Celleri, J. A. (2017). Leishmaniasis, infección compleja en las Américas. *RECIMUNDO: Revista Científica de la Investigación y El Conocimiento*, 1(5), 715–732. <https://doi.org/10.26820/recimundo/1.5.2017.715-732>

Castro, R., Scott, K., Jordan, T., Evans, B., Craig, J., Peters, E. L., & Swier, K. (2006). The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *The Journal of Parasitology*, 92(6), 1162–1170. <https://doi.org/10.1645/GE-841R.1>

Charret, K. S., Lagrota-Cândido, J., Carvalho-Pinto, C. E., Hottz, C. F., Lira, M. L. F., Rodrigues, R. F., Gomes, A. O., Bernardino, A. M., Canto-Cavalheiro, M. M., Leon, L. L., & Amaral, V. F. (2013). The histopathological and immunological pattern of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives. *Experimental Parasitology*, 133(2), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.022>

Chatelain, R., Varkila, K., & Coffman, R. L. (1992). IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *Journal of Immunology*, 148(4), 1182–1187. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.148.4.1182>

Colpitts, S. L., Dalton, N. M., & Scott, P. (2009). IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62Lhigh central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), 5702–5711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803450>

Corrêa, J. R., Brazil, R. P., & Soares, M. J. (2007). *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira et al. 1987): Ultrastructural aspects of the parasite and skin lesion in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology Research*, 100(6), 1227–1232. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0395-5>

Costa-Da-Silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-De-Lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-De-Lima, C. G.

(2022). Immune responses in leishmaniasis: An overview. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(4), 54. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>

Cupolilo, S. M. N., Souza, C. S. F., Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. S., & Gonçalves da Costa, S. C. (2003). Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histology and Histopathology*, 18(4), 1059–1065. <https://doi.org/10.14670/HH-18.1059>

de Aquino Marinho, F., da Silva Gonçalves, K. C., de Oliveira, S. S., de Siqueira Couto de Oliveira, A. C., Bellio, M., D'Avila-Levy, C. M., dos Santos, A. L. S., & Branquinha, M. H. (2011). Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 507–509. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400021>

De Freitas-Junior, P. R., Catta-Preta, C. M., Andrade, I. D. S., Cavalcanti, D. P., De Souza, W., Einicker-Lamas, M., & Motta, M. C. M. (2012). Effects of miltefosine on the proliferation, ultrastructure, and phospholipid composition of *Angomonas deanei*, a trypanosomatid protozoan that harbors a symbiotic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 333(2), 129–137. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02607.x>

de Mello, T. F. P., Cardoso, B. M., Bitencourt, H. R., Donatti, L., Aristides, S. M. A., Lonardoní, M. V. C., & Silveira, T. G. V. (2016). Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones. *Experimental Parasitology*, 160, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.11.005>

De Moura, T. R., Novais, F. O., Oliveira, F., Clarêncio, J., Noronha, A., Barral, A., Brodskyn, C., & De Oliveira, C. I. (2005). Toward a novel experimental model of infection to

study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 73(9), 5827–5834. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005>

de Souza Carmo, E. V., Katz, S., & Barbiéri, C. L. (2010). Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS one*, 5(11), e13815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013815>

De Souza, W., & Cavalcanti, D. P. (2008). DNA-containing organelles in pathogenic protozoa: A review. *Trends in Cell and Molecular Biology*, 2, 89–104.

De Souza, W., Martinez-Palomo, A., & Gonzales-Robbles, A. (1978). The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: Cytochemistry and freeze-fracture. *Journal of Cell Science*, 33, 285–299.

Deschacht, M., Van Assche, T., Hendrickx, S., Bult, H., Maes, L., & Cos, P. (2012). Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. *Parasitology*, 139(11), 1429–1437. <https://doi.org/10.1017/S003118201200073X>

Dölle, S., Hoser, D., Rasche, C., Loddenkemper, C., Maurer, M., Zuberbier, T., & Worm, M. (2010). Long-term reduction in local inflammation by a lipid raft molecule in atopic dermatitis. *Allergy*, 65(9), 1158–1165. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02341.x>

Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>

Ehrchen, J. M., Roebrock, K., Foell, D., Nippe, N., von Stebut, E., Weiss, J. M., Münck, N. A., Viemann, D., Varga, G., Müller-Tidow, C., Schuberth, H. J., Roth, J., & Sunderkötter, C. (2010). Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS pathogens*, 6(4), e1000871. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000871>

Eid, R. A., Taha, M., & El-Amir, Y. O. (2014). Histopathological and ultrastructural studies on human cutaneous leishmaniasis. *Comparative Clinical Pathology*, 23(5), 1373–1380. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1793-6>

Gomes-Silva, A., De Cássia Bittar, R., Dos Santos Nogueira, R., Amato, V. S., Da Silva Mattos, M., Oliveira-Neto, M. P., Coutinho, S. G., & Da-Cruz, A. M. (2007). Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and Experimental Immunology*, 149(3), 440–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03436.x>

Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., & Mosser, D. M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), 1253–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20101751>

González, K., Diaz, R., Ferreira, A. F., García, V., Paz, H., Calzada, J. E., Ruíz, M., Laurenti, M., & Saldaña, A. (2018). Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by *Leishmania Viannia panamensis* in Panama. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60, e8. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860008>

Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., & Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(1), 59–72. <https://doi.org/10.1084/jem.169.1.59>

Holzmuller, P., Bras-Gonçalves, R., & Lemesre, J. L. (2006). Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets, and putative role of nitric oxide-mediated programmed

cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, 132(Suppl 1), S1–S18.
<https://doi.org/10.1017/S0031182006000837>

Ji, J., Sun, J., Qi, H., & Soong, L. (2002). Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 338–345. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2002.66.338>

Johnston, D. A., Blaxter, M. L., & Degraeve, W. M. (1999). Genomics and the biology of parasites. *BioEssays*, 21(2), 131–147.

Katakura, K., Saito, S., Hamada, A., Matsuda, H., & Watanabe, N. (1993). Cutaneous leishmaniasis in mast cell-deficient W/W^v mice. *Infection and Immunity*, 61(5), 2242–2244.
<https://doi.org/10.1128/IAI.61.5.2242-2244.1993>

Kavian, Z., Alavizadeh, S. H., Golmohammadzadeh, S., Badiie, A., Khamesipour, A., & Jaafari, M. R. (2019). Development of topical liposomes containing miltefosine for the treatment of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Acta Tropica*, 196, 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.018>

Khoury, R., Novais, F., Santana, G., de Oliveira, C. I., dos Santos, M. A. V., Barral, A., Barral-Netto, M., & Van Weyenbergh, J. (2010). DETC induces *Leishmania* parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *PLOS ONE*, 5(12), e14394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014394>

Kip, A. E., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Dorlo, T. P. C. (2017). Clinical pharmacokinetics of systemically administered antileishmanial drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(2), 151–176. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0570-0>

Knuplez, E., Kienzl, M., Trakaki, A., Schicho, R., Heinemann, A., Sturm, E. M., & Marsche, G. (2021). The anti-parasitic drug miltefosine suppresses activation of human

eosinophils and ameliorates allergic inflammation in mice. *British Journal of Pharmacology*, 178(5), 1234–1245. <https://doi.org/10.1111/bph.15368>

Kumar, R., Bumb, R. A., & Salotra, P. (2010). Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors. *Immunology*, 130(2), 193–201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03223.x>

Laouar, Y., Sutterwala, F. S., Gorelik, L., & Flavell, R. A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nature immunology*, 6(6), 600–607. <https://doi.org/10.1038/ni1197>

Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. *Trends in microbiology*, 11(5), 210–214. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00075-1)

Li, H., Jiang, T., Li, M. Q., Zheng, X. L., & Zhao, G. J. (2018). Transcriptional Regulation of Macrophages Polarization by MicroRNAs. *Frontiers in immunology*, 9, 1175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01175>

Luque-Ortega, J. R., & Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1327–1332. <https://doi.org/10.1128/AAC.01415-06>

Magerl, M., Rother, M., Bieber, T., Biedermann, T., Brasch, J., Dominicus, R., Hunzelmann, N., Jakob, T., Mahler, V., Popp, G., Schäkel, K., Schlingensiepen, R., Schmitt, J., Siebenhaar, F., Simon, J. C., Staubach, P., Wedi, B., Weidner, C., & Maurer, M. (2013). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy of miltefosine in antihistamine-resistant chronic spontaneous urticaria. *Journal of the European Academy of*

Dermatology and Venereology, 27(3), e363–e369. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04689.x>

Maha, M. E., Amer, E. I., Mossallam, S. F., Gomaa, M. M., & Baddour, N. M. (2012). Miltefosine for Old World cutaneous leishmaniasis: An experimental study on *Leishmania major*-infected mice. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(3), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2012.04.003>

Malta De Sá, M., Sresht, V., Rangel-Yagui, C. O., & Blankschtein, D. (2015). Understanding miltefosine-membrane interactions using molecular dynamics simulations. *Langmuir*, 31(15), 4503–4512. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00178>

Martinez-Palomo, A., De Souza, W., & Gonzales-Robles, A. J. (1976). Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembranous particles. *Journal of Cell Biology*, 69(3), 507–513.

Maurer, M., Magerl, M., Metz, M., Weller, K., & Siebenhaar, F. (2012). Miltefosine: A novel treatment option for mast cell-mediated diseases. *Journal of Dermatological Treatment*, 24(4), 244–249. <https://doi.org/10.3109/09546634.2012.671909>

Mazzoni, A., Young, H. A., Spitzer, J. H., Visintin, A., & Segal, D. M. (2001). Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(12), 1865–1873. <https://doi.org/10.1172/JCI13930>

McMahon-Pratt, D., & Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunological Reviews*, 201(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00190.x>

Mendonça, M. G., De Brito, A. E. F., Rodrigues, E. H. G., Bandeira, V., Jardim, M. L., & Abath, F. G. C. (2004). Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American

cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure? *Journal of Infectious Diseases*, 189(6), 1018–1023.
<https://doi.org/10.1086/382135>

Messlinger, H., Sebald, H., Heger, L., Dudziak, D., Bogdan, C., & Schleicher, U. (2018). Monocyte-Derived Signals Activate Human Natural Killer Cells in Response to *Leishmania* Parasites. *Frontiers in Immunology*, 9, 24.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00024>

MINSALUD. (2023). *Lineamientos de atención clínica integral para Leishmaniasis en Colombia*.

Miró, E. M., & Sánchez, N. P. (2000). Cutaneous manifestations of infectious diseases. *Atlas of Dermatology in Internal Medicine*, 40(13), 77. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0688-4_7

Morgado, F. N., Schubach, A., Vasconcellos, E., Azeredo-Coutinho, R. B., Valet-Rosalino, C. M., Quintella, L. P., Santos, G., Salgueiro, M., Palmeiro, M. R., & Conceição-Silva, F. (2010). Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 32(4), 285–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01188.x>

Mukherjee, A. K., Gupta, G., Adhikari, A., Majumder, S., Kar, S., Bhattacharyya, M. S., & Majumdar, S. (2012). Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. *International Immunopharmacology*, 12(4), 565–572.

Mukhopadhyay, D., Das, N. K., Roy, S., Kundu, S., Barbhuiya, J. N., & Chatterjee, M. (2011). Miltefosine effectively modulates the cytokine milieu in Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 204(9), 1427–1436.

Naqvi, N., Ahuja, K., Selvapandiyan, A., Dey, R., Nakhasi, H., & Puri, N. (2017). Role of mast cells in clearance of *Leishmania* through extracellular trap formation. *Scientific Reports*, 7(1), 13240. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12753-1>

Nateghi Rostami, M., Seyyedani Jasbi, E., Khamesipour, A., & Mohammadi, A. M. (2016). Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and its soluble receptor type 1 (sTNFR I) in human active and healed leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 38(4), 255–260. <https://doi.org/10.1111/pim.12305>

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1634–1641. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz049>

Neira, L. F., Peña, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de leishmania *Viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 51(1), 33–42. <https://doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019004>

Norsworthy, N. B., Sun, J., Elnaiem, D., Lanzaro, G., & Soong, L. (2004). Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and immunity*, 72(3), 1240–1247. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1240-1247.2004>

PAHO. (2021). Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas, No. 10. Diciembre 2021 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. PAHO. <https://www.paho.org/es/documentos/leishmaniasis-informe-epidemiologico-americas-no-10-diciembre-2021>

Palić, S., Bhairosing, P., Beijnen, J. H., & Dorlo, T. P. C. (2019). Systematic review of host-mediated activity of miltefosine in leishmaniasis through immunomodulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(7), e02507-18. <https://doi.org/10.1128/aac.02507-18>

Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). La miltefosina induce muerte similar a la apoptosis en promastigotes de *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(3), 852–859. <https://doi.org/10.1128/aac.48.3.852-859.2004>

Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., & Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders?. *Journal of immunology research*, *2018*, 8917804. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>

Passero, L. F. D., Sacomori, J. V., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Da Silveira, F. T., & Laurenti, M. D. (2009). Ex vivo and in vivo biological behavior of *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitology Research*, *105*(6), 1741–1747. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1614-7>

Peixoto, F., Nascimento, M. T., Costa, R., Silva, J., Renard, G., Guimarães, L. H., Penna, G., Barral-Netto, M., Carvalho, L. P., Machado, P. R. L., & Carvalho, E. M. (2020). Evaluation of the ability of miltefosine associated with topical GM-CSF in modulating the immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology Research*, *2020*, 2789859. <https://doi.org/10.1155/2020/2789859>

Peralta, M. F., Usseglio, N. A., Bracamonte, M. E., Guzmán, M. L., Olivera, M. E., Marco, J. D., Barroso, P. A., & Carrer, D. C. (2022). Efficacy of topical miltefosine formulations in an experimental model of cutaneous leishmaniasis. *Drug Delivery and Translational Research*, *12*(1), 180–196. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00896-8>

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 Ca²⁺ Channel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4), e01614-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01614-17>

Ridley, D. S. (1980). A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4), 515–521. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(80\)90069-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(80)90069-3)

Ritter, U., Lechner, A., Scharl, K., Kiafard, Z., Zwirner, J., & Körner, H. (2008). TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/s00430-007-0056-z>

Rodriguez, G., Arenas, C., Ovalle, C., Hernandez, C., & Camargo, C. (2016). *Las leishmaniasis atlas y texto*.

Rojas, J. I., Tani, E., Orn, A., Sánchez, C., & Goto, H. (1993). *Leishmania (Viannia) panamensis*-induced cutaneous leishmaniasis in Balb/c mice: Pathology. *International Journal of Experimental Pathology*, 74(5), 481–491.

Romão, P. R. T., Da Costa Santiago, H., Ramos, C. D. L., De Oliveira, C. F. E., Monteiro, M. C., De Queiroz Cunha, F., & Vieira, L. Q. (2009). Mast cell degranulation contributes to susceptibility to *Leishmania major*. *Parasite Immunology*, 31(3), 140–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01084.x>

Rubíková, Z., Sulimenko, V., Paulenda, T., & Dráber, P. (2018). Mast cell activation and microtubule organization are modulated by miltefosine through protein kinase C inhibition. *Frontiers in Immunology*, 9, 1563. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01563>

Rudzinska, M. A., D'Alessandro, P. A., & Trager, W. (1964). The fine structure of *Leishmania donovani* and the role of the kinetoplast in the leishmanial-leptomonad transformation. *The Journal of Protozoology*, *11*(2), 166–191. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1964.tb01739.x>

Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J., & Verheij, M. (2003). Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anti-Cancer Drugs*, *14*(2), 167–173. <https://doi.org/10.1097/00001813-200302000-00011>

Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, *2*(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>

Saha, B., Tonkal, A. M. D. J., Croft, S., & Roy, S. (2004). Mast cells at the host-pathogen interface: Host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, *137*(1), 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02505.x>

Samant, M., Sahu, U., Pandey, S. C., & Khare, P. (2021). Role of cytokines in experimental and human visceral leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 624009. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.624009>

Sampaio, R. N. R., Ferreira, M. F., Martins, S. S., & Motta, J. de O. C. da. (2021). Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *96*(5), 602–604. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.03.003>

Saravia, N. G., Weigle, K., Navas, C., Segura, I., Valderrama, L., Valencia, A. Z., Escorcia, B., & McMahon-Pratt, D. (2002). Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of

serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(6), 738–744. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.738>

Satoskar, A., Bluethmann, H., & Alexander, J. (1995). Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infection and Immunity*, 63(12), 4894–4899. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4894-4899.1995>

Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E., & Sher, A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis: T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(5), 1675–1684. <https://doi.org/10.1084/jem.168.5.1675>

Sengupta, S., & Chatterjee, M. (2021). IgG3 and IL-10 are effective biomarkers for monitoring therapeutic effectiveness in post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(7), e0009906. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009906>

Shapiro, T. A., & Englund, P. T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 117–143. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001001>

Silveira, F. T., Lainson, R., & Corbett, C. (2005). Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5), 525–534. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000500013>

Simpson, L. (1972). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *International Review of Cytology*, 32, 139–207. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60294-5](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60294-5)

Sousa-Atta, M. L. B., Salamé, G. S., D'Oliveira, A., Almeida, R. P., Atta, A. M., & Carvalho, E. M. (2002). Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(1), 101–104. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.1.101-104.2002>

Suarez, E. T., Granados-Falla, D. S., Robledo, S. M., Murillo, J., Upegui, Y., & Delgado, G. (2020). Antileishmanial activity of synthetic analogs of the naturally occurring quinolone alkaloid N-methyl-8-methoxyflindersin. *PLoS ONE*, 15(12), e0243392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243392>

Sundharkrishnan, L., & North, J. P. (2017). Histopathologic features of cutaneous leishmaniasis and use of CD1a staining for amastigotes in Old World and New World leishmaniasis. *Journal of Cutaneous Pathology*, 44(12), 1005–1011. <https://doi.org/10.1111/cup.13032>

Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B. T. D. S., Assolini, J. P., Gonçalves, M. D., Carloto, A. C. M., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2018). Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers in immunology*, 9, 2529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>

Tripathi, P., Singh, V., & Naik, S. (2007). Immune response to *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(2), 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2007.00311.x>

Urbina, J. A. (2006). Mecanismos de acción de los análogos de lisofosfolípidos contra parásitos tripanosomátidos. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.07.017>

Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., & Croft, S. L. (2016). Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(7), 862–872. <https://doi.org/10.1111/jphp.12548>

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(11), 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>

Viana, A. G., Mayrink, W., de Carvalho Fraga, C. A., Silva, L. M., Batista Domingos, P. L., Ferreti Bonan, P. R., de Paula, A. M. B., & de Carvalho Botelho, A. C. (2013). Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(1), 32–38. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962013000100003>

Vincent, I. M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T. K., & Ouellette, M. (2013). Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.11.002>

von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (1998). Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *The Journal of experimental medicine*, 188(8), 1547–1552. <https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1547>

Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S., & Saha, B. (2009). Miltefosine promotes IFN- γ -dominated anti-leishmanial immune response. *The Journal of Immunology*, 182(11), 7146–7154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803859>

Ware, J. A. 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>

Webster, P., & Russel, D. G. (1993). The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitology Today*, 9(6), 201–206. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90008-y](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90008-y)

Weingärtner, A., Drobot, B., Herrmann, A., & others. (2010). Disruption of the lipid-transporting LdMT-LdRos3 complex in *Leishmania donovani* affects membrane lipid asymmetry but not host cell invasion. *PLoS ONE*, 5(7), e12443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012443>

Weinkopff, T., Roys, H., Bowlin, A., & Scott, P. (2019). *Leishmania* infection induces macrophage vascular endothelial growth factor A production in an ARNT/HIF-dependent manner. *Infection and Immunity*, 87(11), e00088-19. <https://doi.org/10.1128/iai.00088-19>

Weller, K., Artuc, M., Jennings, G., Friedrichson, T., Guhl, S., Dos Santos, R. V., Sünder, C., Zuberbier, T., & Maurer, M. (2009). Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(2), 496–498. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.248>

Wershil, B. K., Theodos, C. M., Galli, S. J., & Titus, R. G. (1994). Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(9), 4563–4571.

