

**Evaluación de los factores involucrados en la eficacia clínica y parasitológica al tratamiento
con antimoniales pentavalentes en ratones infectados con *Leishmania del Subgénero*
Viannia.**

Angélica María Vera Árias

**Tesis de grado como requisito para optar al título de Magister en Ciencias Básicas
Biomédicas**

Directora:

Patricia Escrobar PhD

Uniiiversidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramaga

2019

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por todas las bendiciones recibidas, por su amor y misericordia.

A la Doctora Patricia Escobar por su formarme en lo profesional y en lo personal, gracias por todas las enseñanzas que durante años he tenido a su lado, por esa dedicación en cada proyecto emprendido, por motivarme y siempre dar lo mejor de mí, no existen palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy y el amor que le tengo.

A mi esposo Danny Vergel y a mi hija María Camila que siempre son mi motivación para seguir adelante, gracias por apoyarme en cada proyecto de vida que emprendo, por el amor, los sacrificios y la paciencia que me han tenido durante todo este tiempo. A mis padres y hermanos que siempre han estado ahí, sus palabras siempre me han edificado. Los amo.

A mis compañeritos del CINTROP que durante años me han acompañado en este camino de la investigación, gracias por cada momento vivido, siempre los llevare en mi corazón.

Al profesor Julio Mantilla y al Departamento de Patología por el procesamiento de las biopsias.

A la Gobernación de Santander por el apoyo económico para realizar la maestría por medio de la beca 771 del 2016 en la Formación de Capital Humano de Alto Nivel para el Departamento de Santander.

A la Vicerrectoría de Investigación y extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander UIS y al Departamento de Ciencias Básicas por el apoyo económico para la asistencia al VIII Congreso Argentino de Parasitología, realizado en Corrientes – Argentina.

Tabla de contenido

Introducción	21
1. Objetivos	25
1.1 Objetivo general	25
1.2 Objetivos específicos	25
2. Marco conceptual y estado del arte	26
2.1 Leishmaniasis: Generalidades	26
2.2 Formas y ciclo de vida de la <i>Leishmania</i>	28
2.3 Tratamiento en leishmaniasis	31
2.3.1 Tratamientos sistémicos	31
2.3.2 Tratamientos tópicos en LC	34
2.3.3 Tratamiento intralesional (IL) con Sb ^V	36
2.4 Antimoniales pentavalentes (Sb ^V)	37
2.4.1 Estructura	37
2.4.2 Mecanismos de acción de los antimoniales	38
2.4.3 Toxicidad de los Sb ^V	42
2.4.4. Uso del Sb ^V en tratamientos combinados con otros fármacos	43
2.4.5 Nuevas tecnologías aplicadas a los fármacos antileishmania	44
2.5 Variabilidad en la respuesta a los antimoniales	46
2.5.1 Generalidades	46

2.5.2 Factores dependientes del parásito.....	49
2.5.2.1 Relacionados con la especie de <i>Leishmania</i>	49
2.5.2.2 Relacionados con las poblaciones de parásitos en una determinada área endémica.	50
2.5.2.3 Relacionados con el desarrollo de mecanismos moleculares de resistencia:.....	50
2.5.3 Factores dependientes del huésped.	54
2.5.4 Factores dependientes del fármaco.	55
3. Metodología	58
3.1 Diseño experimental.	59
3.2 Fármacos	60
3.3.7 Parásitos de <i>Leishmania</i>	62
3.3.1 Cepas nativas o WT.	62
3.3.2 Cepas reactivadas ®.....	62
3.4 Animales	63
3.5 Consideraciones éticas	63
3.6 Procedimiento de infección de los ratones.....	64
3.7 Evaluación de la infección, sacrificio de los ratones y recolección de muestras.....	64
3.8 Evaluación del efecto del tratamiento con Glucantime intralesional (IL).....	65
3.8.1 Tamaño de muestra.	65
3.8.2 Grupos experimentales.....	65
3.8.3 Esquema del tratamiento.....	66
3.8.4 Determinación del tiempo final del experimento.....	66
3.8.5 Evaluación de la respuesta al tratamiento	66
3.8.5.1 En las lesiones:.....	66

3.8.5.2 En los parásitos:	67
3.8.5.3 En el peso, signos de dolor, y bienestar animal:	67
3.8.5.4 En los parámetros bioquímicos sanguíneos:	70
3.8.5.5 En los parámetros histopatológicos:	70
3.8.6 Análisis de resultados (fase 1)	71
3.8.6.1 Variables estudiadas.....	71
3.8.6.2 Eficacia del tratamiento	71
3.8.6.3 Factores asociados al parásito	72
3.8.6.4 Factores asociados al hospedero	72
3.8.6.2 Factores asociados al fármaco	73
3.9 Evaluación de la susceptibilidad a fármacos y características biológicas <i>in vitro</i>	75
3.9.1 Aislamiento de parásitos de las lesiones (reactivadas) postratamiento.	75
3.9.2 Obtención de amastigotes axénicos.	75
3.9.3 Actividad antiparasitaria de los fármacos	76
3.9.3.1 En las formas libres de L. (V.) panamensis y L. (V.) braziliensis:	76
3.9.3.2 En las formas intracelulares	77
3.9.4 Caracterización biológica <i>in vitro</i> de las cepas de Leishmania	78
3.9.4.1 Cinética de transformación promastigotes-amastigotes.....	78
3.9.4.2 Ensayos de infección en células:.....	78
3.9.5 Análisis de resultados (fase 2)	79
3.9.5.1 Variables estudiadas:	79
3.9.5.2 Susceptibilidad al Sb ^V :	79
3.9.5.3 Factores asociados al parásito:.....	79

3.9.5.4 Factores asociados al hospedero:	79
3.9.5.5 Factores asociados al fármaco:	79
4. Resultados	80
4.1 Resultados fase 1 <i>in vivo</i>	81
4.1.1 Implementación	81
4.1.1.1 Esquema de tratamiento:	81
4.1.1.2 Tiempo de seguimiento postratamiento (PT):	81
4.1.1.3 Respuesta a al gel de miltefosina (fármaco control):	82
4.1.2 Efectividad a los Sb ^V en los ratones infectados con las dos especies de parásitos.	83
4.1.2.1 Efecto del tratamiento con Glucantime en las lesiones (E _e):	83
Infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> (150 mg)	83
Infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> (50 mg)	84
Infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> (16,6)	84
Infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i> (150 mg)	84
Infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i> (50 mg)	85
Infectados <i>L. (V.) braziliensis</i> (16,6 mg)	85
4.1.2.2 Efecto del tratamiento con Glucantime en los parásitos (E _p):	85
4.1.2.3 Respuesta final del tratamiento:	87
4.1.2.4 Estudio de reactivación en los ratones tratados:	91
4.1.3 Factores relacionados con los parásitos	93
4.1.4 Factores relacionados con el huésped	95
4.1.4.1 Efecto del tamaño y características de la lesión inicial:	95
4.1.4.2 Efecto de la respuesta histopatológica de las lesiones en la efectividad al tratamiento:	108