Zaar, K., Wunderlich, F., & Beleh, A. (1982). Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The diffuse form and its treatment with pentamidine. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 76(6), 595–605. <https://doi.org/10.1080/00034983.1982.11687589>

Zeisig, R., Rudolf, M., Eue, I., & Arndt, D. (1995). Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 121(2), 69–75. <https://doi.org/10.1007/BF01202215>

4. Resistencia a la miltefosina en *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: caracterización biológica y molecular en modelos experimentales

4.1 Generalidades de resistencia a fármacos (RF) en *Leishmania*

La resistencia de los agentes patógenos a los fármacos disponibles es una problemática creciente y alarmante en el ámbito de la salud pública mundial (OMS, 2023). Este fenómeno ocurre cuando los organismos como bacterias, parásitos y hongos, virus, insectos, que afectan al hombre o animales, cambian con el tiempo y pierden la capacidad de responder a las moléculas diseñadas para destruirlos o inactivarlos. Esto hace que las infecciones sean difíciles o imposibles de tratar, aumentando el riesgo de propagación de las enfermedades, la severidad de las infecciones y la mortalidad (OMS, 2023). La aparición o generación de resistencia en *Leishmania* aumenta grandemente el problema ya existente de los tratamientos disponibles para la leishmaniasis. Esta resistencia se observa cuando el parásito carece o pierde o disminuye, ya sea de una manera natural o adquirida, la susceptibilidad por moléculas de reconocida potencia contra el parásito. La no respuesta de los parásitos de *Leishmania* a los pocos fármacos antileishmania disponibles representa uno de los factores involucrados en la falta de eficacia o en la reactivación de la enfermedad, conocido como fracaso o falla terapéutica (FT). Además de la resistencia de los parásitos al fármaco, existen otros factores que pueden estar interactuando en la FT como los ciclos de transmisión alterados, la aplicación de esquemas de tratamientos subóptimos/incompletos, la inestabilidad del fármaco, estado inmunológico del huésped y variaciones genéticas del propio parásito (Ponte-Sucre et al., 2017).

La RF en *Leishmania* se define como la disminución o ausencia de actividad de un agente específico (fármacos) contra una población de parásitos de *Leishmania* previamente susceptible, debido a la adquisición de mecanismos de resistencia molecular (Wijnant et al., 2022). Esto puede

llevar a una eficacia clínica reducida o nula, incluso con las dosis más altas toleradas. Es importante mencionar, aunque la RF puede ser un factor determinante en la FT, existen otros factores que influyen como características del parásito (cepa, virulencia), las condiciones del huésped (estado inmunológico y genética) y aspectos del tratamiento (adherencia y acceso a tratamiento), así como las complejas interacciones entre estos factores (Ponte-Sucre et al., 2017; Domagalska et al., 2023).

Esta resistencia de los parásitos a fármacos anti-*Leishmania* representa un fenómeno complejo debido a que involucra tanto factores intrínsecos como extrínsecos al parásito, incluyendo la variabilidad genética, presión selectiva ejercida por los fármacos y condiciones ambientales (Légaré et al., 2014). En la **figura 38**, se muestra un enfoque integral hacia el estudio de los mecanismos de resistencia a los fármacos y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis, donde se abarcan múltiples factores ambientales, los relacionados con el parásito, el hospedador y los medicamentos, así como las coinfecciones (VIH), influyen en la respuesta terapéutica de los pacientes. La diversidad genética del parásito influye en el resultado del tratamiento, ya que está estrechamente ligada a la resistencia a los fármacos. Dada la plasticidad del genoma de *Leishmania*, existen diversas modificaciones moleculares, como la amplificación, regulación y pérdida de genes, que contribuyen a los fenotipos resistentes a los fármacos. En consecuencia, se han desarrollado herramientas para identificar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar fármacos más efectivos, entre ellas están el uso de las OMICAS, manipulación genética, epidemiología molecular y cribado o screening de compuestos (Santi et al., 2022).

Otro aspecto de la resistencia de *Leishmania* a los medicamentos es que puede ser natural o adquirida. La resistencia natural, se refiere a la capacidad inherente de ciertas cepas de *Leishmania* para sobrevivir y proliferar a pesar de la exposición a un fármaco. Estudios de aislados clínicos de *L. panamensis*, mediante pruebas *in vitro* y *ex vivo*, evalúan la supervivencia del parásito en células infectadas tratadas con concentraciones clínicas de SbV, encontrando tasas de supervivencia mayores a una cepa susceptible de referencia (87% vs 6,5%) (Fernández et al., 2024). Estudios moleculares se ha sido realizado en aislados que no respondieron al tratamiento a MTF en *L. donovanni* y *L. infatum* se observa mutaciones en genes transportadores de MTF como LdMT (Cojean et al., 2012; Mittal et al., 2007) y la expresión reducida del complejo LdMT/LdROS3 en aislados de *L. braziliensis* (Sánchez-Cañete et al., 2009). Por otro lado, la resistencia adquirida se desarrolla cuando el parásito se expone a dosis subóptimas del medicamento, lo que promueve la selección de cepas resistentes (Jeddi et al., 2011).

En el NM, se ha observado que la resistencia a los fármacos varía según la especie de *Leishmania* y la región geográfica. Se ha reportado tasas de cura para la LC entre el 77% y el 90%, con tasas de FT que alcanzan el 30,4% en pacientes infectados por *L. braziliensis* y el 8,9% con *L. panamensis*. En amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* presenta una menor susceptibilidad a los SbV, con un 69% de los aislamientos evaluados siendo resistentes, en comparación con aislados de *L. panamensis* y *L. guyanensis*. (Rojas et al., 2006; Arevalo et al., 2007; Fernandez et al., 2014). La AmB-L ha mostrado una eficacia en pacientes infectados con *L. braziliensis*, con tasas de curación del 90% al 100%, y es altamente efectiva en el tratamiento de LMC en Brasil, con tasas de curación del 88% al 100% y menos efectiva contra *L. amazonensis* y *L. shawi* (Motta et al., 2012; Pedras et al., 2018). Por otro lado, la PAR ha mostrado resultados variables en LC, con una baja eficacia (59%) en América Central con dosis bajas, pero una eficacia superior al 90%

con dosis más altas en Brasil. En formulaciones tópicas, la PAR ha sido efectiva contra *L. panamensis* en Panamá (79%) y *L. braziliensis* en Bolivia (77,5%), aunque *L. guyanensis* ha sido menos susceptible (Ben Salah et al., 2013; Soto et al., 2019; Sosa et al., 2019). Si bien no se han reportado aislamientos clínicos resistentes a la PAR, estudios de laboratorio indican un riesgo potencial de resistencia clínica.

Los mecanismos de resistencia en *Leishmania* son diversos y pueden variar según la región geográfica, la especie de *Leishmania* involucrada y el fármaco utilizado. En el caso de los Sb^V, se ha observado la adquisición de resistencia debido al uso inadecuado, la exposición a concentraciones subóptimas, el empleo de Sb^V vencidos y dosis insuficientes han contribuido a este fenómeno (Wijnant et al., 2022). En respuesta a la presencia de altos niveles de Sb^V, los amastigotes intracelulares de *L. donovanni* de aislados clínicos tienden a aumentar la expresión de proteínas de eflujo, como la proteína A relacionada a resistencia a múltiples fármacos (MRPA), lo que les permite expulsar el fármaco y desarrollar resistencia (Rai et al., 2013). En el caso de MTF, se han generado parásitos resistentes en estudios de laboratorio (*in vitro*) mediante exposición a concentraciones gradualmente crecientes del fármaco. En *L. donovani*, se observaron mutaciones puntuales en genes relacionados con el transporte de la MTF, como *ros3* y *mt*, lo que llevo a la expresión del fenotipo de resistencia a este fármaco en pruebas de citotoxicidad parasitaria *in vitro*. (Perez-Victoria et al., 2003). Además, se han reportado aislados clínicos resistentes de *L. infatum* en pacientes inmunosuprimidos en Francia y *L. donovani* en la India, atribuidos a la ausencia de locus de sensibilidad a la MTF, baja expresión o mutaciones de genes transportadores de MTF (Srivastava et al., 2017; Cojean et al., 2012). Por otro lado, la resistencia a AmB es poco común, pero se han reportado casos de falta de respuesta en pacientes inmunocomprometidos en Europa e India, relacionados con cambios en la composición de esteroides de la membrana y el aumento del

eflujo de AmB (Mbongo et al., 1998). Finalmente, en el caso de PAR, se ha observado una rápida selección de parásitos resistentes de *L. donovani* en el laboratorio, con cambios en la fluidez de la membrana, aumento del eflujo mediado por transportadores ABC y menor susceptibilidad al estrés oxidativo. Estos mecanismos de resistencia resaltan la complejidad y la necesidad de un manejo adecuado de los fármacos para combatir la leishmaniasis (Chakravarty et al., 2010). Otro mecanismo para evaluar la magnitud de la resistencia adquirida a un fármaco, es el índice de resistencia (IR) el cual permite cuantificar cuantas veces es mas resistente una cepa seleccionada bajo presión del un fármaco en comparación con cepas no tratadas, se han realizado estudios evaluando el IR en parásitos resistentes a KTZ y PMD, en donde promastigotes resistentes , mostraron IR de 3 a 12 veces mayor a las cepas nativas (Salazar & Escobar, 2022).

4.1.1 Biomarcadores moleculares de resistencia a fármacos

Los biomarcadores moleculares de resistencia a fármacos se definen como molécula o conjunto de moléculas que se expresan diferencialmente en las cepas de *Leishmania* que han desarrollado resistencia a tratamientos farmacológicos tales como antimoniales, MTF, AmB, entre otros. Estos biomarcadores pueden incluir proteínas, metabolitos, genes o cualquier otro tipo de molécula que refleje cambios en la fisiología del parásito asociados con la capacidad de evadir el efecto o expulsar el fármaco (Ponte-Sucre et al., 2017; Carrillo & Moreno, 2019). Es importante detectar y definir clínicamente la resistencia a los fármacos antileishmania, sin embargo, debido a la falta de biomarcadores de resistencia validados y a la pobre estandarización de protocolos y ensayos de laboratorio de diagnóstico clínico, los ensayos genotípicos y fenotípicos tales como detección de mutaciones, expresión génica, viabilidad y proliferación celular aún no están completamente disponibles (Ponte-Sucre A et al., 2017). Sin embargo, las investigaciones

realizadas tanto en cepas de laboratorio como en cepas resistentes obtenidas de pacientes en zonas endémicas sugieren la implicación de diversas vías metabólicas y genéticas (Salari et al., 2022). Algunos de los marcadores moleculares asociados a la resistencia a diferentes fármacos en leishmaniasis se mencionan en la Tabla 15.

Tabla 15 Biomarcadores moleculares y su impacto en la resistencia a fármacos en *Leishmania*

Marcador	Función/Rol	Impacto en la resistencia a fármacos	Referencia
Aquagliceroporina (AQP1)	Transporte de Sb ^{III} y regulación de la presión osmótica	La disminución se vincula con resistencia; facilita la entrada de Sb ^{III}	Brochu et al., 2003; Mandal et al., 2015
Transportadores de unión a ATP (ABC)	Conjugación y empaquetamiento de Sb ^{III} con T[SH]2 o glutatión (GSH) dentro de vesículas. Expulsión de complejos de Sb ^{III} del parásito.	Contribuye a la resistencia Sb ^{III} , en <i>L. major</i> y <i>L. donovani</i>	Légaré et al., 2001.
Proteína 14-3-3	Se une a proteínas fosforiladas; involucrada en apoptosis	Sobreexpresión en aislados resistentes a Sb ^V de <i>Leishmania</i>	Jeddi et al., 2014
Proteína 299 (P299)	Función desconocida	La sobreexpresión confiere protección contra Sb ^{III} y MTF	Choudhury et al., 2008
Histona	Empaquetamiento de ADN; regulación de la expresión génica	Sobreexpresión en aislados resistentes Sb ^V en <i>L. donovani</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>	Jeddi et al., 2014

Cinasa C activada por <i>Leishmania</i> (LACK1)	Procesamiento de ARN, transducción de señales, regulación del ciclo celular	Esencial para la infectividad; biomarcador de resistencia a MTF.	Hajjarian et al., 2016
Ubiquitina	Degradación de proteínas; funciones celulares	Sobreexpresión en aislados resistentes Sb ^v de <i>L. tropica</i> ; protege del estrés oxidativo	Welchman et al., 2005; Kazemi-Rad et al., 2013
Permeasa de aminoácidos (AAP3)	Transporte de arginina	Alta expresión vinculada a la desintoxicación de los fármacos Sb ^v .	Colotti et al., 2011; Kazemi-Rad et al., 2013
Quinasa de fosfoglicerato (PGK)	Enzima clave en la glucólisis	Sobreexpresión en aislados resistentes Sb ^v	Opperdoes et al., 2007
Proteína Quinasa Activada por Mitógenos (MAPK)	Regula la muerte celular, respuesta al estrés	Sobreexpresión en aislados sensibles; disminución en resistentes a MTF.	Kazemi-Rad et al., 2013
Fosfatasa de Proteína Tirosina (PTP)	Regulación post-traduccional	Sobreexpresión en aislados resistentes Sb ^v ; vinculada a apoptosis	Kazemi-Rad et al., 2013
Reductasa de pteridina 1 (PTR1)	Reduce biopterina y folato	Participa en resistencia contra estrés oxidativo por metotrexato.	de Souza et al., 2016

Peroxidasa de triparedoxina (TXNPx)	Defensa antioxidante	Sobreexpresión en aislados resistentes a la AmB; reduce el estrés oxidativo	Suman et al., 2016
Proteína de membrana kinetoplástica (KMP-11)	Citocinesis; Aumenta la presión de la bicapa lipídica.	Disminución en aislados resistentes AmB; afecta la actividad del transportador	El Fadili et al., 2009
Sintasa de gamma glutamilcisteína (GSH1)	Metabolismo de tionas	La sobreexpresión se vincula con resistencia Sb ^v	Jeddi et al., 2014
Reductasa de tripanotiona (TryR)	Mantiene ambiente reductor intracelular	Esencial para la supervivencia; Resistencia a Sb ^v	Drummelsmith et al., 2003
Calcineurina	Transducción de señales; apoptosis y supervivencia celular.	La disminución previene la apoptosis; aumenta la tasa de supervivencia. Resistencia AmB	Bagher et al., 2013
Repeticiones ricas en leucina (LRRs)	Interacciones proteína-proteína	La sobreexpresión se vincula con resistencia a Sb ^{III}	Genest et al., 2008
Genes transportadores LiMT y LiRos3	Transporte de MTF	Concentración reducida de MTF en aislados resistentes	Mondelaers et al., 2016

Dismutasa de superóxido de hierro-A (FeSOD-A)	Defensa antioxidante	Alta actividad en aislados resistentes Sb ^V ; detoxifica ROS	Tessarollo et al., 2015
Transportador de folato 1 (FT1)	Transporte de folato	La variación en la expresión afecta la sensibilidad a metotrexato.	Richard et al., 2004
Proteína calpaína pequeña kinetoplástica relacionada (SKCRP14.1)	Proteasa	Afecta la sensibilidad a Sb ^V y MTF.	Vergnes et al., 2007
LmACR2	Activación de fármacos	Reduce Sb ^V a la forma activa Sb ^{III}	Zhou et al., 2004
Reductasa dependiente de tionas I (TDR1)	Activación de Sb ^V	Involucrada en la sensibilidad a Sb ^V	Tew et al., 2011
Proteína de choque térmico 70 (hsp70)	Chaperona molecular	Sobreexpresión en aislados resistentes a Sb ^V ; mejora la tolerancia a metales	Torres et al., 2013

4.1.2 Resistencia a la MTF (R-MTF)

Existen factores asociados al riesgo de desarrollo de R-MTF los cuales pueden clasificarse en intrínsecos y extrínsecos. Entre los determinantes intrínsecos, se encuentra la larga vida media del fármaco (150-200 horas) y la necesidad de tratamientos prolongados de 28 días, lo que deja niveles subterapéuticos en el organismo por varias semanas, aumentando la probabilidad de desarrollar resistencia (Bryceson, 2001). Por otro lado, los determinantes extrínsecos, como la mala adherencia al tratamiento debido a su alto costo y la disponibilidad no regulada en el mercado, permiten a los pacientes interrumpir el tratamiento prematuramente, lo que favorece la selección y transmisión de parásitos resistentes (Sundar & Murray, 2005).

La MTF ha sido utilizada en el Viejo Mundo en el tratamiento de la LV, siendo utilizada como monoterapia con un régimen de 25, 50 o 100 mg/kg/día por 28 días. Inicialmente mostro eficacia de >94%, sin embargo, la tasa de reactivación de la enfermedad fue en aumento del 7% en la India y 20% en Nepal (Sundar et al., 2012; Rijal et al., 2013). En el NM, la MTF ha sido aprobada para el tratamiento LC causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*, mostrando una eficacia variable. En Colombia, se reportó una eficacia de la MTF del 50% y 91,1% para *L. braziliensis* y *L. panamensis*, respectivamente (Castro et al., 2017). La susceptibilidad al fármaco varía entre especies, siendo *L. guyanensis* la más susceptible (Fernández et al., 2014; Obonaga et al., 2014). En las Américas, no se utiliza la MTF para tratar la LV debido a la baja respuesta al tratamiento. Esto se debe a la ausencia de un locus de sensibilidad a la MTF (MSL) en cepas de *L. infamtun* del NM, lo que aumenta la tolerancia al fármaco (Carnielli et al., 2018).

La R-MTF ha sido objeto de estudios tanto en condiciones *in vitro* como en casos clínicos. In vitro, la resistencia a la MTF se ha generado mediante la exposición gradual de los promastigotes a concentraciones crecientes del fármaco, resultando en la selección de cepas

resistentes que presentan una disminución significativa en la susceptibilidad a la MTF (Seifert et al., 2003). Este proceso de selección ha permitido identificar mutaciones, sobreexpresión en genes claves, como el gen de *mt* y el gen *ros3*, que codifican componentes del complejo transportador de MTF en el parásito. Estos genes son esenciales para la internalización del fármaco, y las mutaciones o la reducción en su expresión disminuyen la capacidad del parásito de absorber la MTF, contribuyendo así a la resistencia, sin o alterando el comportamiento (fitness) del parásito o su infectividad. Estudios en ratones BALB/c infectados con cepas R-MTF de *L. donovanni* demostraron que no hubo alteración en la infectividad del parásito y la resistencia se transfiere a los amastigotes (Seifert et al., 2007). En cepas resistentes de *L. major*, los promastigotes proliferan a un ritmo similar con la cepa WT. Además, los parásitos R-MTF demuestran una susceptibilidad reducida al fármaco, manteniéndose estable tras retirar la presión del medicamento al cultivo, la metaciclologénesis está elevada, aunque estos parásitos muestran una disminución en la infección en macrófagos peritoneales y en ratones BALB/c (Turner et al., 2015). Contrariamente, en ensayos *in vitro* e *in vivo* con *L. infantum* los cuales se observó pérdida en el fitness del parásito debido por una reducción en el crecimiento, la metaciclologénesis y la capacidad de multiplicación intracelular. Además, los ratones BALB/c las cepas resistentes no fueron infectantes los cuales resulto en una incapacidad completa para causar una infección típica de LV (Eberhardt et al., 2019) lo cual sugiere el impacto de la resistencia en el comportamiento del parásito puede ser específico de la especie.

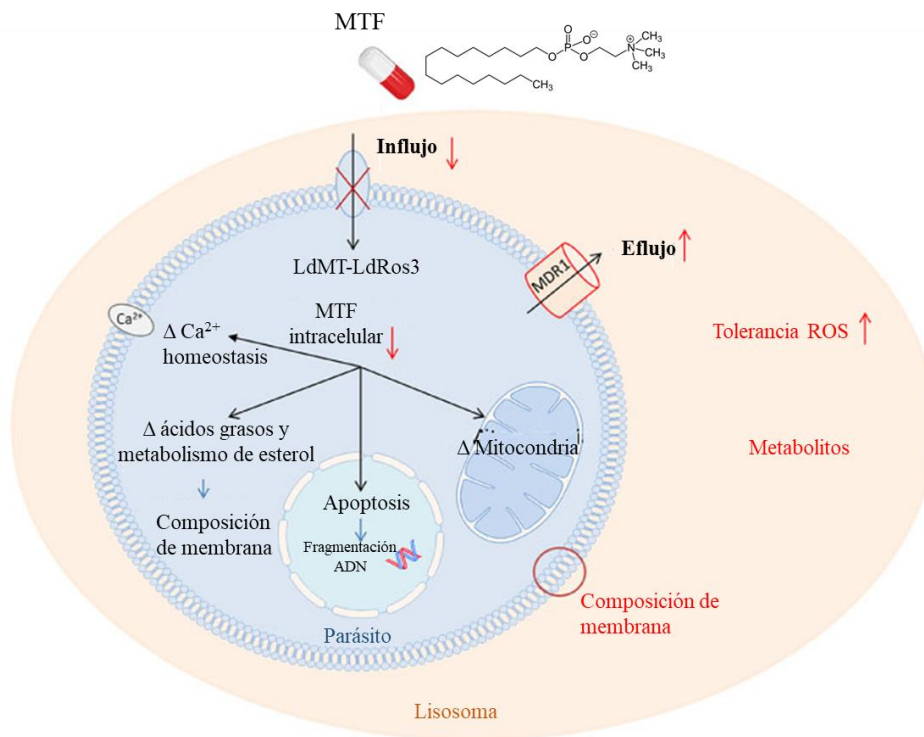
A nivel clínico, son pocos los casos reportados de resistencia en aislados de pacientes, los cuales observa recaída en pacientes tratados con MTF, especialmente en regiones donde el uso prolongado y a veces inadecuado del fármaco ha ejercido presión selectiva sobre los parásitos. Los estudios han mostrado que los parásitos aislados de estos pacientes presentan tolerancia al fármaco,

a pesar de que la susceptibilidad *in vitro* no siempre refleja claramente esta resistencia, sugiriendo la influencia de factores adicionales, como el estado inmunológico del huésped o la variabilidad genética del parásito. En aislados clínicos a de *L. infantum* resistentes a la MTF se ha reportado polimorfismo de nucleótido único (SNP) en el gen *mt*, al igual en casos de *L. donovani* en la India y la ausencia del MSL (Cojean et al., 2012; Srivastava et al., 2017; Carnielli et al., 2018).

El mecanismo de acción de la MTF en *Leishmania* no se comprende completamente, y se han descrito varios mecanismos potenciales, lo que sugiere diferentes dianas terapéuticas dentro del parásito. Entre ellos, se destacan la alteración del metabolismo lipídico y la composición de la membrana, la inducción de apoptosis y la disrupción de la homeostasis del calcio intracelular. La MTF disminuye la cantidad de fosfocolina en la membrana del parásito e interfiere con las funciones mitocondriales, provocando la fragmentación del ADN y la muerte celular. Además, posee propiedades inmunomoduladoras, que potencian la respuesta inmune del huésped (Rakotomanga et al., 2007; Luque-Ortega et al., 2007; Dorlo et al., 2012). En cuanto a los mecanismos de resistencia a la MTF incluyen varios procesos que permiten a los parásitos evadir el efecto del fármaco, tales como, sobreexpresión y/o mutaciones en el complejo transportador MT-ROS3, lo que reduce la internalización del fármaco en la célula. En parásitos resistentes *in vitro* de *L. infantum* y *L. major* y aislados clínicos de *L. braziliensis* en Brasil, se ha observado la inactivación del transportador MT y su subunidad β ROS3, que son responsables de la captación de MTF (Mondelaers et al., 2016; Espada et al., 2021). Además, la resistencia se ve potenciada por el aumento del eflujo (salida) del fármaco, mediado por transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR1). En particular, la sobreexpresión de la glicoproteína P (P-gp) de la familia ABC/MDR1 y los exportadores de la subfamilia G de ABC, que bombean MTF fuera de la célula, reduce significativamente la acumulación del fármaco (Hendrickx et al., 2020). Otros

factores contribuyentes a la resistencia incluyen cambios en la composición de la membrana plasmática, que contrarrestan el efecto de MTF, y un aumento en la tolerancia al ROS. Estos mecanismos permiten a los parásitos sobrevivir al daño celular inducido por el fármaco. Además, la sobreexpresión de proteínas como Hsp80, SKCRP14.1 similar a calpaina, la proteína de 299 kDa, eIF4A y la histona H2A también se ha asociado con la resistencia a MTF (Gamarro et al., 2013) Ver **Figura 39** y **Tabla 15**.

Figura 39 Mecanismos de acción y resistencia a la MTF



Nota: grafica tomada y modificada de Wijnant et al., 2022. Los posibles mecanismos de resistencia se muestran en rojo. (MT, transportador de MTF de; ROS3, subunidad del transportador MT; MTF miltefosina; MDR, transportador de resistencia a múltiples fármacos.

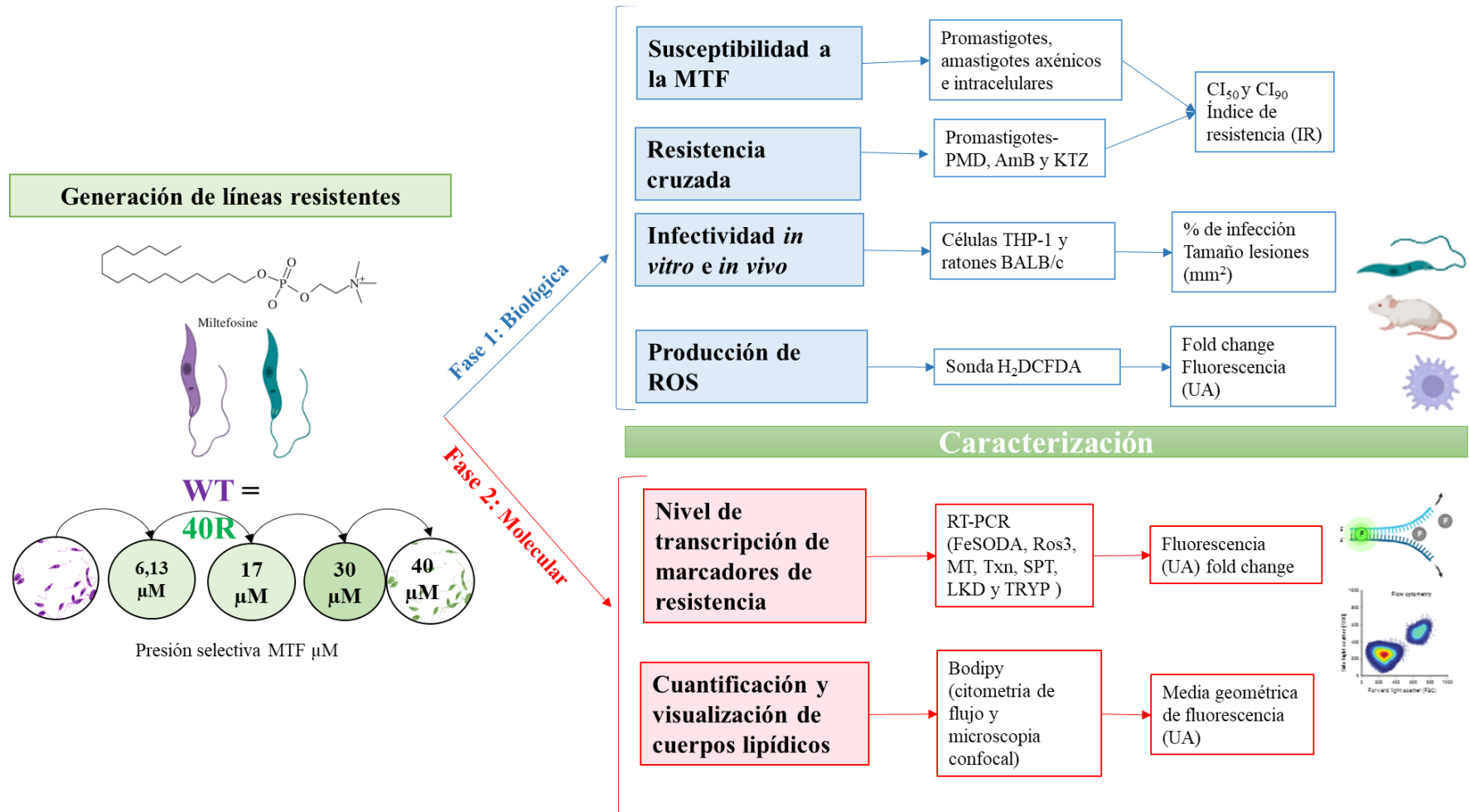
Teniendo en cuenta la creciente problemática de R-MTF y la poca información en *L. amazonensis* y la falta de alternativas terapéuticas efectivas, este estudio se enfoca en la

caracterización biológica y molecular de cepas R-MTF generadas en el laboratorio bajo presión selectiva del fármaco. El objetivo de este capítulo fue caracterizar biológica y molecularmente cepas R-MTF de *L. amazonensis*. Dado que el riesgo de propagación de cepas resistentes compromete la eficacia de los tratamientos y puede llevar a un aumento en los casos de fracaso terapéutico, es crucial profundizar en el entendimiento de los mecanismos de resistencia. Este conocimiento es esencial no solo para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, sino también para mejorar los protocolos de manejo clínico y reducir la aparición de resistencia en las poblaciones de *Leishmania*.

4.2 Metodología

El presente es un trabajo de investigación tipo experimental desarrollado en modelos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniasis. En la fase 1 se generaron las líneas resistentes de *L. amazonensis* a MTF (R-MTF), y se caracterizaron según su susceptibilidad, resistencia cruzada a otros medicamentos antileishmania, infectividad y la producción de ROS. En la fase 2 se caracterizaron molecularmente evaluando los niveles de transcripción de genes de marcadores asociados a la resistencia y la cuantificación y visualización de cuerpos lipídicos. Los experimentos contaron con el aval de Comité de Ética de la UIS y fueron realizados en los laboratorios del CINTROP de la UIS y en el laboratorio de Genômica Funcional de Parásitos (GFP), Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Brasil. (Ver diseño experimental del capítulo **Figura 40**).

Figura 40 Diseño experimental empleado en el presente capítulo



4.2.1 Medicamentos

La miltefosina (MTF, 407,6 g/mol) se obtuvo de Gold Biotechnology® (St Louis, MO, EE. UU). Pentamidina (PMD, 340,4 g/mol), ketoconazol (KTZ, 531,4g/mol), paromomicina (PM, 615,6 g/mol), anfotericina B (AmB, 924,1g/mol) y antimoniales trivalente (Sb^{III} , 667,87 g/mol) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Las soluciones stock se prepararon disolviendo los medicamentos en dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac®, Barcelona, España) o medio de cultivo Schneider (Sigma-Aldrich) dependiendo de su solubilidad. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio de cultivo Schneider antes de su uso.

4.2.2 Parásitos y células

Se cultivaron células THP-1 humanas (ATCC, TIB-202) en RPMI 1640 (Gibco, NY, EE. UU.) más 10 % de suero de bovino fetal inactivado por calor (hiFCS) (Gibco) a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Las células se transformaron en un fenotipo adherente mediante una incubación de 24 h con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA:130 nM, Sigma-Aldrich). Se cultivaron promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/LV78) en medio Schneider suplementado con hiFCS al 10 % a 26 °C. Los amastigotes axénicos se obtuvieron de las cepas R-MTF y de tipo salvaje (WT, siglas en inglés de *wild-type*) mediante el cultivo de promastigotes de fase logarítmica tardía en medio Schneider acidificado (pH: 5,0) suplementado con 20% de hiFCS durante 8 días a 32 °C y 5 % de CO₂ (Hodgkinson et al., 1996). Los amastigotes intracelulares se obtuvieron después de la infección de células THP-1 con promastigotes en fase estacionaria en una relación célula: parásito de 1:5 durante 24 h a 32 °C y 5% de CO₂ (Neira et al., 2019).

4.2.3 Generación de cepas resistentes

La cepa WT y las cepas R-MTF de *L. amazonensis* fueron cultivadas en medio de cultivo más 10% de hiFBS a 28 °C en placas de 24 pozos. Los cultivos fueron controlados mediante

microscopía y se realizaron pases de los parásitos cada 4 días desde una concentración inicial de 5×10^6 promastigotes/mL. Los cultivos fueron expuestos inicialmente a MTF 6,3 μM y, posteriormente, en forma escalonada, a 17, 30 y 40 μM . Se realizó un aumento en la concentración de la MTF solo cuando los cultivos expuestos a la MTF mostraron una tasa de crecimiento equivalente a la cepa WT (Seifert et al., 2003). Los cultivos se mantuvieron en presencia de MTF a lo largo del estudio. Las cepas R-MTF fueron denominadas 6,3-R, 17-R, 30-R y 40-R.

4.2.4 Susceptibilidad/resistencia a la MTF

Los promastigotes WT y R-MTF fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de MTF (1,2 a 100 μM) por 72 h a 28 °C en placas de 96 pozos. Parásitos control fueron mantenidos sin compuesto. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La inhibición del crecimiento fue determinada por el método de reducción de la resazurina. Se adicionaron a cada pozo 20 μL de la resazurina (0,11 mg/mL) y se dejaron en incubación a temperatura ambiente por 4 horas. Los porcentajes de inhibición fueron determinados por espectrometría a 570 y 600 nm utilizando un lector de microplacas Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc, VT, USA). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición, mediante la fórmula: % de inhibición = $100 * (\text{DO grupo control} - \text{DO grupo tratado}) / \text{DO grupo control}$.

En los parásitos intracelulares, las células THP-1 infectadas se trataron con fármacos durante 3 días a 32 °C y la inhibición del crecimiento se determinó microscópicamente contando el número de células infectadas en 300 células teñidas con Giemsa (Neira et al., 2019). La concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) en promastigotes y amastigotes intracelulares se determinaron mediante los ajustes de regresión no lineal de las curvas de dosis-respuesta utilizando el software Mxlfite™ (ID Business solution, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron por triplicado, tres veces de forma independiente. El índice de resistencia (IR) se calculó dividiendo el

IC₅₀ de la línea resistente a MTF sobre la IC₅₀ de la cepa progenitora WT (García-Hernández et al., 2012).

4.2.5 Resistencia cruzada

Los promastigotes (WT y R-MTF) fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de PMD, KTZ, AmB, Sb^{III} y PMC por 72 h a 26 °C en placa de 96 pozos. El IR fue calculado según lo descrito anteriormente.

4.2.6 Estabilidad de la resistencia.

Los promastigotes (WT y R-MTF) fueron cultivados en medio Schneider libre de fármacos durante tres meses (Seifert et al., 2003). La susceptibilidad a los fármacos fue determinada tratando los parásitos con MTF por 72 a 26 °C. Se determinaron las CI₅₀, CI₉₀ según lo descrito anteriormente.

4.2.7 Infectividad in vitro

Las células THP-1 fueron cultivadas a 8×10^5 células/mL sobre laminillas circulares en placas de 24 pozos. Las infecciones se realizaron con promastigotes en fase estacionaria en un radio 1:10 células: parásito. Los porcentajes de infección se determinaron por conteo microscópico de 300 células (infectadas y no infectadas) en preparaciones fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Todas las infecciones se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. Los resultados fueron expresados en porcentajes de infección y su desviación estándar.