Patron de cura	109
Patrón de no cura	109
Patrones asociados a la respuesta al tratamiento con 150 mgSb ^V /Kg/día	109
4.1.3.3 Efecto de la respuesta histopatológica en los órganos:.....	115
4.1.4.4 Efecto de algunos parámetros bioquímicos en la respuesta al tratamiento:.....	118
Resultados encontrados con referencia a los valores normales:	118
Parametros bioquimicos asociados con la respuesta al tratamiento.....	119
4.1.4.5 Efecto del peso en la respuesta al tratamiento:	120
4.1.5 Factores relacionados con el fármaco en la respuesta al tratamiento.	121
4.2 Resultados fase 2 <i>in vitro</i>	122
4.2.1 Implementación.....	122
4.2.2 Susceptibilidad <i>in vitro</i> a los Sb ^V	123
4.2.3 Factores relacionados con los parásitos	123
4.2.3.1 Con respecto a las especies del parásito y a los parásitos de la reactivación:	123
4.2.3.2 Con respecto a la forma de vida:.....	123
4.2.3.3 Con respecto a la cinética de transformación promastigotes amastigotes:	123
Cinética de transformación entre los parásitos estudiados	124
Relación de las diferencias en la cinética de transformación en la respuesta al Sb ^V	124
4.2.3.4 Con respecto a la suceptibilidad de los parásitos a fármacos:	127
4.2.4 Factores relacionados con la célula hospedera	131
4.2.4.1 Infectividad de los parásitos en células:.....	131
4.2.4.2 Relación de la respuesta al Sb ^V con la infectividad:	134
4.2.5 Factores relacionados con el fármaco.	134

5. Discusión.....	136
6. Conclusiones	144
Rerefencias Bibliograficas	145

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Estructuras y características fisicoquímicas de los fármacos empleados en el estudio. .	61
Tabla 2. Grupos experimentales (ensayos in vivo) para cada especie de Leishmania	65
Tabla 3. Signos de pérdida del bienestar animal, basados en la observación del peso corporal respuesta al manejo, apariencia y piel.....	68
Tabla 4. Resumen de los ensayos realizados in vivo, variables y unidades	73
Tabla 5. Descripción de los experimentos, variables, unidades de en ensayos in vitro.....	80
Tabla 6. Efecto del tratamiento intralesional con Sb ^V en ratones infectados con L. (V.) panamensis. Tratamiento con A. 150; B. 50; y C. 16,6 mg de Sb ^V /Kg/día por 29 días.	88
Tabla 7. Efecto del tratamiento intralesional con Sb ^V en ratones infectados con L. (V.) braziliensis. Tratamiento con A. 150; B. 50; y C. 16,6 mg de Sb ^V /Kg/día por 29 días.....	90
Tabla 8. Resumen de resultados in vivo (número de ratones curados versus no curados)	91
Tabla 9. Reactivación de las lesiones en las diferentes dosis utilizadas. Se muestran el efecto del tratamiento con diferentes dosis de Glucantime (Sb ^V) los ratones (R1-R6) infectados con L. (V.) panamensis (p) y L. (V.) braziliensis (b).	92
Tabla 10. Reactivación de las lesiones después de 60 días PT en ratones infectados. Antes: lesión al iniciar el tratamiento, Reactivada= lesión a los 60 días PT.....	93

Tabla 11. Intensidad de las variables histopatológicas en lesiones de ratones BALB/c infectados con L. (V.) panamensis y L. (V.) braziliensis tratados con 150 mgSb ^V /Kg/día por 29 días encontradas en la epidermis y dermis 60 días postratamiento.....	112
Tabla 12. Pruebas bioquímicas en suero de ratones BALB/c infectados con las dos especies de Leishmania.....	119
Tabla 13. Promedios de los parametros bioquímicos en suero de ratones curados y no curados al tratamiento con 150 mg/Sb ^V /Kg/día/29 días.....	119
Tabla 14. Promedios peso de ratones curados y no curados al tratamiento con 150 mg/Sb ^V /Kg/día/29 días.....	121
Tabla 15. Susceptibilidad de promastigotes y amastigotes axénicos de Leishmania Viannia a fármacos.....	128
Tabla 16. Número de amastigotes por célula después de la infección de amastigotes axénicos en células THP-1 en diferentes tiempos post-infección in vitro.....	133
Tabla 17. Actividad del Sb ^{III} y Sb ^V en promastigotes y amastigotes axénicos de Leishmania Viannia.....	134
Tabla 18. Actividad in vitro del antimonio en amastigotes intracelulares.....	135

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. (a) Morfologías de los promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania</i> y estructuras claves.	
(b) Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> en el insecto vector Modificado de Sunter J, Gull K, 2017.....	29
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	30
Figura 3. Estructura química del estibogluconato de sodio y el antimoniato de meglumina	38
Figura 4. Modelos propuestos del mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes en <i>Leishmania</i>	42
Figura 5. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antimonial en <i>Leishmania</i>	53
Figura 6. Representación gráfica de los signos de dolor expresados por el ratón.	69
Figura 7. Esquema del tratamiento intralesional con Glucantime.	81
Figura 8. Evaluación de la efectividad del tratamiento intralesional con 150 mgSb ^V /Kg/día por 29 días en diferentes días postratamiento (PT). Las fotos muestran las lesiones de los ratones (R1–R4) infectados con A. L. (V.) panamensis y B. L. (V.) braziliensis antes del tratamiento (primera columna en cada especie) y en los diferentes días PT en que fueron sacrificados (X= 15, 22, 29, 42 días). N = 1.....	82
Figura 9. Observación microscópica de parásitos.....	87
Figura 10. Efecto del tratamiento intralesional con 150, 50 y 16,6 mg Sb ^V /Kg/día por 29 días en ratones BALB/c infectados	95
Figura 11. L. (V.) panamensis 150 mgSb ^V /Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión	98

Figura 12. L. (V.) braziliensis 150 mgSb ^V /Kg/día. A. nódulo, B úlcera, C. lesión	100
Figura 13. L. (V.) panamensis 50 mgSb ^V /Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión	102
Figura 14. L. (V.) braziliensis 50 mgSb ^V /Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión	104
Figura 15. L. (V.) panamensis 16,6 mg/kg/día A. nódulo, B úlcera, C. lesión.....	106
Figura 16. L. (V.) braziliensis 16,6 mgSb ^V /Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión.....	108
Figura 17. Patrones histopatológicos de cura y de no cura.....	111
Figura 18. Características histopatológicas de las lesiones de los ratones tratados con IL con 150 mgSb ^V /Kg/día por 29 días, 60 días PT.	114
Figura 19. Características histopatológicas de órganos de ratones BALB/c infectados tratados con 150 mgSb ^V /Kg/día por 29 días, 60 días PT.....	117
Figura 20. Efecto del tratamiento intralesional con 50 y 16,6 mgSb ^V /Kg/día por 29 días en las lesiones de ratones BALB/c infectados. La figura A y C muestra en los ratones infectados con L. (V.) panamensis y la figura B y D los resultados de los ratones infectados con L. (V.) braziliensis. Se muestra la evolución de las lesiones (nódulo) desde el inicio del tratamiento hasta 60 días PT. R: ratón.	122
Figura 21. Concentración de amastigotes axénicos durante 10 días de transformación en las especies de Leishmania. WTp: L. (V.) panamensis. WTb: L. (V.) braziliensis. LpR2: cepa L.V. panamensis aislada. LbR1: cepa L. (V.) braziliensis aislada.....	125
Figura 22. Morfología de los parásitos en los diferentes días de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos.....	126
Figura 23. Relación promastigotes/amastigotes axénicos durante 10 días de transformación en las especies de Leishmania. WTp: L. (V.) panamensis. WTb: L. (V.) braziliensis. LpR2: cepa L.V. panamensis aislada. LbR1: cepa L. (V.) braziliensis aislada.....	127