4.2.8 Infectividad in vivo

Ratones BALB/c ($n = 4$) de 8-10 semanas de edad fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. Los ratones se alojaron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a 23 °C y 55 % de humedad relativa, con agua y comida *ad libitum* en la Unidad Experimental en Animales del CINTROP. Todos los ensayos fueron realizados con la aprobación del Comité de Ética para Investigación Científica CEINCI de la Universidad Industrial de Santander (Acta N.23

del 10 de diciembre 2019), siguiendo las directrices internacionales de bienestar animal y buenas prácticas de laboratorio, provocando el mínimo sufrimiento en los animales. Al final de los experimentos, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de un cóctel de ketamina/xilacina y sacrificados mediante dislocación cervical.

Los ratones se infectaron en la parte dorsal inoculando vía subcutánea de 5×10^5 promastigotes en fase estacionaria en 100 μL de PBS, pH 7,2. Los ratones fueron distribuidos en dos grupos experimentales, G₁: ratones infectados con cepa WT, y G₂: infectados con cepa 40-R de *L. amazonensis*. El sitio de la lesión fue monitoreado hasta la semana 27. El tamaño de la lesión se midió con un caliper digital (Tracedable®, VWR, Radnor, USA) y el área de la lesión (mm^2) fue calculado. Se registró el tiempo de aparición de la primera lesión post infección (pi) y el tiempo que tardó en evidenciar una lesión de LC por cada grupo. Los animales se sacrificaron a las 12 semanas después de la aparición de la lesión inicial y se tomaron improntas de las lesiones.

4.2.9 Resistencia de aislados de ratones con LC.

De las lesiones que presentaban un tamaño aproximado de 60 mm^2 se realizó un aspirado con jeringa el cual se colocó en medio Schneider-10% hFCS a 26 °C. Los parásitos aislados (1×10^6 promastigotes/mL) fueron tratados con MTF durante 72 h. Se calcularon los porcentajes de inhibición y la CI_{50} como se describió anteriormente. Se mostraron los resultados representativos de dos experimentos independientes.

4.2.10 Generación de ROS

Se determinaron utilizando la sonda no fluorescente permeable a las células diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA , Invitrogen™) cuya intensidad de fluorescencia es indicativa de los niveles de ROS intracelulares/extracelulares. Los parásitos (2×10^6 promastigotes/mL) de las cepas WT y 40-R fueron tratados con MTF 10 y 30 μM , AmB 0,1 μM , PMD 0,3 μM y SbIII 100

μM , durante 24 y 72 h a 26 °C. Se utilizó como control positivo el H_2O_2 (0,5 μM) incubando por 4 horas. Los promastigotes se lavaron con PBS, pH:7,2 y se incubaron con 20 μM H_2DCFDA en PBS por 30 min a 26 °C. El producto de diclorofluoresceína fluorescente (DCF) obtenido después de la excitación y oxidación de la esterasa se midió mediante fluorometría a 488/525 nm. Los resultados fueron expresados como el promedio de cambio de veces (*fold change*) de la fluorescencia (Unidades Arbitrarias, UA) de los parásitos tratados con fármacos/parásitos no tratados.

4.2.11 Transcripción de marcadores de resistencia por PCR de transcripción inversa (RT-qPCR)

Promastigotes (10^8 parásitos) de las cepas WT y cepa R-40 (Línea 1: mantenida por 12 meses con presión de MTF; Línea 2: mantenida por 6 meses de presión con MTF) se suspendieron en 1 mL de reactivo TRIzol (Invitrogen) y se extrajo el ARN total utilizando el método del cloroformo. El ARN se trató con ADNasa I (Ambion) y el ADNc se obtuvo utilizando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras de ADNc se diluyeron a 100 ng/ μL y se usaron en la reacción de amplificación RT-qPCR realizada usando la mezcla maestra 2X SYBR GREEN (Applied Biosystems) y los cebadores específicos se muestran en la **Tabla 16**. Se diseñaron cebadores específicos para cada proteína utilizando regiones de nucleótidos conservadas para amplificar las diferentes copias de genes que se encuentran en TritypDB (tritypdb.org). Se evaluaron los niveles de transcripciones de los siguientes genes: Superóxido dismutasa de hierro (*Fesoda*), proteína Ros3 (*ros3*), transportador de MTF (*MT*), triparedoxina peroxidasa (*txn*), serina C-palmitoiltransferasa (*spt*), proteína quinasa de cuerpos lipídicos (*lkd*) y tripanotion reductasa (*tryp*). Se utilizó el gen de la ADN polimerasa I (*dnapoli*) y proteína de unión a TATA (*tbp*) como normalizadores constitutivos. Las

amplificaciones se realizaron utilizando un sistema QuantStudio™ 12 K Flex (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación a 60 °C durante 15 s y extensión a 60 °C durante 30 s. La fluorescencia se midió después de cada ciclo. Los niveles de transcripción se determinaron utilizando el C comparativo Método T (método 2 $-\Delta\Delta CT$) (Santi et al., 2021).

Tabla 16 primers utilizados en este capítulo.

Genes	Secuencias	Finalidad RT-qPCR	Referencia
<i>Fesoda_Fw</i>	GAGCACGCCTACTACAAAGA	Superóxido dismutasa	Santi et al.
<i>Fesoda_Rv</i>	CTTCGTGGCCTTCTCATAACA	A de <i>L. infantum</i>	2021
<i>ros3_Fw</i>	ATGTGTGAAGTCTGGCAT CG	<i>Ros3 de L.</i>	Espada et al.
<i>ros3_Rv</i>	AGGCTCTTGGTAGTAGTA GCC	<i>amazonensis</i>	2019
<i>mt_Fw</i>	GACAAGTGTTCACC CTT CT	<i>Transportador de</i>	Lari et al.
<i>mt_Rv</i>	ATGCTGTTATTAGTGATT CGGC	<i>MTF de L.</i>	2019
<i>txn_Fw</i>	TATGGACTATCAGATGTACCGTAC	Triparedoxina	
<i>txn_Rv</i>	AGGTGAAGTCCATCGGATAG	peroxidasa de <i>L.</i>	Este trabajo
<i>spt_Fw</i>	TACCTCCGCCAGCATAGTTC	<i>amazonensis</i>	
			Este trabajo

		Serina	
<i>spt_Rv</i>	ATCTTTGAGCTGACGGATGC	palmitoiltransferasa de <i>L. amazonensis</i>	
<i>ldk_Fw</i>	TACGATCGAGTGCGGTA	Quinasa de gotas lipídicas de <i>L.</i>	Ribeiro et
<i>ldk_Rv</i>	CCCAAAGTCAGAGAGCAACA	<i>infantum</i>	al., 2024
<i>tryr_Fw2</i>	GCCAAGATCAGCGACTTC	Tripanotion reductasa de <i>L. braziliensis</i> y <i>L.</i>	Este trabajo
<i>tryr_Rv2</i>	CTTCTCGTAGAAGTATGC CG	<i>panamensis</i>	
<i>dnapoli_Fw</i>	CGAGGGCAAGACATAC	ADN polimerasa I de	Santi et al.
<i>dnapoli_Rv</i>	GAGAGCGGGCACCAATCAC	<i>L. infantum</i>	2021
<i>tbp_Fw</i>	CAAGAGTTCCTGCCGAATG	Proteína de unión a TATA de <i>L.</i>	Este trabajo
<i>tbp_Rv</i>	GGCATGTACTCCACGTTG	<i>braziliensis</i> y <i>L.</i> <i>panamensis</i>	

Nota: Fw: cebador hacia adelante *forward primer*; Rv: cebador reverso *reverse primer*

4.2.12 Cuantificación y tinción de cuerpos lipídicos

Los promastigotes de *L. amazonensis* (3×10^6 parásitos) en las fases de crecimiento logarítmico y estacionario fueron lavados dos veces con PBS e incubados con 5 $\mu\text{g/mL}$ de la sonda BODIPY™ 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-Indacene, Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) durante 30 min a T° ambiente. y protegidos de la luz. Para evaluar la

cantidad de cuerpos lipídicos en los parásitos, se obtuvieron un total de 30,000 eventos/muestra en el citómetro de flujo BD FACSCalibur™. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Flow Jo (Flow Cytometry Analysis Software, versión 10). Los resultados fueron expresados como la media geométrica de la fluorescencia en UA de cuerpos lipídicos en diferentes fases de crecimiento parasitario.

Para realizar la microscopía confocal, una muestra de cada suspensión celular se adhirió a portaobjetos de vidrio recubiertos con 0,1% de poli-L-lisina durante 10 min y luego se fijaron en formaldehído al 4% durante 10 min a T° Amb. y protegidos de la luz. Los portaobjetos de vidrio se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el reactivo antifade ProLong™ Gold, y las imágenes se obtuvieron utilizando el microscopio confocal Nikon C2+ y se analizaron con el software de imágenes de microscopio NIS Elements (Nikon®) (Melo et al., 2011).

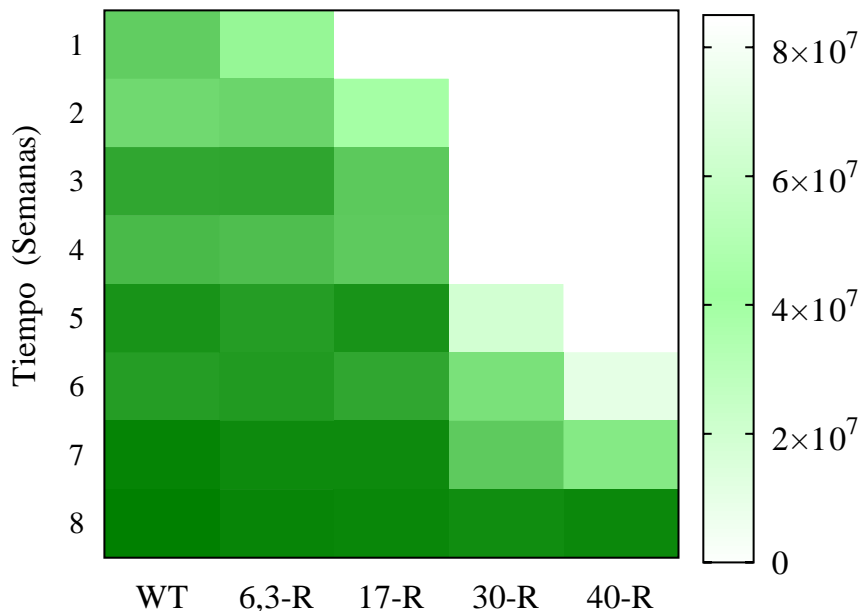
4.2.13 Análisis de resultados

La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para los experimentos se realizaron al menos tres réplicas técnicas para cada una de las tres réplicas biológicas. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.2.0. La significancia estadística se fijó en $p < 0,05$. Se utilizó la prueba t de Student para comparar los parásitos WT y los parásitos R-MTF. En la evolución de las lesiones *in vivo* se realizó la prueba de comparación múltiple Sidak's. Los valores de p se informaron según el formato GraphPad Prism, donde ns ($p > 0,05$), * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), y *** ($p \leq 0,001$).

4.3 Resultados

4.3.1 *Generación de cepas R-MTF*

Los promastigotes WT se expusieron a 6,3 μM de MTF. Después de 4 pases (2 semanas) su crecimiento fue equivalente al crecimiento de la WT. La cepa 6,3-R se expuso a 17 μM de MTF. Después de 8 pases (4 semanas) se obtuvo la cepa 17-R. Después ésta se expuso a 30 μM de MTF. Después de 6 pases (3 semanas) se obtuvo la cepa 30-R. Después esta se expuso a 40 μM y después de 4 pases (2 semanas) se obtuvo la cepa 40-R. Los detalles del desarrollo de líneas resistentes se muestran en la **Figura 41**. No se desarrollaron líneas resistentes a mayores concentraciones de MTF, debido al efecto detergente no específico de la MTF a 50 μM reportada en otros estudios (Seifert et al., 2003; Wieder et al., 1999).

Figura 41 Generación de cepas resistentes a la MTF.

Nota: En la figura se observa que la cepa *L. amazonensis* resistente a 40 μM generó y estabilizó a la semana 8 de mantenerla con presión del medicamento. Se realizaron dos experimentos independientes.

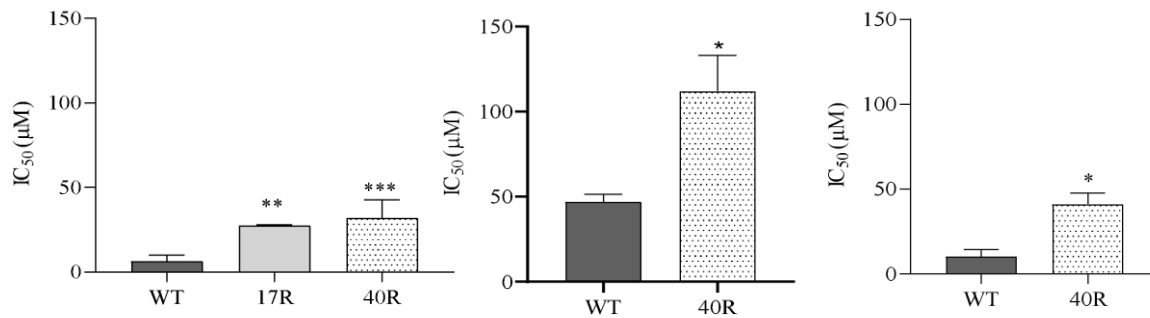
4.3.2 Susceptibilidad de las cepas R-MTF

En comparación con la línea WT, los promastigotes R-MTF fueron menos susceptibles a la MTF con IR de 4 y 5 para las cepas 17-R y 40-R, respectivamente. Los amastigotes axénicos e intracelulares la cepa 40-R fueron menos susceptibles al fármaco con IR de 2 y >4, respectivamente. Los valores de CI_{50} se muestran en la **Tabla 17** y **Figura 42a**. La CI_{50} de MTF en amastigotes intracelulares no fue posible determinarla debido a la citotoxicidad que presenta la MTF en las células THP-1 (CC_{50} : $40,93 \pm 2.4 \mu\text{M}$), sin embargo, a la máxima concentración (60 μM) evaluada se observan gran cantidad de parásitos de la línea 40-R, mientras que la línea WT se observa el efecto citopático **Figura 42b**.

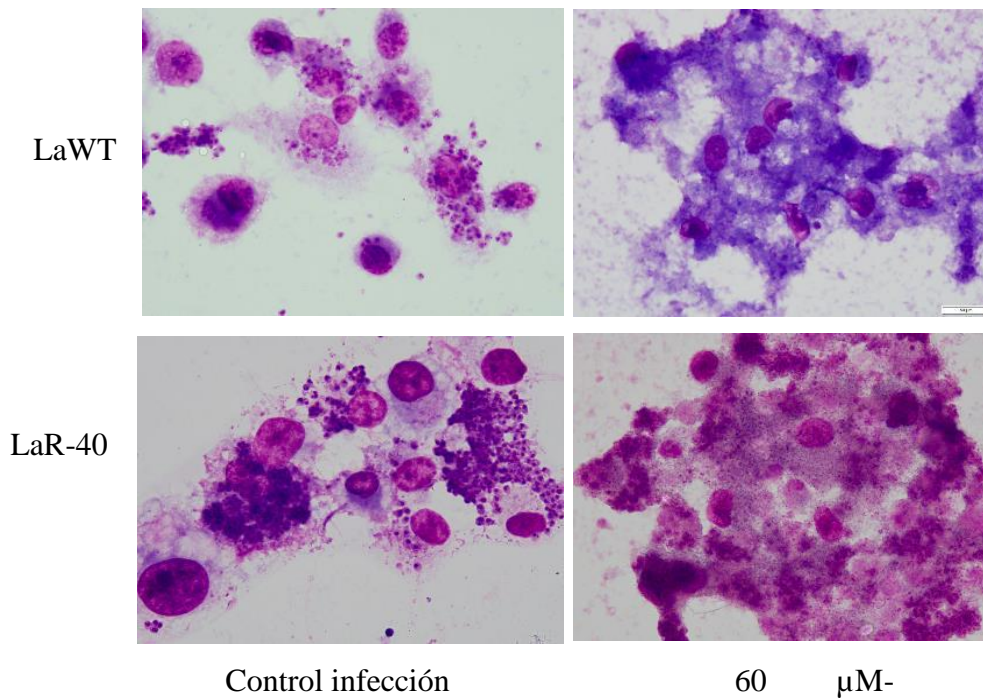
Tabla 17 Potencia de la MTF en cepas de *L. amazonensis* de tipo salvaje (WT) y resistentes (R).

Parásitos	Cepa	μM ± DS		
		CI ₅₀	CI ₉₀	IR
	WT	6,31±3,4	13,18±3,2	-
Con presión de MTF	17-R	27,54±0,8**	32,19±0,2	4
	40-R	30,65±9,5***	47,44±34,1	5
Promastigotes	WT	7,78±0,12	16,42±2,18	-
	40-R	48,15±2,2**	89,90±0,6	6
Sin presión de MTF (3 meses)	WT	6,77±0,47	ND	-
	40-R	54,15±1,45**	ND	8
Aislados de ratón	WT	47,0±4,4	>150	-
	40-R	112,0±21,1*	>150	2
Amastigotes axénicos	WT	10,16±4,1	41,08±6,6	-
	40-R	>41*	>41	>4
Amastigotes Intracelulares	WT	10,16±4,1	41,08±6,6	-
	40-R	>41*	>41	>4

Nota: La tabla muestra la potencia de la MTF en promastigotes (con presión y sin presión de MTF por 3 meses y de aislados de ratón), amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares en células THP-1. El índice de resistencia (IR) se calculó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados corresponden a las medias de dos o tres experimentos independientes, y la desviación estándar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. CI_{50/90}: concentración inhibitoria 50 y 90; DS: desviación estándar, ND: no determinado.

Figura 42 Ensayos de susceptibilidad a la MTF *in vitro*.