Figura 24. Susceptibilidad de promastigotes y amastigotes axénicos de <i>Leishmania Viannia</i> a fármacos. Se observan los porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>L. (V.) panamensis</i> (derecha) y <i>L. (V.) braziliensis</i> (izquierda) al tratamiento con las diferentes concentraciones de A. Pentamidina, B. Ketoconazol, C. Miltefosina. Líneas negras cepas WT, rojas parásitos de lesiones que reactivaron. Dos experimentos.	130
Figura 25. Porcentajes de infección y número de amastigotes por célula después de la infección de amastigotes axénicos en células THP-1 en diferentes tiempos post-infección in vitro.	132
Figura 26. Infección de parásitos de <i>Leishmania</i> en células THP-1 diferenciadas a diferentes tiempos (horas). Coloreadas con Giemsa observadas en un aumento de 1000X.....	133
Figura 27. Porcentajes de inhibición del Sb ^{III} en células THP-1 infectadas con <i>L. (V.) panamensis</i> y <i>L. (V.) braziliensis</i>	136

Abreviaturas

% I	Porcentaje de inhibición de la lesión
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
AC	Acantosis
AmB	Anfotericina B
AmB-L	Anfotericina B liposomal
AM	Antimoniato de meglumina
AQP	Aquaporina
ALT	Alanina aminotransferasa
AM	Antimoniato de meglumina
AmA	Amastigotes axénicos
AST	Aspartato aminotransferasa
CI	Concentración inhibitoria
DEs	Dermis
DE ₅₀	Dosis efectiva ₅₀
DMSO	Dimetilsulfóxido
E _e	Eficacia estética al tratamiento
E _p	Eficacia parasitológica al tratamiento
E _f	Eficacia final al tratamiento
EP	Epidermis
FT	Falla terapéutica

GSH	Glutación
HQ	Hiperqueratosis
IF	Infiltrado inflamatorio
IL	Intralesional
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
KTZ	Ketoconazol
LC	Leishmaniasis cutánea
LC-NM	Leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo
LV	Leishmaniasis visceral
LM	Leishmaniasis mucosa
LpR2	<i>L. (V.) panamensis</i> aislada de una reactivación
LbR1	<i>L. (V.) braziliensis</i> aislada de una reactivación
MDR1	Resistente a múltiples fármacos
MTF	Miltefosina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Farmacodinámica
PK	Farmacocinética
PMA	Forbol miristato acetato
PM	Paromomicina
PMD	Pentamidina
PP	Presencia de parásito

PT	Postratamiento
Sb ^{III}	Antimoniales trivalentes, tartrato de antimonio
Sb ^V	Antimoniales pentavalentes
SFBi	Suero fetal bovino inactivado con calor
SLF	Sistemas de liberación de fármacos
SSG	Estibogluconato de sodio
T(SH) ₂	Tripanotión
U/L	Unidades por litro
WT	Cepa nativa o <i>wild type</i>
WTp	WT <i>L. (V.) panamensis</i>
WTb	WT <i>L. (V.) braziliensis</i>

Resumen

TÍTULO: Evaluación de algunos factores involucrados en la eficacia clínica y parasitológica al tratamiento intralesional con antimoniales pentavalentes en ratones infectados con *Leishmania del subgénero Viannia*.*

AUTORES: Angélica María Vera Arias, Patricia Escobar**

PALABRAS CLAVES: *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, leishmaniasis cutánea, antimoniales pentavalentes, tratamiento intralesional, ratones BALB/c

DESCRIPCIÓN

Los antimoniales pentavalentes (Sb^V) constituyen la primera opción de tratamiento de la leishmaniasis cutánea (LC). Su uso parenteral está asociado con efectos adversos y respuesta terapéutica variable con porcentajes de eficacia menores del 25% en algunas regiones. Su uso intralesional (IL) podría constituirse en una vía alternativa. Factores dependientes de los parásitos, hospedero y del fármaco se encuentran involucrados en su eficacia. En este trabajo, se propuso determinar si alguno de estos factores estaría relacionado en su eficacia cuando son aplicados IL en el modelo murino.

Los ratones BALB/c infectados fueron tratados IL con 150, 50 y 16,6 mgSb^V/Kg/día por 29 días y sacrificados 60 días postratamiento (PT). Como control se utilizó un gel de miltefosina al 0,5%. Se determinaron los porcentajes de inhibición del tamaño de las lesiones y se calculó la eficacia estética (E_e) antes, al final del tratamiento, 43 y 60 días PT, la E_{parasitológica}, la E_{final} y la dosis efectiva₅₀. Factores dependientes del parásito [dos especies *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*], hospedero (tamaño y tipo de lesión, patrones histopatológicos, parámetros bioquímicos y peso), y diferentes dosis del fármaco fueron relacionados con respuesta al tratamiento. Adicionalmente se realizó un estudio *in vitro* en parásitos nativos y obtenidos de lesiones que reactivaron. Se determinó si factores dependientes de los parásitos (especie y forma de vida, cinética de transformación a amastigotes, susceptibilidad a otros fármacos), de la célula hospedera (porcentajes de infectividad) o del fármaco (dosis de Sb^{III}, Sb^V) podría relacionarse con la susceptibilidad a los Sb^V. La E_f del tratamiento fue de 66,6% y 33,3% en infección con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente a los 60 días PT. Los factores que estuvieron asociados a la eficacia fueron la concentración del fármaco (*in vivo*) y la especie del parásito y el fármaco (*in vitro*).

* Tesis de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de tesis: PATRICIA ESCOBAR Bact, M.SC, Ph.D.

Abstract

TITLE: Evaluation of some factors involved in clinical and parasitological effectiveness to intralesional treatment with pentavalent antimonials in mice infected with *Leishmania* of subgenus *Viannia*.*

AUTHORS: Angélica María Vera Arias, Patricia Escobar**

KEY WORDS: *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, cutaneous leishmaniasis, pentavalent antimonials, intral treatment, BALB/ c mice

DESCRIPTION

Pentavalent antimonial (SBV) are the first choice of treatment of cutaneous leishmaniasis (CL) of the New World (NM). Its parenteral use is associated with adverse effects, restrictions and variable therapeutic response with efficacy percentages less than 25% in some regions. Its intralesional use (IL) could be an alternative route. Factors dependent on parasites, host and drug are involved in its effectiveness. In this work, it was proposed to determine if any of these factors would be related in their effectiveness when IL are applied in the murine model.

Infected BALB / c mice (N = 6) were treated IL with 150, 50 and 16.6 mgSbV / Kg / day for 29 days and sacrificed 60 days after treatment (PT). As a control treatment, a 0.5% miltefosine gel was used. The percentages of inhibition of the size of the lesions were determined and the aesthetic efficacy (Ee) was calculated before, at the end of the treatment and 43 and 60 days after treatment (PT), Eparasitology, Efinal and (effective dose) 50. Parasite-dependent factors [two species *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) braziliensis*], host (size and type of lesion, histopathological patterns, biochemical parameters and weight), and different doses of the drug were related to response the treatment. Additionally, an in vitro study was performed on native parasites (WT) and obtained from lesions that reactivated. It was determined whether parasite-dependent factors (species and lifestyle, kinetics of transformation to amastigotes, susceptibility to other drugs), of the host cell (percentages of infectivity) or of the drug (dose of SbIII, SbV) could be related to the susceptibility to SbV. The Ef of the treatment was 66.6% (4/6 mice) and 33.3% (2/6) of the mice infected with *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) braziliensis* respectively at 60 PT days. The factors that were associated with the efficacy of treatment with Sb^V in vivo were the parasite species and the concentration of the drug, in vitro the parasite species and the drug.

* Thesis

** School of Health. Medicine School. Master in Biomedical Basic Sciences. Thesis director: PATRICIA ESCOBAR Bact, M.SC, Ph.D.

Introducción

Los antimoniales pentavalentes [Sb^{V} , antimoniato de meglumina (Glucantime) y el estibogluconato de sodio (Pentostam)] constituyen aún, después de más de 60 años de ser utilizados, el tratamiento de primera línea para todas las formas clínicas de leishmaniasis. Son utilizados en dosis de 20 mg/kg/día por 20-30 días según la manifestación clínica de la enfermedad. Presentan varios problemas que aumentan y amenazan su uso futuro. Producen reacciones adversas de leves a severas (cardiotoxicidad, pancreatitis, nefropatía, síntomas gastrointestinales), están contraindicados en diferentes condiciones (p. ej. embarazo, inmunosupresión, pacientes con problemas cardíacos o renales u otra enfermedad concomitante), producen dolor en el momento de aplicarse intramuscularmente y su respuesta farmacológica positiva disminuye en las diferentes regiones geográficas afectadas.

El ejemplo más dicente, es en la zona de Bihar, India, en donde los pacientes con leishmaniasis visceral deben ser tratados dada la mortalidad de la enfermedad, aproximadamente el 65% de los pacientes fallan al tratamiento con los Sb^{V} (Sundar et al., 2000). Tal como se mostrará posteriormente en este trabajo, son varias las hipótesis de esta resistencia terapéutica: mal uso en las dosis utilizadas, susceptibilidad genética, exposición continua de una población a metales similares en el agua de consumo. Esta situación no es lejana a nuestro entorno. Estudios realizados en el Nuevo Mundo, en pacientes infectados con especies de *Leishmania* como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, han demostrado la eficacia variable a los antimoniales la cual va desde 100% hasta sólo el 25% de eficacia en algunos pacientes y grupos de edad (Navin et al., 1992, López-

Jaramillo et al., 2010, Castro et al.). En la leishmaniasis del Nuevo Mundo, el tratamiento para la leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea, especialmente la producida por especies de *Leishmania* del género *Viannia*, se basa en el uso de Glucantime o Pentostam los cuales son administrados intramuscular o intravenosamente. Recientemente el comité de expertos de la OMS incluyó el tratamiento intralesional (IL) con los Sb^V en las directrices regionales restringidas a centros de referencia y a lesiones individuales que no afectan la cara o las articulaciones, lo que se ha clasificado como leishmaniasis leve (OPS, 2013). Sin embargo, no existen directrices sobre su uso IL en cuanto a las dosis, el modo de aplicación, el esquema de tratamiento ideal, etc. Varios de los protocolos utilizados han sido tomados de la experiencia en la LC del Viejo Mundo, la cual muestra características diferentes de la nuestra, en cuanto a las especies de parásitos, tiempo de evolución, tipo de lesiones, cura espontánea etc. Se ha evidenciado que la eficacia del tratamiento con Sb^V aplicado IL en pacientes con LC del Nuevo Mundo es del 80,0 % al 96,4 % (Oliveira-Neto et al., 1997). Dentro de las ventajas presentadas por este método de administración es la reducción de los efectos adversos, su aplicación es más sencilla, pues esta se realiza en la base de la lesión y no requiere hospitalización, es directo al sitio donde están los parásitos. Los pacientes que recibieron este tipo de tratamiento manifestaron reacciones adversas leves relacionadas con dolor durante la aplicación, picazón y ardor.

Como un aporte en la implementación del uso IL de los Sb^V, el presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar algunos de los factores involucrados en la eficacia del tratamiento IL con Sb^V en ratones BALB/c infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*, dos de las especies prevalentes en Colombia. La experiencia con el uso sistémico de este fármaco ha mostrado que varios factores podrían estar involucrados en la variabilidad en la respuesta al tratamiento. Tal como se dirá adelante en la revisión, existen factores dependientes de los parásitos

ya sea por diferencias intrínsecas entre sí (lo cual justifica el uso de dos especies en el estudio) o por el desarrollo de mecanismos de resistencia que no permitan la reducción de Sb^V a su forma activa Sb^{III} y la entrada fármaco y/o que permitan que los parásitos inactiven, neutralicen el Sb^{III} (formando complejos con los tioles) e induzcan la expulsión del fármaco (Bourreau et al. 2016, Croft, Sundar S, Fairlamb AH, 2006). Igualmente, la actividad del Sb^V se ha relacionado con factores dependientes del huésped, p. ej. la eficacia de los Sb^V es dependiente de estado inmune del huésped, esta eficacia se ha visto comprometida en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa, coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) u otros eventos que involucren fallas en la respuesta inmune mediada por células tales como inmunosupresión por desnutrición o cáncer (Croft S, Sundar S, Fairlamb AH, 2006). La edad también ha estado relacionada con la eficacia de los Sb^V , se ha demostrado que los niños con LC tienen una tasa de respuesta más baja a los Sb^V (Cruz et al., 2007). Las dosis utilizadas también han estado involucradas en la eficacia (en este trabajo se utilizaron tres), las propiedades farmacocinéticas en cuanto su absorción, distribución, metabolismo y la excreción o su farmacodinámica en cuando a sus efectos y mecanismos de acción, también están involucradas en la eficacia a los mismos. Estos dos aspectos para los Sb^V no están muy claros lo cual es una inconveniente debido a que no se tiene un marco científico lo suficientemente claro para elegir los medicamentos apropiados (o combinaciones) y sus dosis.

La primera parte de este trabajo muestra una revisión bibliográfica que incluye algunas generalidades de la leishmaniasis y las diferentes formas de vida del parásito y describe los tratamientos utilizados actualmente para esta enfermedad. Se profundiza algo en temas relacionados con los Sb^V con respecto a su estructura y mecanismos de acción, toxicidad, su uso intralesional, en tratamientos combinados y en nuevos sistemas de transporte nanotecnológicos.

Al final, la revisión se enfoca en la variabilidad que se ha encontrado en la respuesta al tratamiento con los Sb^V y se muestran algunos factores dependientes del parásito, huésped y fármaco involucrados en esta respuesta.