Microfotografías de la actividad de la MTF en amastigotes intracelulares

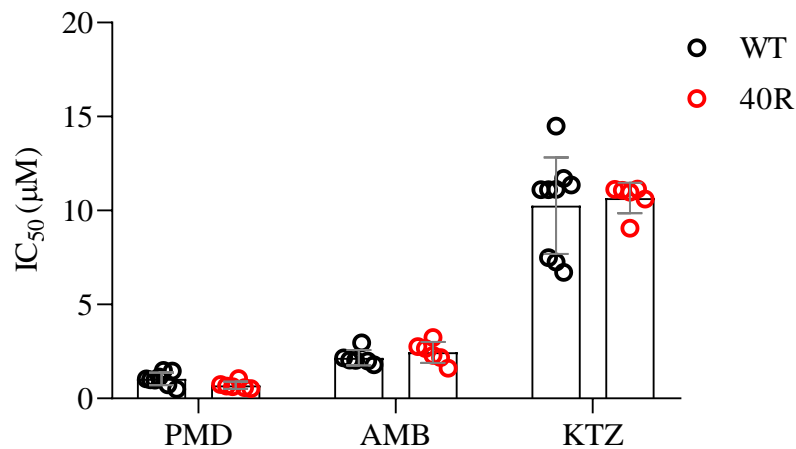


Nota: (a) concentraciones inhibitorias 50 de las líneas WT y resistentes 40-R, en promastigotes, amastigotes axénicos e intracelulares. (b) Células THP-1 infectadas con amastigotes y tratadas a una máxima concentración de 60 µM, donde se observa la persistencia de la infección y toxicidad celular en la cepa 40-R. las microfotografías representativas de células infectadas con *L. amazonensis* y tratadas con o sin MTF coloreadas con Giemsa (aumentos: 1000x).

4.1.1 Resistencia cruzada

Con relación a la resistencia cruzada a la PMD, AmB y al KTZ en promastigotes de la cepa WT o la cepa 40-R, no se encontraron diferencias significativas en los valores de CI_{50} para los tres fármacos ($p > 0,05$) entre WT y 40-R, mostrando IR entre 0,7 a 1,1. La susceptibilidad de la cepa WT fue de CI_{50} $1,04 \pm 0,3$, $2,16 \pm 0,4$ y $10,26 \pm 2,6$ μM , y de la cepa 40-R fue de CI_{50} de $0,69 \pm 0,2$, $2,45 \pm 0,6$ y $10,66 \pm 0,81$ a PMD, AmB y KTZ respectivamente (**Figura 42**).

Figura 43 Potencia (CI_{50}) de pentamidina (PMD), anfotericina B (AmB), ketoconazol (KTZ) en promastigotes de la cepa WT y la 40-R.



Nota: No se observaron diferencias significativas entre la cepa WT y la cepa 40-R ($p > 0,05$).

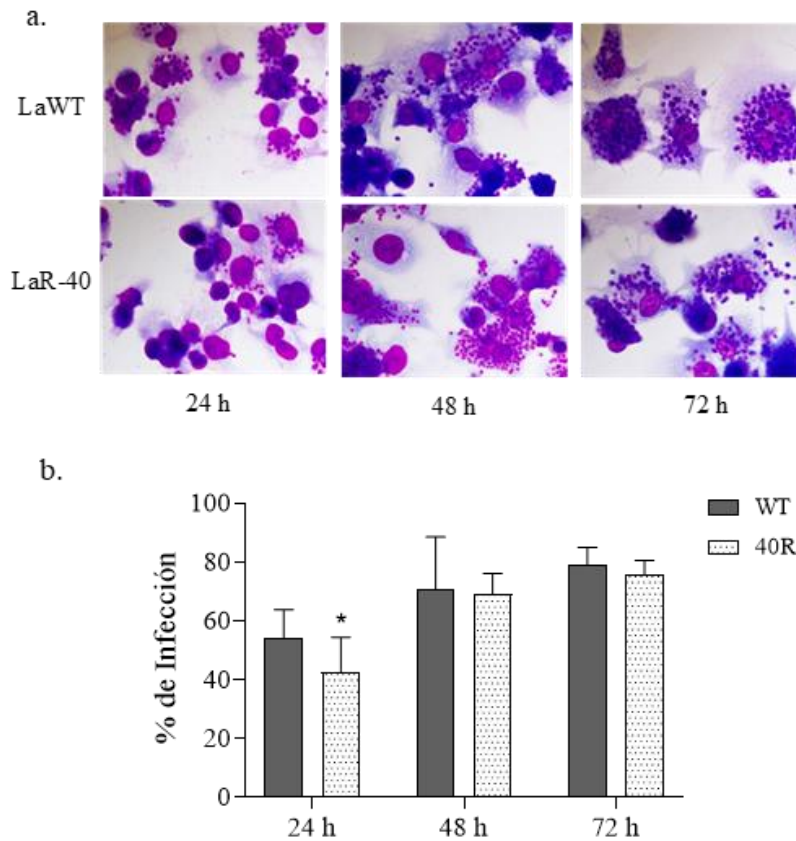
4.3.3 Estabilidad de la resistencia

Después de la generación de la R-MTF de la cepa 40-R (según los valores de CI_{50}), la presión del fármaco fue retirada del medio de cultivo durante 3 meses. Se encontró que los valores de CI_{50} se mantenían en los promastigotes obteniendo IR de 6 (**Tabla 17** promastigotes con presión

de MTF). Igualmente, los promastigotes aislados de lesiones de LC inducidas por la cepa 40-R mostraron IR de 8 (**Tabla 17** promastigotes aislados de ratones). Estos resultados indican que la R-MTF se mantuvo estable en las dos condiciones utilizadas *sin fármaco y post infección en animales). Los valores de CI_{50} se observan en la **Tabla 17**.

4.3.4 Infección en células THP-1

Los promastigotes en fase estacionaria de las cepas WT y la cepa 40-R infectaron las células THP-1 transformadas en todos los tiempos evaluados (**Figura 44a**). Al comparar los porcentajes de infección de la cepa WT versus la cepa 40-R se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con valores de $54,38 \pm 9,4\%$ vs $42,33 \pm 12,1\%$ a las 24 h. Sin embargo, se observaron valores similares a las 48 h y a las 72 h con valores de $70,94 \pm 17,5$ versus $69,16 \pm 6,9\%$ y de $79,11 \pm 5,9$ versus $75,55 \pm 4,9\%$, respectivamente (**Figura 44b**).

Figura 44 Infectividad de los parásitos WT y R-40 en células THP-1.

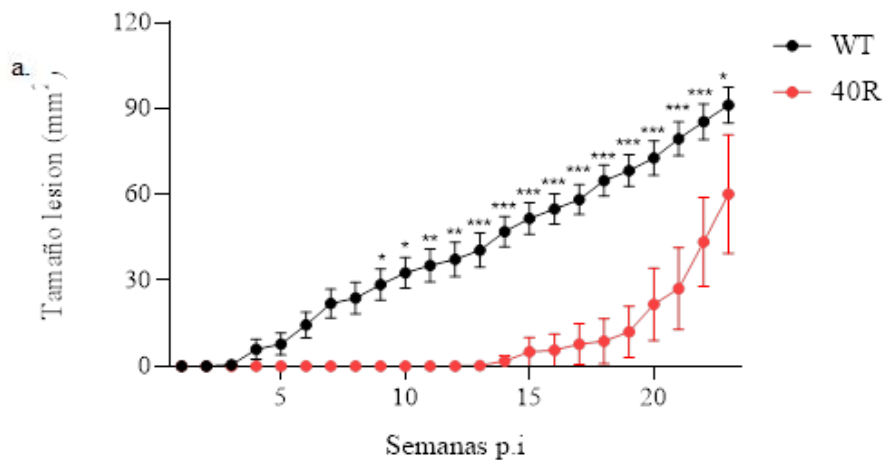
Nota: (a) microfotografías de láminas coloreadas con Giemsa de las células THP-1 conteniendo amastigotes después de la infección con la cepa WT y la cepa 40-R (aumentos: 1000x). (b) Porcentajes de infección de las cepas WT y cepa 40-R. El tiempo de infección fue de 24, 48 y 72 h, a 32°C. Los resultados corresponden a las medias de tres experimentos independientes, se muestra la desviación estándar (* $p < 0,05$).

4.3.5 Infección en ratones BALB/c

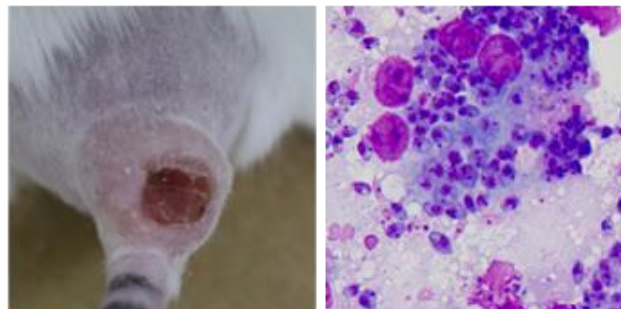
El 100% (4/4 ratones) de los ratones infectados con promastigotes de la cepa 40-R indujeron lesiones de LC. Durante 23 semanas de seguimiento, la aparición de la primera lesión

(como una pequeña pápula) se produjo en el sitio de la infección entre las semanas 13 y 15 post infección (p.i), las cuales se ulceraron en el 75% (3/4 ratones) en las semanas 18 y 20. Las lesiones de la cepa WT aparecieron entre las 3 y 4 semanas p.i. El tamaño de las lesiones inducidas por la cepa 40-R fueron menores con diferencias significativas ($p < 0,05$) con la cepa WT desde la semana 9 p.i (**Figura 45a**). La velocidad de crecimiento de las lesiones 40-R fue menor ($0,24 \text{ mm}^2/\text{día}$) en comparación con la velocidad de crecimiento de las lesiones producidas por la cepa WT ($0,59 \text{ mm}^2/\text{día}$). Todos los ratones infectados mostraron abundantes (++++) amastigotes intra y extracelulares en improntas de las lesiones (**Figura 45b**).

Figura 45 Evolución de las lesiones producidas en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* cepa WT y cepa 40-R.



b.

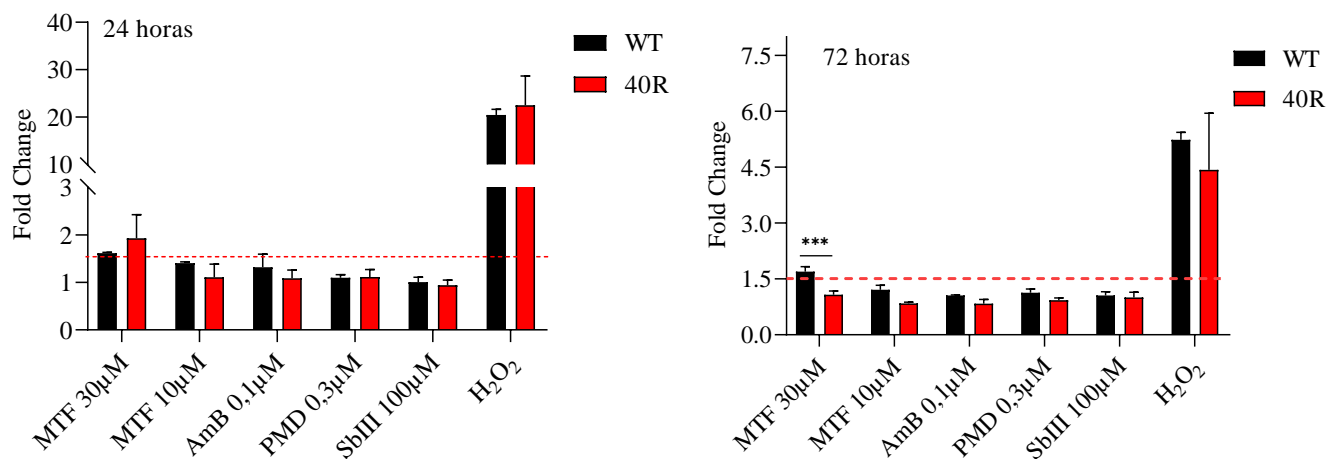


Nota: (a) Área (mm^2) de las lesiones. (b) Fotografía representativa de lesión en animales y microfotografía (aumento 1000x) de improntas de la lesión con amastigotes de los ratones con LC infectados con la cepa 40-R. Los tamaños de las lesiones entre la cepa WT y la cepa R-40 se compararon utilizando la comparación múltiple Sidak's *Diferencias significativas $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$.

4.3.6 Generación de ROS

Los parásitos de la cepa WT incubados por 72 h con $30 \mu\text{M}$ de MTF mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con respecto a la cepa 40-R la cual mostró una disminución en la intensidad de ROS de 1,6 vs 1,1, respectivamente. Por el contrario, los niveles de ROS en presencia de otros fármacos (AmB, PMD, Sb^{III}) entre la cepa WT y la cepa 40-R fueron similares en los tiempos evaluados. El control positivo H_2O_2 fue incubado por 2 h, no se observaron diferencias en la generación de ROS entre la línea WT y la resistente 40-R (**Figura 46**).

Figura 46 Producción de radicales ROS en cepas de *L. amazonensis* WT y resistentes a MTF



Nota: Promastigotes WT y 40R fueron expuestos a MTF 30 μ M y 10 μ M, AmB 0,1 μ M, PMD 0,3 μ M y SbIII durante 24 h (a) y 72 h (b). Los datos son los valores de media \pm desviación estándar (DE) de dos experimentos independientes. Las diferencias significativas entre las líneas WT vs 40-R se determinaron mediante la prueba t de Student (***, $P < 0,001$).

4.3.7 *Expresión de marcadores de resistencia*

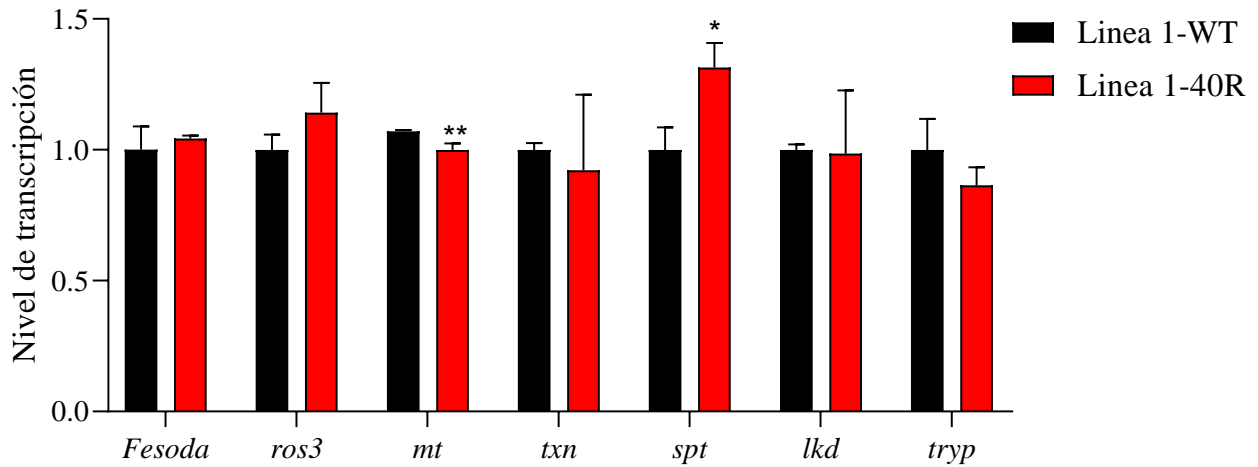
Los ensayos se realizaron en dos líneas de parásitos. La línea 1 donde las R-40 fueron mantenidas por 12 meses con presión de MTF y la línea 2 donde la cepa R-40 fue mantenida por 6 meses con presión de MTF. En cada línea la cepa WT fue mantenida por 6 o 12 meses con medio sin fármaco.

En la línea 1, la cepa 40-R mostró que los niveles de transcripción para *txn*, *lkd*, *mt* y *tryp* fueron 7,7, 1,39, 7,06 y 13,53% más bajos que la cepa WT, mientras que los niveles de transcripción para *Fesoda*, *ros3*, y *spt* fueron un 4,24, 14,19 y 31,48 % más altos que la línea 2 cepa WT, respectivamente.

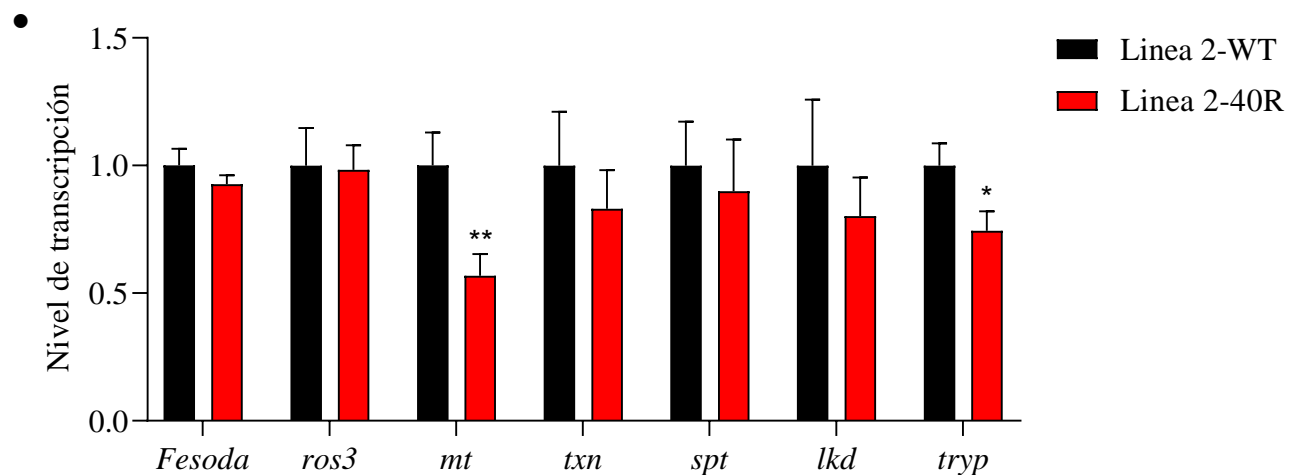
En la línea 2, la cepa 40-R mostró que los niveles de transcripción para *Fesoda*, *ros3*, *mt*, *txn*, *spt*, *lkd* y *tryp* fueron 7,43, 1,63, 43,23, 16,96, 10,06, 19,84 y 25,60% más bajos que la línea 2 cepa WT, respectivamente. Diferencias estadísticamente significativas se observaron en el nivel de transcripción de *mt* ($p = 0,0086$) y *spt* ($p = 0,0125$) en la línea 1 y en *mt* ($p = 0,0085$) y *tryp* ($p = 0,0187$) en la línea 2 (**Figura 47**).