Posteriormente se describe la metodología utilizada la cual estuvo dividida en dos fases. La fase 1 consistió en experimentos *in vivo* en donde la respuesta al tratamiento con 150, 50 y 16,6 mg Sb^V/kg/día por 29 días consecutivos aplicado intralesionalmente en ratones BALB/c infectados con dos cepas *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* fue relacionada con factores dependientes de la especie de parásito, del hospedero (tamaño y tipo de lesión, patrones histopatológicos, parámetros bioquímicos y peso), y con las diferentes dosis del fármaco utilizados. La fase 2 consistió en el estudio *in vitro*, realizado en parásitos nativos (WT), y obtenidos de lesiones que reactivaron *LpR2 L. (V.) panamensis* y *LbR1 L. (V.) braziliensis*, en donde la respuesta al tratamiento podía ser relacionada con factores dependientes de los parásitos [especie y forma de vida (promastigotes, amastigotes axénicos, y amastigotes intracelulares), cinética de transformación a amastigotes], de la célula hospedera (porcentajes de infectividad), del fármaco (dosis de Sb^{III}, Sb^V, pentamidina, ketoconazol y miltefosina) , podría relacionarse con la susceptibilidad a los antimoniales. en todas las formas del parásito

Posteriormente los resultados evidencian el efecto parasitológico y clínico del tratamiento con Sb^V en los ratones infectados con las dos especies de *Leishmania*, los resultados *in vitro* muestran la caracterización y susceptibilidad de las cepas aisladas comparadas con las cepas de referencia o WT.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Determinar los factores relacionados con la eficacia al tratamiento intralesional (IL) con antimoniales pentavalentes (Sb^{V}) en ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer si los factores dependientes del parásito: especie y formas de vida parasitaria, podrían estar implicados en la respuesta al tratamiento IL con los Sb^{V}
- Definir si el tamaño y el tipo de lesiones generadas por el hospedero mamífero (ratones BALB/c) después de la infección podrían estar implicadas en la respuesta al tratamiento con los Sb^{V}
- Determinar si el factor fármaco (diferentes dosis) aplicados en un mismo esquema de tratamiento podrían estar implicados en la respuesta al tratamiento IL con los Sb^{V}
- Determinar si la susceptibilidad *in vitro* de los parásitos a los antimoniales se relaciona con algunos factores dependientes de los parásitos, de la célula hospedera y del tipo de fármaco

utilizado en parásitos nativos (WT) y aislados de lesiones que se reactivaron después del tratamiento IL con Sb^V

2. Marco conceptual y estado del arte

2.1 Leishmaniasis: Generalidades

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania* y transmitida a los humanos por la picadura de insectos flebótomos (hembra) del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* en el Nuevo y Viejo Mundo, respectivamente.

La leishmaniasis es endémica en más de 98 países y constituye una carga generalizada de enfermedad en los países que la presentan. Se estima que la incidencia es de 0,7 a 1,2 millones de casos para leishmaniasis cutánea (LC) y 0,2 a 0,4 millones de casos de leishmaniasis visceral (LV) entre las regiones endémicas en los cinco continentes (Alvar et al., 2012).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre las enfermedades tropicales desatendidas, en donde existen aproximadamente mil millones de personas viviendo en riesgo de infección. La leishmaniasis presenta diferentes formas clínicas, pudiéndose clasificar según el sitio comprometido en el hospedero infectado como: LV, LC y leishmaniasis mucosa (LM). La forma visceral, conocida como “kala azar”, es considerada la más grave ya que puede causar la muerte si no se trata. Se caracteriza por daño en órganos internos como hígado y bazo. Las formas cutáneas se caracterizan

por presentar lesiones en piel tales como pápulas, nódulos o lesiones ulcerativas de bordes levantados tipo volcán únicas o múltiples. La infección de las mucosas es caracterizada por presentar inflamación pudiendo llegar a la destrucción de la cavidad oral-nasal y faríngea (McGwire y Satoskar, 2014).

La LC es la forma más común y heterogénea de la leishmaniasis con manifestaciones clínicas y consecuencias que van desde lesiones cutáneas graves y numerosas, cicatrices permanentes, discapacidad, riesgo de reactivación (en casos de inmunosupresión, por ejemplo) hasta lesiones únicas, pequeñas que pueden curar espontáneamente. No se tiene un registro exacto de los casos de leishmaniasis asintomática. En los últimos cinco años, aproximadamente un millón de casos de LC han sido reportados primordialmente en países como: Afganistán, Argelia, Arabia Saudita, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, y Siria. En las Américas, desde 2001 hasta 2011, Colombia, Brasil y Perú presentaron aproximadamente el 75% de los casos de LC (Mitropoulos, Konidas y Durkin-Konidas, 2010; Alvar et al., 2012). En Colombia en el periodo comprendido entre el año 2008 a 2018 se notificaron 110.366 casos de leishmaniasis en sus tres formas clínicas donde el 98,50 % (108.718 de casos) correspondieron a LC, el 1,27 % (1404) a LM y el 0,22 % (244) a LV (INS, 2018). El departamento de Santander ocupa el tercer lugar en incidencia para la LC con 282 casos notificados para el año 2019 semana 31, en donde los municipios de El Carmen de Chucuri, Rionegro y el Playón reportan el mayor número de casos, seguidos de Cimitarra, Landázuri y San Vicente de Chucuri (Gobernación de Santander, 2019).

2.2 Formas y ciclo de vida de la *Leishmania*

Al igual que otros protozoarios como *Plasmodium*, *Trypanosoma cruzi*, el ciclo de vida de la *Leishmania* es digenético, es decir que parte del ciclo se desarrolla en un hospedero mamífero y otra en un hospedero invertebrado (insecto vector). Para ello, los parásitos de *Leishmania* se adaptan a cada uno de sus hospederos exhibiendo formas y mecanismos de adaptación diferentes (Sunter y Gull, 2017).

En la **figura 1** (a) en la parte superior, se observan las dos diferentes morfologías que presenta *Leishmania* las cuales se definen de acuerdo con la forma de la célula, la longitud del flagelo, la posición del kinetoplasto/núcleo y las características estructurales. La forma promastigote, que es extracelular, de 15 a 20 μm de longitud con un flagelo libre en su parte anterior y se encuentra en el vector y la forma de amastigote, que habita intracelularmente, ovoide de 3 y 5 μm , a flagelado que se encuentra en el huésped mamífero.

En el vector se han descrito varios estadios del parásito (según lo descrito en la figura 1b, de 1 a 7). El flebotomino toma la sangre y entran los macrófagos infectados con amastigotes intracelulares (1); al llegar al intestino medio, los macrófagos se lisan y se liberan los amastigotes diferenciándose primero a promastigotes procíclicos (2), y luego, a promastigotes nectomonas (3). Estos escapan de la matriz peritrófica y se adhieren a las microvellosidades de las células del epitelio intestinal (4) y posteriormente, pasan al intestino medio torácico y la válvula estomodeal donde se diferencian en promastigotes leptomonas (5); y luego en promastigotes haptomonas (6) las cuales se adhieren a la válvula estomodeal; transformándose en promastigotes metacíclicos (7) que son la forma infectiva. El fuerte anclaje de las haptomonas a la estructura quitinosa de la válvula estomodeal impide que pasen junto a los promastigotes metacíclicos al huésped mamífero,

permitiendo, posiblemente que el insecto vector permanezca infectado de por vida (Laurel et al., 1993).

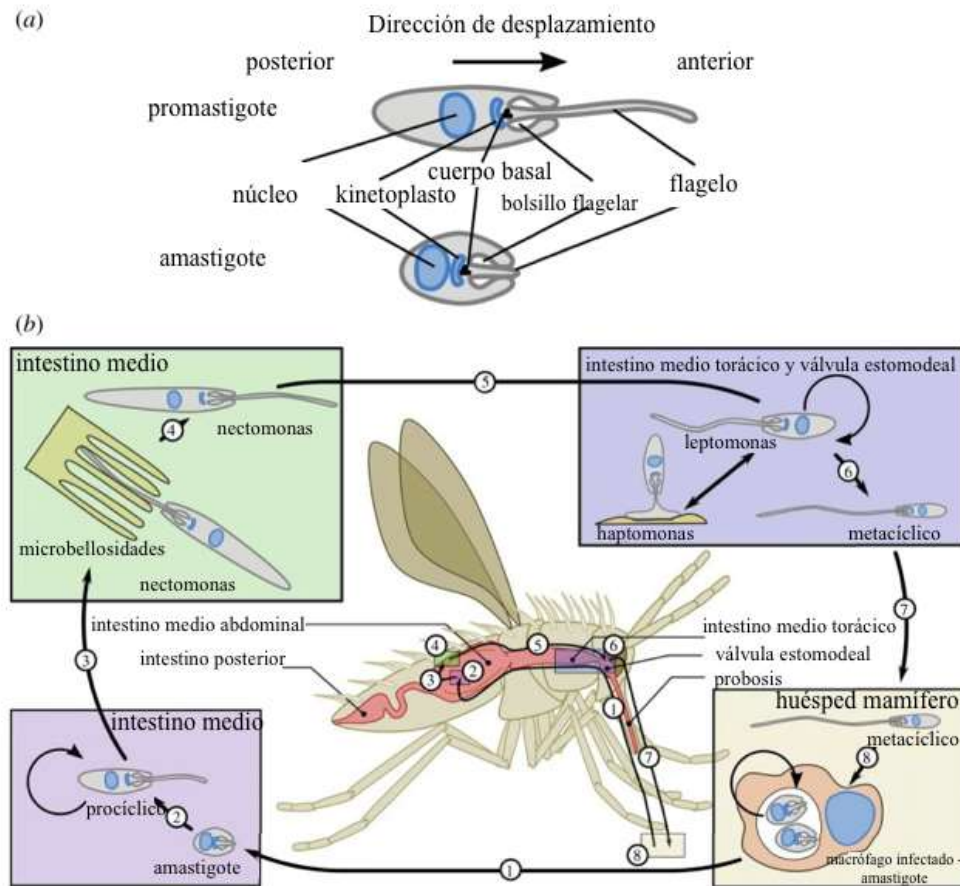


Figura 1. (a) Morfologías de los promastigotes y amastigotes de *Leishmania* y estructuras claves. (b) Ciclo de vida de *Leishmania* en el insecto vector Modificado de Sunter J, Gull K, 2017.

El ciclo en el hospedero mamífero inicia cuando el vector hembra, al alimentarse de sangre, regurgita los promastigotes metacíclicos (forma infectiva). Estos son fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear (inicialmente neutrófilos u otro tipo) y luego principalmente por

los macrófagos. Se forma el fagosoma que luego se fusiona con el lisosoma (fagolisosoma) en donde el parásito habita en la vacuola parasitófora de las células.

En este sitio los promastigotes se transforman en amastigotes los cuales se dividen por fisión binaria. Luego los amastigotes son liberados de la célula hospedera y pueden infectar otras células ver **figura 2** (Reithinger et al., 2007). Cuando el vector flebótomo se alimenta de la sangre de un hospedero infectado toma células infectadas que llegan hasta el intestino de la mosca, entonces suceden los pasos descritos anteriormente de la figura 1. La multiplicación de *Leishmania* es especialmente asexual por bipartición o fisión binaria en los promastigotes (no en los metacíclicos) y amastigotes.

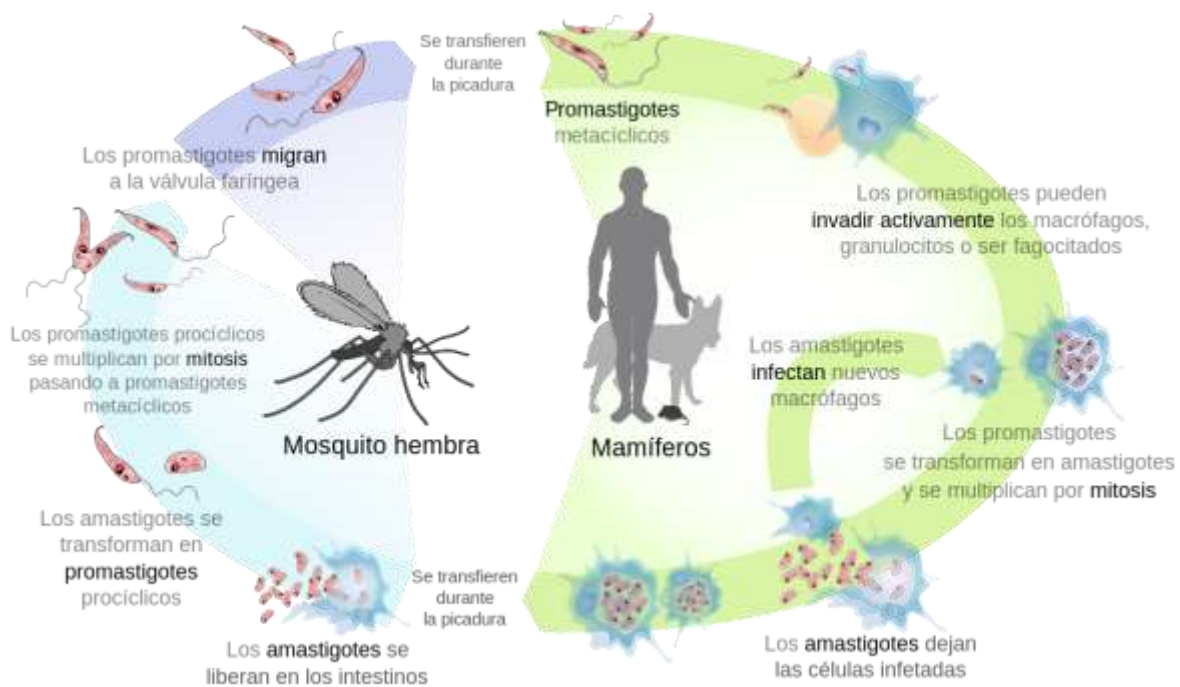


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*. Nota Tomado de: <https://www.expertoanimal.com/leishmaniosis-en-perros-sintomas-tratamiento-y-contagio-24141.html>

2.3 Tratamiento en leishmaniasis

2.3.1 Tratamientos sistémicos. Se encuentran tratamientos farmacológicos sistémicos (orales o parenterales que funcionan en todo el cuerpo) para las diferentes formas clínicas de leishmaniasis, aunque estos son pocos y la mayoría presentan uno o varios inconvenientes principalmente debido a sus efectos secundarios (relacionados a su aplicación o a sus reacciones colaterales de leves a severas que se producen), restricciones, eficacia variable, disponibilidad, accesibilidad y costo (Desjeux P, 2004).