Figura 47 Niveles de transcripción de los genes *fesoda*, *ros3*, *mt*, *txn*, *spt*, *lkd* y *tryp*

Línea 1: donde la cepa 40-R fue mantenido por 12 meses



Línea 2: donde la cepa 40-R fue mantenido por 6 meses



Nota: Los genes ADN polimerasa I (*dnapoll1*) y la proteína de unión a TATA (*tbp*) fueron utilizados como genes normalizador constitutivo y el cambio de veces de la expresión se calculó mediante el $2^{-\Delta\Delta}$ Método. Los niveles de transcripción de proteínas se evaluaron mediante RT-qPCR la cepa WT y cepa 40-R línea 1 (a) y 2 (b). Superóxido dismutasa de hierro (*Fesoda*), gen de la proteína Ros3 (*ros3*), transportador de MTF (*mt*), triparedoxina peroxidasa (*txn*), serina C-palmitoiltransferasa (*spt*), proteína quinasa de cuerpos lipídicos (*lkd*) y tripanotion reductasa (*tryp*).

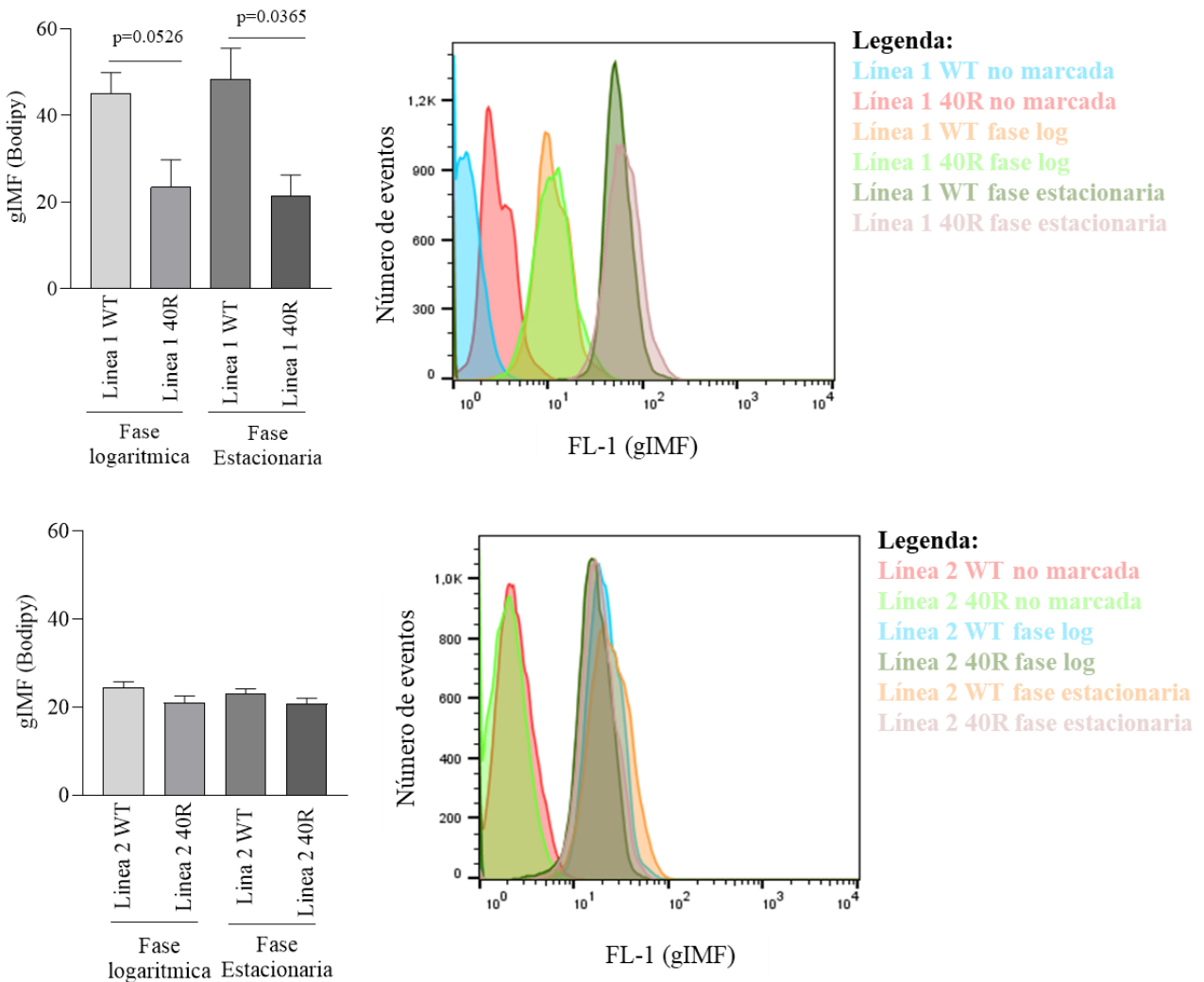
Se utilizó la prueba t Student diferencias significativas en relación con la cepa WT (*p <0,05; ** p < 0,01).

4.3.8 Cuantificación de cuerpos lipídicos (DL)

Los ensayos se realizaron en dos líneas de parásitos. La línea 1 donde las R-40 fueron mantenidas por 12 meses con presión de MTF y la línea 2 donde la cepa R-40 fue mantenida por 6 meses con presión de MTF. En cada línea la cepa WT fue mantenida por 6 o 12 meses con presión de MTF.

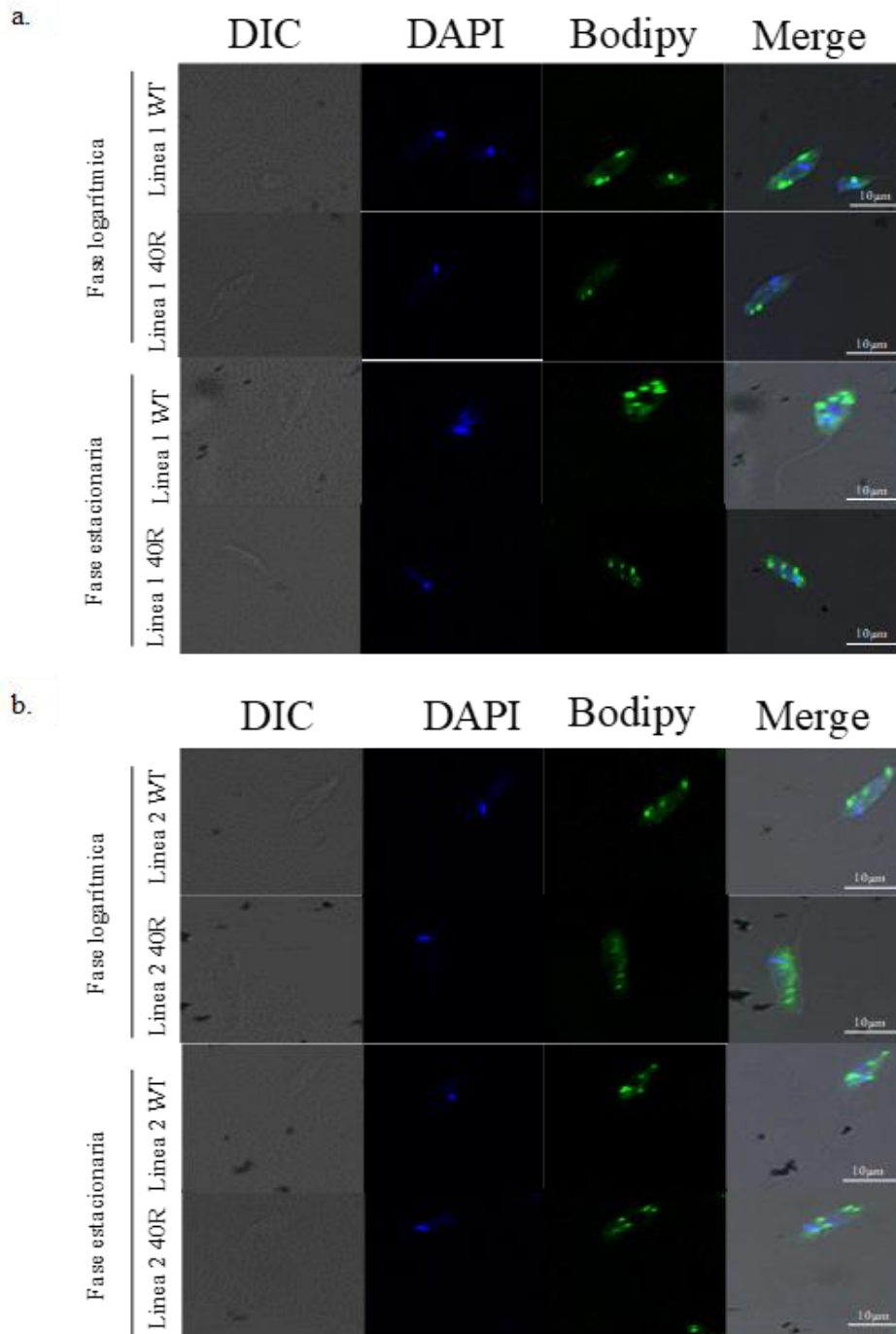
Los promastigotes de la Línea 1 cepa WT y cepa 40-R mostraron diferencias (p<0,05) en la cantidad de cuerpos lípidos en la fase de crecimiento logarítmica (44,58±1,19 vs 24,23±1,7) y fase estacionaria (47,31± 1,2 vs 20.0±1,5) (**Figura 48a**). En cuanto a los promastigotes de la línea 2 cepa WT y cepa 40-R no mostraron diferencias en la cantidad de vesículas de cuerpos lipídicos en ninguna de las fases de crecimiento evaluadas, fase logarítmica (20,88±1,13 vs 24,46±1,09) y fase estacionaria (20,71±1,1 vs 23,01±1,0) (**Figura 48b**).

Sobre la visualización de los DL, se observó en la línea 1 una disminución de la cantidad y tamaño de DL en 40-R comparado con las DL observados en la cepa WT (corpúsculos de mayor tamaño e intensidad (**Figura 49a**) en las fases de crecimiento logarítmico y estacionario. En la línea 2, no se observó cambios en los DL (**Figura 49b**) en ninguna de las fases de crecimiento.

Figura 48 Cuantificación de DL en *L. amazonensis* parásitos WT y resistentes 40R.

Nota: la figura muestra en el gráfico de barras (izquierda) e histograma los valores de intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de la línea 1(a) y la línea 2 (b) en las fases de crecimiento logarítmica y estacionaria. Se utilizó una prueba *t de student* para comparar los parásitos WT y 40R. Se consideraron diferencias estadísticas cuando $p < 0,05$.

Figura 49 LD en *L. amazonensis* línea 1 y 2, parásitos WT y 40R a través de fluorescencia corporal



Nota: Imágenes representativas mediante microscopía confocal de cuerpos lipídicos de la línea 1 (a) y línea 2(b) en fase de crecimiento logarítmica y fase estacionaria.

4.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión integral sobre los mecanismos biológicos y moleculares que subyacen a la resistencia a la MTF en *L. amazonensis*. A través de la generación y caracterización de cepas R-MTF bajo presión selectiva del fármaco, se ha logrado identificar no solo la estabilidad de la resistencia en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*, sino también la ausencia de resistencia cruzada con otros fármacos *antileishmania*. Estos hallazgos son especialmente relevantes en el contexto del creciente número de FT reportados con la MTF, resaltando la importancia de un monitoreo continuo y de estrategias terapéuticas alternativas para el manejo de la leishmaniasis. La capacidad del parásito para mantener su resistencia incluso en ausencia de presión del fármaco destaca la necesidad de profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados, los cuales podrían ser clave para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas más efectivas.

En el presente estudio, se evidenció que los promastigotes de *L. amazonensis* disminuyen la susceptibilidad a la MTF progresivamente y en un período relativamente corto, específicamente en 8 semanas. Este fenómeno se caracterizó por un incremento gradual en los índices de resistencia, alcanzando un valor significativo de IR: 6. Las cepas resistentes fueron generadas hasta una concentración máxima de 40 μM de MTF, este límite se asoció con el alcance de la concentración micelar crítica del fármaco, que desencadena una degradación de la membrana celular de los parásitos debido al efecto surfactante de la MTF a concentraciones superiores a 50 μM , tal como se ha documentado en investigaciones anteriores (Seifert et al., 2003; Wieder et al., 1999). Al contrastar con estudios realizados en otras especies de *Leishmania* se observan algunas diferencias en los tiempos de generación y en los IR. En el caso de *L. donovani* y *L. infantum* la generación de cepas resistentes a la MTF demandó un período más extenso, específicamente 24

semanas, mostrando un IR de 15 y 3,4, respectivamente (Seifert et al., 2003; Saboia-Vahia et al., 2022). Para *L. major*, se extendió aún más el periodo, alcanzando los 11 meses, con IR de 17,1 y 7,1 en dos clonas diferentes (Turner et al., 2015). Estas diferencias podrían reflejar las diferencias de susceptibilidad a la MTF demostrada en diferentes especies de *Leishmania* resaltando la importancia de abordajes personalizados en el tratamiento de la leishmaniasis. Un hallazgo importante fue la estabilidad de las cepas resistentes las cuales mantuvieron su fenotipo de resistencia incluso después de la eliminación de la presión del fármaco. Esto implica una adaptación genética robusta y duradera, sugiriendo la resistencia adquirida a la MTF en *Leishmania* es un cambio persistente y posiblemente irreversible. Otros estudios también han reportado estabilidad en la resistencia a MTF después del cultivo en medio libre del fármaco (Seifert et al., 2003).

Se ha establecido que la resistencia a la MTF puede inducirse con facilidad en los promastigotes. Sin embargo, dado que los amastigotes intracelulares son los que están expuestos al fármaco en el huésped, y por ende son los que deben adaptarse a concentraciones crecientes del mismo, si quieren sobrevivir, se han establecido protocolos de generación de resistentes a partir de amastigotes (Vermeersch et al. 2009, Hendrickx et al. 2014). Estos protocolos han sido realizados en *L. donovani* y *L. infantum* basándose principalmente en la exposición de amastigotes intracelulares a concentraciones crecientes de MTF, con el objetivo de seleccionar y aislar aquellas subpoblaciones que desarrollan resistencia (Hendrickx et al. 2012). Sin embargo, no fue posible determinar la eficacia del fármaco en amastigotes intracelulares en preparaciones con Giemsa (Hendrickx et al. 2014). En nuestro trabajo no se generaron cepas resistentes a MTF a partir de amastigotes. Sin embargo, realizamos experimentos orientados a determinar la eficacia de la MTF en amastigotes intracelulares en células THP-1 con el fin de determinar si la resistencia se

mantenía. Los parásitos resistentes infectaron las células THP-1. Si bien no fue posible determinar la CI_{50} debido a la citotoxicidad de la MTF en estas células, dado a el bajo índice terapéutico *in vitro* del fármaco, a pesar de que las células se lisaban, observamos microscópicamente que los amastigotes de la cepa resistente conservaban su morfología, comparados con los amastigotes de la WT que eran destruidos en similares concentraciones de MTF. Esto sugiere la estabilidad de la resistencia a la MTF en los amastigotes, la cual se mantiene aún en ambientes extremos como la de los fagolisosomas de los macrófagos infectados. Se ha reportado que el fenotipo de resistencia a fármacos como KTZ y PMD en algunas especies de *Leishmania* se mantiene en amastigotes intracelulares (IR=2,4), mientras que en amastigotes axénicos el fenotipo tiende a revertirse cuando la presión del fármaco desaparece (Salazar et al., 2021). Algunos mecanismos de las células huésped pueden modular los niveles de resistencia tanto en parásitos intracelulares susceptibles como en los resistentes, tales como la regulación de pH intracelular, producción de ROS y RNS, modulación de la expresión génica del huésped y la modificación del entorno vacuolar (Vermeulen et al., 2007; Mukherjee et al., 2014; Gregory et al, 2008; Andrade et al., 2005). La estabilidad de la resistencia a los fármacos entre las formas libres e intracelulares de *Leishmania* podría estar relacionado con el mecanismo de acción del fármaco, la especie de *Leishmania*, la metodología utilizada y otros factores tales como la plasticidad del genoma del parásito o los mecanismos de adaptación a los cambios externos (Hendrickx et al., 2015; Salazar et al., 2021).

Los parásitos resistentes a MTF mantuvieron la susceptibilidad a los otros fármacos estudiados, como PMD, AmB y KTZ. La no existencia de reactividad cruzada sugiere que los mecanismos de resistencia a la MTF podrían ser específicos de este fármaco. Hallazgos similares se reportaron en cepas de *L. donovani* resistentes a MTF donde no se observó resistencia cruzada

(IR: <5) a medicamentos como AmB, PMD, PAR, KTZ, Sb^{III}, Allopurinol y factores activadores de plaquetas (PAF). Sin embargo, sí se demostró resistencia cruzada con la edelfosina (ET-18-OCH₃, PM: 523,73 g/mol), presentando un IR de 13,7 y 10,6. Este compuesto es una alquilglicerofosfocolina de estructura similar a la MTF con actividad antitumoral y antileishmania (Seifer et al., 2003; Berkovic et al., 1996). Otro estudio realizado en cepas resistentes de *L. major*, no mostraron resistencia cruzada en los tratamientos con AmB, Sb^{III} y PAR, sin embargo, por lo contrario, se observó un aumento significativo en la sensibilidad del parásito al tratamiento con PMD siendo 3 veces menor que en la cepa WT (Turner et al., 2015). Adicionalmente cuando se retira la MTF, la sensibilidad del parásito a la PMD se restablece a niveles comparables con los de la WT, lo que sugiere un posible mecanismo sinérgico

Las diferencias en virulencia o en la capacidad de infectar células o hospederos del parásito son factores importantes involucradas en el FT en *Leishmania* inclusive algunas veces de mayor impacto mayor que la susceptibilidad a fármacos. Estudios de susceptibilidad a la MTF en aislados clínicos de *L. donovani*, de pacientes con FT a MTF no mostraron diferencias en la susceptibilidad a MTF. La susceptibilidad *in vitro* de los promastigotes tanto en los curados como en los que tuvieron recaídas, fue similar. Sin embargo, se notó una mayor presencia de parásitos metacíclicos en las cepas de pacientes con recaída tratados con MTF (32,97%; $n=12$) en comparación con las cepas de pacientes curados (16,24%; $n=9$). Este aumento en parásitos metacíclicos se correlacionó con un incremento significativo en la infección de los macrófagos por las cepas de pacientes con FT (74,88; $n=6$), en comparación con la de los pacientes curados (61,95; $n=3$). Un aumento en la metaciclogénesis y la infectividad han sido reportados en la resistencia a Sb^V en cepas de *L. donovanni* (Rai et al., 2013). En nuestro estudio se observó una menor infectividad de la cepa 40R en células THP-1 a las 24 h p.i, sin embargo, a las 48 y 72 h los porcentajes de infección fueron

similares a la cepa WT. Resultados similares han sido reportados en otros estudios, donde cepas de *L. donovani* MTF-R, mantenían una capacidad similar a la cepa WT para infectar macrófagos peritoneales y ratones Swiss (Hendrickx et al., 2020).