La primera opción terapéutica para la leishmaniasis (en las regiones endémicas en donde todavía la falla terapéutica no es un problema mayor) son los antimoniales pentavalentes (Sb^V) como el estibogluconato de sodio (Pentostam®, SSG) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®, AM) ver **figura 3**. Estos son administrados parenteralmente [intramuscular (IM), intravenoso (IV)] en dosis de 20 mg/Kg/día por 20-30 días según la manifestación clínica de la enfermedad.

En caso de falla terapéutica o contraindicaciones a los Sb^V , se recomienda el uso de isetionato de pentamidina (PMD), miltefosina (MTF), la anfotericina B (AmB) y sus formas liposomales (el complejo lipídico de AmB, la suspensión coloidal de AmB y la AmB-L) y el sulfato de paromomicina (PM) (Croft y Olhary, 2011). Adicionalmente, la OMS incluye tres derivados azólicos: itraconazol, fluconazol y ketoconazol (KTZ), y sugiere el uso de tratamientos combinados que aumenten el potencial terapéutico, reduzcan los efectos adversos, el tiempo de tratamiento y disminuyan el riesgo de generación de resistencia (OMS, 2010, McGwire y Satoskar, 2014, Pham et al., 2013).

La PMD es una diamina utilizada eficazmente en el tratamiento de la tripanosomiasis africana, leishmaniasis, algunas infecciones fúngicas y en neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (Diken et al., 2016). En LC del Nuevo Mundo se ha administrado en dosis de 2-7 mg/Kg/día por 3-5 días cada 2-3 días por vía IM. Sus principales reacciones colaterales son dolor, náuseas, vómito, mareos, mialgia, hipertensión, dolor de cabeza, hipoglucemia e hiperglucemia transitoria (Kaur G, Rajput B, 2014). Su mecanismo de acción en *Leishmania* se relaciona con su capacidad de inhibir la biosíntesis de poliaminas y el potencial de la membrana interna mitocondrial, de interferir con la síntesis de ADN y modificar la morfología del kinetoplasto (Basselin et al., 1996).

La MTF fue inicialmente utilizada como anticancerígeno y constituye el primer tratamiento oral para el tratamiento de la leishmaniasis. En LC y LV se utiliza en dosis de 2,5 mg/Kg/día por 28 días (Soto, y Soto, 2006). Desafortunadamente, su teratogenicidad excluye el tratamiento de mujeres embarazadas y su lento recambio podría promover la aparición de resistencia. Presenta efectos adversos como náuseas, vómito, diarrea, incremento en los niveles de transaminasas hepáticas y creatinina sérica (Soto et al., 2004). En promastigotes de *Leishmania*, la miltefosina induce un fenómeno ‘like’ apoptosis por inhibición de la enzima citocromo C oxidasa mitocondrial y en células de mamífero inhibe la proteína quinasa B (PKB)/AKT implicada en la supervivencia celular (Varela et al., 2017). También altera las vías de señalización dependientes de lípidos (cambios en la arquitectura de fosfolípidos de membrana) y ha mostrado efectos inmunomodulatorios (Dorlo et al., 2012; Vincent et al., 2013). Líneas resistentes a MTF, generadas *in vitro*, muestran una sobreexpresión de miembros de la familia transportadora ABC (casete de unión a ATP) y/o la mutación de la flippasa *LdMT* (Weingärtner et al., 2010).

La AmB es un antibiótico poliénico considerado como un potente agente antifúngico, sin embargo, su toxicidad es un inconveniente que restringe su uso. Tiene afinidad hacia la molécula

de ergosterol que se encuentra en la membrana de los parásitos de *Leishmania* y en la pared de los hongos (más no de las células de mamífero) (Kip et al., 2018). Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de producir agregados que forman pequeños poros transmembranales causando despolarización e incremento de la permeabilidad de membrana a protones y cationes monovalentes como el K^+ y Mg^{2+} y de otras moléculas al exterior causando un desbalance osmótico y finalmente la muerte celular (Pourshafie et al., 2004). La AmB desoxicolato (Fungizone®) se utiliza en días alternos durante 30 a 45 días (15 a 22 dosis) en dosis de 0,5 a 1,0 mg/Kg/día. La vía de administración es intravenosa (IV) diluyendo la dosis calculada en solución con dextrosa al 5 %. Además de la necesidad de hospitalización, la monitorización renal, hepática y parámetros hematológicos constante de los pacientes, la duración del tratamiento y los eventos adversos relacionados con la perfusión son inconvenientes notables. Sus principales reacciones secundarias son fiebre, náuseas, anorexia, leucopenia, insuficiencia renal y problemas cardíacos (Neves et al., 2011). El AmBisome® una formulación liposomal de AmB (AmB-L) es comparativamente más segura y eficaz que la AmB desoxicolato. Se utiliza en dosis de 10 mg/Kg como dosis única o 3-5 mg/Kg/día hasta un total de 15 mg/Kg/día durante 3 a 5 días en LV producida por *L. donovani* y en una dosis de 2-3 mg/Kg/día hasta una dosis total de 20-40 mg/Kg en infecciones por *L. (V.) braziliensis* (Burza et al., 2018). Sin embargo, el alto costo y la necesidad de una cadena de frío limitan su uso generalizado. La OMS facilitó la distribución gratuita de AmBisome® a los países involucrados en la estrategia de erradicación de LV en el sur de Asia, para pacientes con LV primaria (no tratada previamente) y como tratamiento de rescate para la LV en África. Aún no se ha evaluado adecuadamente su uso para la LC.

La PM es un antibiótico aminoglucosídico que se utiliza en el tratamiento de la LV en dosis de 11-15 mg/Kg/día durante 21 días intramuscular y en LC en formulaciones tópicas con 15% de PM

más 12% de cloruro de metilbencetonio (CMB) por 20 días (Davidson et al., 2009, Burza et al., 2018). Su formulación parenteral, es de bajo costo y ha sido eficaz en pacientes infectados de países asiáticos, pero está asociada con dolor local en el sitio de la inyección IM y presenta cierto grado de toxicidad renal y ototoxicidad (Sundar y Chakravarty, 2015). La PM afecta el metabolismo energético de la célula causando disfunción respiratoria y despolarización de la membrana mitocondrial (Maarouf et al., 1995; Maarouf et al., 1997).

2.3.2 Tratamientos tópicos en LC. En el año 2010, el comité de expertos en leishmaniasis de la OMS recomendó la inclusión de tratamientos locales y tópicos entre las alternativas terapéuticas aceptables para la leishmaniasis del NM (OMS, 2010). Estos tratamientos buscan, además de su efectividad, disminuir los efectos secundarios de los tratamientos sistémicos logrando una mayor adhesión de los pacientes al tratamiento debido a su fácil administración. Igualmente buscan disminuir los costos ya que no se requiere hospitalización y se presentan como una gran alternativa en pacientes con lesiones pequeñas y únicas (leishmaniasis simple), mujeres embarazadas y pacientes con enfermedades renales y cardíacas u otras enfermedades concomitantes (Burza et al., 2018; OMS, 2010). Se utilizan tratamientos físicos como la crioterapia (aplicación de nitrógeno líquido), la termoterapia (uso local de temperaturas de 50°C) o la radiofrecuencia por medio de un dispositivo electromagnético generador de ondas de alta frecuencia (López et al., 2013, OMS, 2016). Una desventaja de estos tipos de tratamientos localizados es la dificultad de disponer los equipos en las zonas rurales requieren de varias sesiones y, además, presentan algo de dolor durante la intervención (OMS, 2010).