En lo que respecta a la inducción de lesiones en ratones BALB/c por la cepa 40-R, se observó que, aunque el tamaño y la velocidad de crecimiento eran menores en comparación con las cepas WT, la resistencia de los parásitos a la MTF no afectaba totalmente la virulencia *in vivo*. Resultados similares, pero más evidentes, fueron observados en cepas de *L. major* resistentes a la MTF, donde las lesiones producidas por las cepas resistentes sólo se hicieron evidentes cuatro semanas después de la infección, a diferencia de la cepa WT que ya en ese tiempo mostraba lesiones de un tamaño considerable y que además la infección resultó en lesiones necróticas demostrando que la resistencia a MTF atenuaba la infección por *L. major* (Turner et al., 2015). Resultados con cepas de parásitos resistentes a otros fármacos, mostraron por ejemplo que parásitos de *L. mexicana* resistentes a AmB mostraron un crecimiento más lento de las lesiones en comparación con la infección por parásitos WT en ratones BALB/c (Al-Mohammed et al., 2005) o contrariamente, la infección con varios aislados clínicos de *L. donovani* resistentes a Sb^V mostraron una mayor virulencia en un modelo de ratón de LV (Vanaerschot et al., 2011).

La disminución en la producción de ROS en las cepas resistentes a MTF podría representar un mecanismo adaptativo del parásito para atenuar y/o protegerse del estrés oxidativo inducido por este fármaco. En nuestro estudio, se evaluó experimentalmente la generación de ROS en parásitos 40R bajo tratamiento farmacológico, utilizando la sonda diacetato de diclorofluoresceína. Se observó que los parásitos resistentes incubados con MTF presentaron una reducción en la señal fluorescente de la sonda, indicando una menor producción de ROS en comparación con la cepa WT, variando según la concentración y el tiempo de incubación. Investigaciones en *L. donovani*

han demostrado que cepas resistentes a varios fármacos (Sb^V, PAR, MTF y Amb) tienen una mayor capacidad de defensa contra el estrés oxidativo, evidenciada por la reducción de ROS. Esto podría estar vinculado a adaptaciones metabólicas del parásito, donde se detectaron niveles elevados de triptófano y su producto de degradación, el indol acrilato que se ha asociado a propiedades antioxidantes, por consiguiente, a neutralización de radicales libres (Berg et al., 2015). Tales metabolitos se han asociado con resistencia a antibióticos en *Escherichia coli*, desencadenando una respuesta protectora contra el estrés oxidativo (Vega et al., 2012). Los hallazgos en cuanto a la producción de ROS sugieren que las líneas de *Leishmania* resistentes a medicamentos poseen mecanismos más eficientes para protegerse de los ROS, contribuyendo así a una mayor resistencia al estrés oxidativo.

Como marcadores de resistencia y posibles blancos terapéuticos han sido estudiadas genes que codifican para enzimas del sistema de defensa antioxidante en *Leishmania*, tal como el superóxido dismutasa de hierro SODA que protege a los parásitos contra los radicales superóxidos (O₂⁻), los cuales son convertidos en oxígeno (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Turrens et al., 2004). El H₂O₂ es luego metabolizado por diferentes enzimas con actividad peroxidasa, entre ellas la peroxidasa de triparedoxina (TXN). Sin embargo, en nuestro estudio en cepas 40R de *L. amazonensis*, no fueron observados cambios en la expresión de *Fesoda* y *txn* comparadas con la cepa WT. Contrario a lo demostrado en otros estudios en *L. donovanni* resistentes a la MTF, donde se observó la sobreexpresión de *Fesoda* y *txn*, además de un aumento en la actividad de enzimática comparada con aislados susceptibles (Getachew et al., 2012; Veronica et al., 2019; Kulshrestha et al., 2014). Sin embargo, un estudio en clones mutantes de *L. infantum* para *Fesoda*^{-/+}, relaciona una regulación a la baja de la expresión de la enzima y la resistencia a Sb^{III} (IR=2) y MTF (IR=2,4) comparada con la cepa WT, lo que muestra la desregulación en las vías de defensa contra el

estrés oxidativo y la capacidad del parásito de compensar la menor expresión de *Fesoda* (Santi et al., 2021). En *Leishmania*, la enzima TRYP actúa sobre la base del metabolismo de tioles, por lo cual está asociado con la acción de los antimoniales. Puede donar el electrón de NADPH al sulfuro de tripanotione T(S)₂ y reducirlo a tripanotione T(SH)₂, basándose en su propiedad enzimática (Baiocco et al., 2009). El tripanotión en estado reducido es esencial para la vida del parásito; previene la producción de estrés oxidativo en el parásito. En nuestro estudio, se observó una tendencia a la disminución de la expresión de *tryp*, sin embargo, solo en la línea 2 40-R esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En un estudio en aislados clínicos de *L. tropica* resistentes a los antimoniales en pacientes de Irán, se encontraron 9 mutaciones de aminoácidos en la región codificante para TRY, lo cual podría influir en su expresión y actividad, lo que indicaría que la alteración en la estructura genética de una enzima estaría relacionada con el desarrollo de resistencia a los fármacos (Fozongari et al., 2020).

En cuanto a proteínas constitutivas, se evaluaron los niveles de expresión de los genes *mt* y la subunidad *ros3*, que conforman el complejo transportador MT-ROS3 el cual es necesario para la rápida absorción intracelular de los fármacos alquifosfocolina. Esta absorción, depende del nivel de expresión de *mt-ros3* en la membrana plasmática del parásito. En nuestro estudio, en *L. amazonensis* se evidenció una disminución estadísticamente significativa en la expresión del gen *mt*, sin embargo, los niveles de *ros3* permanecieron similares a los de la cepa WT. Estudios en parásitos de *L. major* utilizando qRT-PCR, reportan en cepas resistentes a MTF aisladas de pacientes Iranies, una regulación a la baja (2 veces en comparación con la cepa WT) del gen *mt* (Lari et al., 2019). Otros estudios en *L. braziliensis* y *L. donovani* muestran disminución en la internalización de MTF disminuye al reducir la expresión del gen *mt* lo cual haría a los parásitos menos sensibles a la MTF (Pérez-Victoria et al., 2006; Sánchez-Cañete et al., 2009). en contraste

con los hallazgos encontrados en la sobreexpresión de estos genes aumenta la internalización de MTF en el parásito de lagarto *Leishmania tarentolae*, una especie naturalmente resistente a MTF, y aumenta su sensibilidad a MTF (Pérez-Victoria et al., 2006).

En este estudio, también se estudiaron enzimas relacionadas en procesos biosintéticos como la SPT, cuya función en *Leishmania* es catalizar el primer paso en la vía sintética *de novo* de esfingolípidos, componente de las membranas celulares (Denny et al., 2004). En nuestro estudio, se observó una sobreexpresión del gen *spt* en la línea 1-40R, la cual tiene un mayor tiempo con presión constante de MTF. Resultados similares han sido reportado, en cepas de *L. infantum* resistentes a antimoniales donde se una regulación positiva de las transcripciones 2,99 veces en comparación con la cepa WT (Andrade et al., 2020). Lo que indicaría posibles modificaciones a nivel conformacional de la membrana celular.

En los tripanosomátidos, la proteína LDK está asociada en la biogénesis de cuerpos lipídicos en los protozoos los cuales se han visto involucradas en cepas de *L. infantum* y *L. amazonensis* en la virulencia, metabolismo de eicosanoides, tráfico de lípidos, interacciones con la membrana de los orgánulos y aumento durante la muerte celular inducida por el estrés oxidativo (Tavares et al., 2022). En este estudio, los niveles de transcripción para el gen *ldk* fueron similares en la cepa 40-R y la cepa WT.

La heterogeneidad en la expresión de algunos genes en las dos líneas evaluadas de *L. amazonensis* fue observado. Sin embargo, este fenómeno de respuestas divergentes de diferentes clones ha sido reportada en *L. braziliensis* en donde los autores sugieren que el proceso de retención de la copia de genes por aneuploidía o amplificación genética ocurre de diferentes maneras entre los clones de la misma especie (Santi et al., 2020). Esta heterogeneidad es normal, ya que *Leishmania* se basa en la aneuploidía como mecanismo de adaptación (Sterkers et al., 2012).

Además, la secuenciación de parásitos individuales ha confirmado la presencia de diferentes cariotipos dentro del mismo clon de *Leishmania* (Negreira et al., 2020).

En cuanto a los cuerpos lipídicos (LD, *lipid droplet*, en inglés), nuestros resultados mostraron un aumento de los LD en los parásitos que estuvieron un mayor tiempo sometidos a presión de la MTF, lo cual indicaría posiblemente que el cambio en el perfil lipídico del parásito puede ser un mecanismo de resistencia como lo observado en cepas de *L. tropica* resistentes a los antimoniales (Gutiérrez et al., 2021). Investigaciones en *L. infantum* revelan que los LD citoplasmáticos son centros clave para la síntesis de prostaglandinas, especialmente PGF2a, la cual presenta un aumento durante la fase de promastigote metacíclico y en amastigotes, sugiriendo que el parásito moviliza maquinaria lipídica de eicosanoides en su etapa infectiva, lo que estaría actuando como factor de virulencia (Araújo-Santos et al., 2014; Vallochi et al., 2018).

4.5 Conclusiones

En este estudio se demostró que los promastigotes de *L. amazonensis* pueden desarrollar rápidamente resistencia a la MTF y mantuvieron su fenotipo resistente incluso después de retirar la presión del fármaco, lo que sugiere una adaptación duradera. Otro aspecto fue que la resistencia a la MTF no implicó resistencia cruzada con otros fármacos antileishmania convencionales, sugiriendo mecanismos específicos de resistencia a la MTF. Además, se observó una variabilidad en la infectividad de las cepas resistentes en diferentes condiciones, incluyendo una menor infectividad inicial en células THP-1, que se igualaba a la de las cepas WT a las 48 y 72 horas.

La resistencia a la MTF también se asoció con cambios en los niveles de transcripción de genes y la producción de ROS, lo que podría indicar adaptaciones metabólicas para mitigar el estrés oxidativo inducido por la MTF. Además, no se observaron cambios significativos en la

expresión de enzimas del sistema de defensa antioxidante en comparación con la cepa WT. Adicionalmente, se detectaron modificaciones en los perfiles de transcripción de genes y en el contenido de cuerpos lipídicos en las cepas resistentes, lo que podría estar relacionado con mecanismos de resistencia y virulencia. Estos resultados sugieren que el desarrollo de resistencia a la MTF en *Leishmania* es un proceso complejo que involucra cambios tanto a nivel genético como metabólico, y resalta la necesidad de un enfoque más personalizado y diversificado en el tratamiento de la leishmaniasis, teniendo en cuenta la heterogeneidad y adaptabilidad del parásito.

Referencias

Al-Mohammed, H. I., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2005). Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3274-3280. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3274-3280.2005>

Andrade, D., et al. (2005). Leishmania promastigotes induce expression of endoplasmic reticulum stress proteins in macrophages modulating host cell survival and parasite growth. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 18761-18767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410622200>

Andrade, J. M., Gonçalves, L. O., Liarte, D. B., et al. (2020). Comparative transcriptomic analysis of antimony resistant and susceptible *Leishmania infantum* lines. *Parasites & Vectors*, 13, 600. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04486-4>

Araújo-Santos, T., Rodríguez, N. E., Moura-Pontes, S., Dixt, U. G., Abánades, D. R., Bozza, P. T., Wilson, M. E., & Borges, V. M. (2014). Role of prostaglandin F₂ α production in lipid bodies from *Leishmania infantum chagasi*: insights on virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 210(12), 1951-1961. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu299>

Arevalo, J., Ramirez, L., Adui, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., et al. (2007). Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 195(12), 1846-1851. <https://doi.org/10.1086/518041>

Bagher Khadem Erfan, M., Mohebbali, M., Kazemi-Rad, E., et al. (2013). Downregulation of calcineurin gene is associated with glucantime® resistance in *Leishmania infantum*. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(3), 359-366.

Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., et al. (2009). Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8), 2603-2612.

Ben Salah, A., Ben Messaoud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Ben Alaya, N., Bettaieb, J., et al. (2013). Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, 368(6), 524-532. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202657>

Berg, M., García-Hernández, R., Cuypers, B., Vanaerschot, M., Manzano, J. I., Poveda, J. A., Ferragut, J. A., Castanys, S., Dujardin, J. C., & Gamarro, F. (2015). Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani*: metabolic and phenotypic adaptations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2242-2255. <https://doi.org/10.1128/AAC.04231-14>

Berkovic, D., Haase, D., Hiddemann, W., & Fleer, E. A. (1996). Induction of resistance in the human leukaemia cell line HL60 towards hexadecylphosphocholine and other ether phospholipid analogues. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 6, 368-375.

Brochu, C. W. J., Roy, G., Messier, N., Wang, X. Y., Saravia, N. G., & Ouellette, M. (2003). Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3073-3079.

Bryceson, A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical Medicine & International Health*, 6(12), 928-934.

Carnielli, J. B. T., Crouch, K., Forrester, S., Silva, V. C., Carvalho, S. F. G., Damasceno, J. D., et al. (2018). A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine*, 36, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.029>

Carrillo, E., & Moreno, J. (2019). Editorial: Biomarkers in Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 388. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00388>

Légaré, D., & Ouellette, M. (2014). Drug resistance in *Leishmania*. In Gotte, M., Berghuis, A., Matlashewski, G., Wainberg, M., & Sheppard, D. (Eds.), *Handbook of Antimicrobial Resistance*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0667-3_17-1

Castro, M. D. 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*.

Chakravarty, J., & Sundar, S. (2010). Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 167-176. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62887>

Choudhury, K. Z. D., Kube, M., Reinhardt, R., & Clos, J. (2008). Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *International Journal for Parasitology*, 38(12), 1411-1423.

Cojean, S., Houze, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., et al. (2012). *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 704-706. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110841>

Colotti, G., & Ilari, A. (2011). Polyamine metabolism in *Leishmania*: From arginine to trypanothione. *Amino Acids*, 40(2), 269-285.

de Souza Moreira, D., Ferreira, R. F., & Murta, S. M. (2016). Molecular characterization and functional analysis of pteridine reductase in wild-type and antimony-resistant *Leishmania* lines. *Experimental Parasitology*, 160, 60-66.

Denny, P. W., Goulding, D., Ferguson, M. A. J., & Smith, D. F. (2004). Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Molecular Microbiology*, 52(2), 313-327.

Domagalska, M. A., Barrett, M. P., & Dujardin, J. C. (2023). Drug resistance in *Leishmania*: Does it really matter? *Trends in Parasitology*, 39(4), 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.01.012>

Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576-2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>

Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N., & Ouellette, M. (2003). Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(3), 146-155.

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. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(2), 395-406. <https://doi.org/10.1093/jac/dky450>

El Fadili, K., Drummelsmith, J., Roy, G., Jardim, A., & Ouellette, M. (2009). Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Experimental Parasitology*, 123(1), 51-57.

Espada, C. R., Magalhães, R. M., Cruz, M. C., Machado, P. R., Schriefer, A., Carvalho, E. M., Hornillos, V., Alves, J. M., Cruz, A. K., Coelho, A. C., & Uliana, S. R. B. (2019). Investigation of the pathways related to intrinsic miltefosine tolerance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates reveals differences in drug uptake. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.02.005>

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/acsinfectdis.0c00857>

Fernández, O. L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodríguez, I., et al. (2014). Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2871. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871>

Fernández, O. L., Rosales-Chilama, M., Sánchez-Hidalgo, A., Gómez, P., Rebellón-Sánchez, D. E., Regli, I. B., Díaz-Varela, M., Tacchini-Cottier, F., & Saravia, N. G. (2024). Natural resistance to meglumine antimoniate is associated with treatment failure in cutaneous

leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) panamensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 18(5), e0012156. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012156>

Fozongari, F., Dalimi, A., Arab, S. S., Behmanesh, M., & Khammari, A. (2020). Trypanothione reductase gene mutations in meglumine antimoniate resistant isolates from cutaneous leishmaniasis patients using molecular dynamics method. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(4), 511-520. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i4.4856>

Gamarro, F., Sánchez-Cañete, M. P., & Castanys, S. (2013). Mechanisms of miltefosine resistance in *Leishmania*. In A. Ponte-Sucre, E. Diaz, & M. Padrón-Nieves (Eds.), *Drug resistance in Leishmania parasites* (pp. 377-389). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_17

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>

Genest, P. A., Haimeur, A., Legare, D., et al. (2008). A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158(1), 95-99.

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>

Getachew, F., & Gedamu, L. (2012). *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is important for anti-oxidant defense and survival in the mammalian host. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42396-42411.

Gregory, D. J., Godbout, M., Contreras, I., Forget, G., & Olivier, M. (2008). A novel form of NF-kappaB is induced in *Leishmania donovani*-infected macrophages and is associated with altered expression of macrophage genes. *Cellular Microbiology*, 10(6), 1121-1135. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01113.x>

Gutierrez Guarnizo, S. A., Tikhonova, E. B., Zabet-Moghaddam, M., Zhang, K., Muskus, C., Karamyshev, A. L., & Karamysheva, Z. N. (2021). Drug-induced lipid remodeling in *Leishmania* parasites. *Microorganisms*, 9(4), 790. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040790>

Hajjarian, H., Kazemi-Rad, E., Mohebbi, M., et al. (2016). Expression analysis of activated protein kinase C gene (LACK1) in antimony sensitive and resistant *Leishmania tropica* clinical isolates using real-time RT-PCR. *International Journal of Dermatology*, 55(9), 1020-1026.

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>

Hendrickx, S., Mondelaers, A., Eberhardt, E., Lachaud, L., Delputte, P., Cos, P., & Maes, L. (2015). Intracellular amastigote replication may not be required for successful in vitro selection of miltefosine resistance in *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*, 114(7), 2561-2565. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4460-9>

Hendrickx, S., Van Bockstal, L., Bulté, D., et al. (2020). Phenotypic adaptations of *Leishmania donovani* to recurrent miltefosine exposure and impact on sand fly infection. *Parasites & Vectors*, 13, 96. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3972-z>

Jeddi, F., Mary, C., Aoun, K., et al. (2014). Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4866-4874.

Jeddi, F., Piarroux, R., & Mary, C. (2011). Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. *Journal of Tropical Medicine*, 2011, 695382. <https://doi.org/10.1155/2011/695382>

Kazemi-Rad, E., Mohebbali, M., Khadem-Erfan, M. B., et al. (2013). Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. *Experimental Parasitology*, 135(2), 344-349.

Kulshrestha, A., Sharma, V., Singh, R., et al. (2014). Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. *Parasitology Research*, 113, 1171-1184. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3755-6>

Lari, N., Jalal, R., Minuchehr, Z., et al. (2019). Identifying miltefosine-resistant key genes in protein-protein interactions network and experimental verification in Iranian *Leishmania major*. *Molecular Biology Reports*, 46, 5371-5388. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04992-4>

Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y. D., Rosen, B. P., Haimeur, A., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2001). The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter involved in metal resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26301-26307.

Luque-Ortega, J. R., & Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1327-1332. <https://doi.org/10.1128/AAC.01415-06>

Mandal, G., Mandal, S., Sharma, M., et al. (2015). Species-specific antimonial sensitivity in *Leishmania* is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), e0003500. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003500>

Mbongo, N., Loiseau, P. M., Billion, M. A., & Robert-Gero, M. (1998). Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 352-357.

Mendoza-León, A., Serrano, G., & Ponte-Sucre, A. (2023). Challenges in drug discovery and description targeting *Leishmania* spp.: enzymes, structural proteins, and transporters. *Frontiers in Tropical Diseases*, 4, 1241044. <https://doi.org/10.3389/fitd.2023.1241044>

Mittal, M. K., Rai, S., Ashutosh, Ravinder, Gupta, S., Sundar, S., & Goyal, N. (2007). Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), 681-688.

Mondelaers, A., Sanchez-Cañete, M. P., Hendrickx, S., Eberhardt, E., Garcia-Hernandez, R., et al. (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>

Motta, J. O., & Sampaio, R. N. (2012). A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(3), 331-335. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04070.x>

Mukherjee, S., & Das, M. (2014). Role of host ROS in influencing *Leishmania* infection outcome: A perspective on the diverse roles of oxidative agents in host immune response.

International Journal of Microbiology, 2014, 537263. <https://doi.org/10.1155/2014/537263>

Negreira, G. H., Monsieurs, P., Imamura, H., Maes, I., Kuk, N., Yagoubat, A., et al. (2020). Exploring the evolution and adaptive role of mosaic aneuploidy in a clonal *Leishmania donovani* population using high throughput single cell genome sequencing. *bioRxiv*.

<https://doi.org/10.1101/2020.03.05.976233>

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1634-1641. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz049>

Obonaga, R., Fernández, O. L., Valderrama, L., Rubiano, L. C., Castro, M. del M., Barrera, M. C., et al. (2014). Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 144-152. <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>

Organización Mundial de la Salud. (2023). Antimicrobial resistance. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Opperdoes, F. R., & Coombs, G. H. (2007). Metabolism of *Leishmania*: Proven and predicted. *Trends in Parasitology*, 23(4), 149-158.

Pedras, M. J., Carvalho, J. P., Silva, R. E. D., Ramalho, D. B., Senna, M. C. R., Moreira, H. S. A., Martinho, L. Z. M., Rabello, A., & Cota, G. (2018). Mucosal leishmaniasis: The experience of a Brazilian referral center. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(3), 318-323. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0478-2017>

Perez-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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49965-49971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306785200>

Perez-Victoria, F. J., Sanchez-Cañete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., & Castanys, S., et al. (2006). Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resistance Updates*, 9(1-2), 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.07.001>

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>

Rai, K., Cuypers, B., Bhattarai, N. R., Uranw, S., Berg, M., Ostyn, B., Dujardin, J. C., Rijal, S., & Vanaerschot, M. (2013). Relapse after treatment with miltefosine for visceral leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting *Leishmania donovani* strain. *mBio*, 4(5), e00611-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00611-13>

Rai, S., Bhaskar, Goel, S. K., Nath Dwivedi, U., Sundar, S., et al. (2013). Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. *PLOS ONE*, 8(9), e74862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074862>

Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P., & Loiseau, P. M. (2007). Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1425-1430. <https://doi.org/10.1128/AAC.01415-06>

Ribeiro, J. M., Silva, P. A., Costa-Silva, H. M., Santi, A. M. M., & Murta, S. M. F. (2024). Deletion of the lipid droplet protein kinase gene affects lipid droplets biogenesis, parasite infectivity, and resistance to trivalent antimony in *Leishmania infantum*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 18(1), e0011880. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011880>

Richard, D., Leprohon, P., Drummelsmith, J., & Ouellette, M. (2004). Growth phase regulation of the main folate transporter of *Leishmania infantum* and its role in methotrexate resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54494-54501.

Rijal, S., Ostyn, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T. P., Beijnen, J. H., Vanaerschot, M., Decuypere, S., Dhakal, S. S., Das, M. L., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M., & Dujardin, J. C. (2013). Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, 56(11), 1530-1538. <https://doi.org/10.1093/cid/cit102>

Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M. X., Ouellette, M., & Saravia, N. G. (2006). Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 193(10), 1375-1383. <https://doi.org/10.1086/503371>

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), 10. <https://doi.org/10.3390/proteomes10020010>

Salari, S., Bamorovat, M., Sharifi, I., & Almani, P. G. N. (2022). Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(8), e24599. <https://doi.org/10.1002/jcla.24599>

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>

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>

Santi, A. M. M., Silva, P. A., Santos, I. F. M., & Murta, S. M. F. (2021). Downregulation of FeSOD-A expression in *Leishmania infantum* alters trivalent antimony and miltefosine susceptibility. *Parasites & Vectors*, 14(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04838-8>

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, 826287. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.826287>

Seifert, K., Matu, S., Pérez-Victoria, F. J., 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>

Shaked-Mishan, P., Suter-Grotemeyer, M., Yoel-Almagor, T., Holland, N., Zilberstein, D., & Rentsch, D. (2006). A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Molecular Microbiology*, *60*(1), 30-38.

Sosa, N., Pascale, J. M., Jiménez, A. I., Norwood, J. A., Kreishman-Detrick, M., Weina, P. J., et al. (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(5), e0007253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007253>

Soto, J., Soto, P., Ajata, A., Luque, C., Tintaya, C., Paz, D., et al. (2019). Topical 15% paromomycin-aquaphilic for Bolivian *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis: A randomized, placebo-controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, *68*(5), 844-849. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy619>

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>

Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P., & Pagès, M. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: Mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Molecular Microbiology*, *86*, 15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08188.x>

Suman, S. S., Equbal, A., Zaidi, A., et al. (2016). Up-regulation of cytosolic trypanothione in Amp B resistant isolates of *Leishmania donovani* and its interaction with cytosolic trypanothione peroxidase. *Biochimie*, *121*, 312-325. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.12.010>

Sundar, S., & Chakravarty, J. (2013). Leishmaniasis: An update of current pharmacotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *14*(1), 53-63. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.755515>

Sundar, S., & Murray, H. W. (2005). Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(5), 394-395.

Tavares, V. S., de Castro, M. V., Souza, R. D. S. O., Gonçalves, I. K. A., Lima, J. B., Borges, V. M., & Araújo-Santos, T. (2022). Lipid droplets of protozoan parasites: survival and pathogenicity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116, e210270. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210270>

Tessarollo, N. G., Andrade, J. M., Moreira, D. S., & Murta, S. M. (2015). Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasitology International*, 64(2), 125-129.

Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2011). Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 179-193. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552910>

Torres, D. C., Ribeiro-Alves, M., Romero, G. A., Davila, A. M., & Cupolillo, E. (2013). Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 126(2), 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.02.013>

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>

Turrens, J. F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: A target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.021>

Vallochi, A. L., Teixeira, L., Oliveira, K. D. S., Maya-Monteiro, C. M., & Bozza, P. T. (2018). Lipid droplet, a key player in host-parasite interactions. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01022>

Vanaerschot, M., De Doncker, S., Rijal, S., Maes, L., Dujardin, J. C., & Decuypere, S. (2011). Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased in vivo parasite burden. *PLOS ONE*, *6*(8), e23120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023120>

Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, *8*(5), 431-433. <https://doi.org/10.1038/nchembio.915>

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.M600249-MCP200>

Vermeersch, M., Inocencio da Luz, R. A., Tote, K., Timmermans, J. P., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(9), 3855-3859. <https://doi.org/10.1128/AAC.00345-09>

Vermeulen, C. E., García-Hernández, R., Castanys, S., & Gamarro, F. (2007). *Leishmania donovani* multidrug-resistant ABC transporters are involved in intracellular pH regulation, controlling the activity of antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(6), 2163-2170. <https://doi.org/10.1128/AAC.01369-06>

Veronica, J., Chandrasekaran, S., Dayakar, A., Devender, M., Prajapati, V. K., Sundar, S., et al. (2019). Iron superoxide dismutase contributes to miltefosine resistance in *Leishmania donovani*. *FEBS Journal*, 286(17), 3488-3503. <https://doi.org/10.1111/febs.14923>

Welchman, R. L., Gordon, C., & Mayer, R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(8), 599-613. <https://doi.org/10.1038/nrm1700>

Wieder, T., Reutter, W., Orfanos, C. E., & Geilen, C. C. (1999). Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Progress in Lipid Research*, 38(3), 249-259. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(99\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(99)00004-1)

Wijnant, G. J., Dumetz, F., Dirx, L., Bulté, D., Cuypers, B., Van Bocxlaer, K., & Hendrickx, S. (2022). Tackling drug resistance and other causes of treatment failure in leishmaniasis. *Frontiers in Tropical Diseases*, 3, 837460. <https://doi.org/10.3389/fitd.2022.837460>

Zheng, Z., Chen, J., Ma, G., Satoskar, A. R., & Li, J. (2020). Integrative genomic, proteomic and phenotypic studies of *Leishmania donovani* strains revealed genetic features associated with virulence and antimony-resistance. *Parasites & Vectors*, 13(1), 510. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04397-4>

Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B. P., & Mukhopadhyay, R. (2004). *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37445-37451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405899200>

5. Conclusiones Generales

Las conclusiones derivadas del primer capítulo de esta tesis abordan la caracterización fisicoquímica, estructural y funcional del hidrogel de MTF desarrollado para el tratamiento tópico de la LC demostró que es una formulación estable, biocompatible y eficaz. Los hidrogeles, especialmente el de 0,5% MTF, mostraron estabilidad física y química durante al menos 8 meses, manteniendo su color, consistencia y pH a diferentes temperaturas (4, 25 y 32 °C) lo que es particularmente relevante para su aplicación en áreas tropicales y regiones pobres donde la LC es endémica y los sistemas de refrigeración pueden ser limitados o inexistentes. La estructura porosa homogénea, lo que es crucial para la administración eficiente de fármacos. Las propiedades reológicas mostraron un comportamiento pseudoplástico, con disminución de la viscosidad al aumentar la velocidad de corte, haciendo los hidrogeles aptos para aplicación tópica, mientras que el hidrogel de 0,5% MTF mostró una consistencia adecuada para formulaciones de liberación controlada. Además, se observó que la liberación de compuestos, como la cafeína utilizada como modelo, disminuye con el aumento de la concentración de carbopol, lo que resalta la importancia de ajustar la formulación según las necesidades terapéuticas. El hidrogel de 0,5% MTF mejoró significativamente la permeación cutánea, lo que sugiere un alto potencial PPP en el tratamiento de enfermedades cutáneas, aun mejor que DMSO al 10%. La actividad anti-*Leishmania* del hidrogel fue significativa contra *L. amazonensis*, con valores adecuados para su uso en terapias tópicas, permitiendo concentrar el fármaco directamente en las lesiones y reducir los efectos sistémicos adversos asociados con su administración oral. Al Además, los ensayos de irritación cutánea confirmaron la seguridad del hidrogel de 0,5% MTF, sin efectos adversos significativos, lo que lo posiciona como una opción prometedora para el manejo tópico de la leishmaniasis cutánea. Dado lo anterior, este trabajo demuestra que las formulaciones tópicas tipo hidrogeles de

MTF ofrecen un gran potencial como sistemas de liberación de fármacos, destacándose por su estabilidad, permeabilidad cutánea mejorada y eficacia anti-*Leishmania*, lo que podría ofrecer una alternativa terapéutica más segura y efectiva frente a los tratamientos convencionales.

En el segundo capítulo, se estandarizó un modelo experimental reproducible en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*, lo cual es fundamental para garantizar la consistencia de los estudios preclínicos y evaluar de manera fiable tanto el tamaño de las lesiones como la carga parasitaria. Tener un modelo murino reproducible permite obtener resultados consistentes, comparables y extrapolables a diferentes ensayos, lo que es clave para avanzar en el desarrollo de tratamientos y comprender mejor la patogénesis de la enfermedad. Además, realizar un análisis dosis-respuesta en este modelo *in vivo* es esencial para determinar la potencia del fármaco, en este caso la MTF, ya que permite identificar las concentraciones más efectivas y optimizar la dosificación terapéutica, maximizando la eficacia y minimizando los efectos adversos. En el estudio, los ratones mostraron un aumento progresivo de las lesiones y formación de úlceras en la mayoría de los casos. Las formulaciones tópicas de MTF mostraron una relación dosis-respuesta significativa, con las concentraciones más altas (0,5 % y 1,5%) logrando reducciones notables en el tamaño de las lesiones y en la carga parasitaria. El tratamiento con 1,5% de MTF redujo las lesiones en un 100% después de 60 días post tratamiento, sin la presencia de amastigotes en las improntas ni biopsias, además de una disminución del 99,74% en la carga parasitaria. El análisis dosis-respuesta mostró que las concentraciones más altas fueron las más eficaces en términos de respuesta estética y parasitológica en el tratamiento tópico, siendo similar al tratamiento oral. Estos resultados refuerzan el uso de la MTF tópica como una alternativa prometedora para el tratamiento

de la LC-NM, ofreciendo un enfoque terapéutico más seguro y eficaz en poblaciones con acceso limitado a tratamientos convencionales.

En el capítulo sobre los aspectos histopatológicos, ultraestructurales e inmunológicos del tratamiento con fMTF en un modelo murino de LC por *L. amazonensis*, se concluye que el tratamiento con fMTF al 0,5% resultó altamente efectivo, logrando una reducción del 92,78% en el tamaño de las lesiones y del 99,99% en la carga parasitaria a los 60 días p.t, mientras que las lesiones en los ratones tratados con el vehículo sin fármaco continuaron aumentando de tamaño. A nivel histopatológico, se observaron mejoras progresivas en la epidermis y dermis, con la reversión de alteraciones severas como acantosis, espongirosis, fibrosis y necrosis, así como la desaparición de células gigantes, granulomas y amastigotes. En el análisis ultraestructural, los macrófagos infectados inicialmente presentaban vacuolas parasitóforas con amastigotes intactos, pero tras el tratamiento con fMTF, estas vacuolas estaban vacías, lo que indica la destrucción de los parásitos. Además, el tratamiento moduló a la baja el perfil de citoquinas, disminuyendo significativamente los niveles de IL-4, TNF α y VEGF, citoquinas asociadas con la inflamación y la progresión de la enfermedad. Estos cambios reflejan un efecto inmunomodulador de la MTF al aplicarlo tópicamente.

En el último capítulo de esta tesis, abarco el tema de resistencia a la MTF en *L. amazonensis* revelan que se lograron generar cepas resistentes en un corto período de 8 semanas bajo presión del fármaco, mostrando estabilidad en su fenotipo incluso sin la presencia de MTF, lo que indica una adaptación genética duradera. Los mecanismos de resistencia identificados incluyen alteraciones en la expresión de genes clave, como *ros3* y *MT*, que reducen la capacidad del parásito para absorber el fármaco. No se observó resistencia cruzada significativa con otros fármacos

antileishmania, lo que sugiere que los mecanismos de resistencia a la MTF son específicos para este compuesto. Además, las cepas resistentes mostraron una infectividad reducida en las primeras fases de la infección, aunque estas diferencias se nivelaron en etapas más avanzadas, y en modelos in vivo produjeron lesiones más pequeñas y de crecimiento más lento. Se detectó una menor producción de ROS en los parásitos resistentes, lo que podría representar un mecanismo adaptativo para evadir el estrés oxidativo inducido por la MTF. A nivel molecular, las cepas resistentes mostraron cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el transporte de MTF y la defensa antioxidante, así como una disminución en la cantidad de cuerpos lipídicos.

6. Divulgaciones

Publicaciones Científicas

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Anti-leishmanial activity of a topical miltefosine gel in experimental models of New World cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1634-1641. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz049>

Neira, L. F., Peña, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C., Escobar, P., Neira, L. F., Peña, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de leishmanial Viannia en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 51(1), 33-42. <https://doi.org/10.18273/REVSAL.V51N1-2019004>

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2023). Monitoring Cutaneous Leishmaniasis Lesions in Mice Undergoing Topical Miltefosine Treatment. *Scientia Pharmaceutica*, 91(4), 54. <https://doi.org/10.3390/scipharm91040054>

Participación en Congresos

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2023). Monitoreo de las lesiones de leishmaniasis cutánea en ratones sometidos a tratamiento tópico con Miltefosina. Congreso Internacionales U23Fest: Unidos por nuestro bienestar. Bucaramanga, Colombia.

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2022). Alteraciones histopatológicas e inmunológicas en la lesión de leishmaniasis cutánea durante y después del tratamiento tópico con miltefosina. XVIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá D.C, Colombia.

Escobar, P., **Neira, L. F.**, & Mantilla, J. C. (2022). Therapeutic effect of topical miltefosine hydrogels in BALB/c. 15th International Congress of Parasitology, ICOPANHAGE, World Federation of Parasitologists. Copenhagen, Denmark.

Neira, L. F., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2017). Antileishmanial and toxicity activity of topical formulation of miltefosine in experimental models. 6th World Congress on Leishmaniasis. Toledo, España.

Peña Burgos, D. P., Vera, A. M., **Neira, L. F.**, Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2017). Characterization of cutaneous lesions produced by leishmania strains in BALB/c mice treated with a topic formulation. 6th World Congress on Leishmaniasis. Toledo, España.