Con respecto al uso de formulaciones tópicas conteniendo fármacos, El-On y colaboradores desarrollaron un ungüento de 15% de sulfato de paromomicina (PM) y 12% de CMB (como

potenciador de la permeación y abrasivo) mostrando resultados prometedores al aplicarse dos veces al día por 10 días (El-On et al., 1986). En un estudio realizado en Guatemala, el tratamiento con PM al 15 % y 12 % CMB, dos veces al día/20 días mostró una respuesta final del 85,7 % (Arana et al., 2001). En Colombia, la aplicación tópica de PM-gentamicina (la crema WR 279,396) mostró un 61 % de curación (Soto et al., 2002). Esta misma crema aplicada en una dosis diaria por 20 días mostró en un ensayo clínico realizado en Panamá una eficacia del 79 % (Sosa et al., 2013). Un ensayo clínico en Bolivia, en pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis*, la formulación con solo PM al 15 %, mostró una tasa de cura del 77,5 %, comparado con el 70 % del grupo tratado con PMD intralesional (Soto et al., 2019). Se tienen también resultados con una crema conteniendo AmB contenida en una crema tópica con AmB al 3 % (Anfoleish), la cual un ensayo clínico en Colombia mostró una tasa de cura del 39,4 % (López et al., 2018). En relación con el Imiquinod (un inmunomodulador, comercialmente producido como crema al 5 % Aldara®) al ser utilizado junto con Glucantime mostró una efectividad del 72 % después de tres meses de tratamiento en comparación con el 35 % obtenido para el grupo control (Glucantime y vehículo sin el fármaco) en pacientes peruanos (Miranda et al., 2005). También se tiene resultados con una formulación conteniendo MTF, donde ratones BALB/c infectados con *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* tratados tópicamente con un gel a base de carbopol con 0,5 % de MTF aplicado por 20 días, logró reducir el tamaño de la lesión en 84-100% sin detectar parásitos en biopsias (Neira et al., 2019).

Algunos efectos adversos del uso tópico de estos fármacos incluyen irritación, prurito y formación de vesículas en el sitio de aplicación. Esto puede ser debido al vehículo utilizado en la formulación (Burza et al., 2018). El éxito de estos tratamientos depende tanto de la actividad del fármaco contra el parásito como de su capacidad del fármaco de penetrar las capas internas de la piel y alcanzar los macrófagos de las capas dérmicas (Sousa-Batista y Rossi-Bergmann, 2018).

2.3.3 Tratamiento intralesional (IL) con Sb^V. En 2013, el comité de expertos en leishmaniasis de la OMS en leishmaniasis incluyó el tratamiento IL en las directrices regionales restringidas a centros de referencia y a lesiones individuales que no afectan la cara o las articulaciones (OPS, 2013). La administración IL de los Sb^V ofrece ventajas. Se podrán mantener niveles bajos de su forma reducida Sb^{III} (activa y tóxica) en plasma sin el requisito de la administración diaria del medicamento brindando la posibilidad de utilizar un programa más flexible de tratamiento (Silva et al., 2016). Duque et al., 2016 propusieron una dosis de 1 a 5 mL por sesión cada 3 a 7 días y calcularon el volumen requerido mediante la fórmula: diámetro mayor de la lesión en mm × diámetro menor × 0,008 mL, obteniendo una eficacia del 83,3 % sin embargo, las dosis con aplicación IL no se han definido y estas dependen del tamaño de la lesión. En un estudio realizado en Rio de Janeiro, Brasil, 74 pacientes con LC por *L. (V.) braziliensis* con lesiones cutáneas ulcerativas únicas en el tronco o las extremidades, fueron tratados IL con MA (dosis por ampolla de 425 mg de Sb^V) (Oliveira-Neto et al., 1997). El número de ampollas aplicadas dependió del tamaño de las lesiones (p. ej. para lesiones de 10-29 mm² se aplicaron de 1,0-1,5 ampollas) sin embargo el número de sesiones no quedó claro ya que en algunos se repitió la dosis, 15 días después y en otros no. En este estudio el 80% de los pacientes curaron sus lesiones en un intervalo de 12 semanas y no han presentado recaídas ni diseminación a mucosa en los 10 años de seguimiento (Oliveira-Neto et al., 1997). En otro estudio realizado en la misma ciudad por Vasconcellos et al., 2012 utilizando de 1 a 4 inyecciones de MA con intervalos de 15 días obtuvieron el 83,3 % de eficacia. Algunos estudios en LC del Viejo Mundo mostraron resultados interesantes. El tratamiento IL con 100 mg/mL de SSG diluido en xilocaína aplicado cada 8 días por 42 días mostró una eficacia del 94,6 %; el tratamiento IL con total de 3 inyecciones de SSG en varios tiempos de tratamiento (una inyección diaria, en días alternos o una semanal) mostraron

una eficacia del 67, 97 y 91% respectivamente y la aplicación de 0,05 mL de MA una vez por semana por 6 semanas obtuvieron una eficacia del 86,6 % (Sharquie et al., 1996, Kashani et al., 2010). En el modelo de LC por *L. (V.) panamensis* en hámster, la aplicación IL de 4 inyecciones de 4 mg/Kg de Sb^V a intervalos de 5 días lograron una reducción del tamaño de las lesiones (Travi et al., 1993). Los efectos adversos reportados en los ensayos clínicos han sido menores tales como dolor leve durante la aplicación, picazón y ardor. Una característica que favorece la curación con el tratamiento IL de las lesiones es su número y tamaño (pocas y pequeñas) (Silva et al., 2016). Una desventaja es la falta de un procedimiento de infiltración IL estandarizado y validada.

2.4 Antimoniales pentavalentes (Sb^V)

2.4.1 Estructura. A principios del siglo pasado, Gaspar Viannia, investigando tratamientos para la leishmaniasis informó sobre la eficacia del tartrato de antimonio (Sb^{III}) y potasio [conocido como tartrato de antimonil potasio o tártaro emético, K₂Sb₂(C₄H₂O₆)₂] eficaz en el tratamiento de la LM y LV (Viannia, 1912). Años después, el uso de este compuesto se vio restringido debido a los graves efectos secundarios y fue necesario utilizar fármacos menos tóxicos. Esto condujo al descubrimiento de una serie de compuestos conteniendo antimoniales pentavalentes (Sb^V) como el estibogluconato de sodio (SSG, Pentostam), de GlaxoSmithKline, formulado al 33 % que equivale al 10% de Sb^V o 100 mg Sb^V/mL y el antimoniato de meglumina (*N*-metil-D-glucamine, AM, Glucantime), de Aventis, formulado en una solución de 85 mg/mL de Sb^V (Oliveira-Neto et al., 1997), los cuales han sido utilizados desde la década de 1940 en el tratamiento de la leishmaniasis. Aunque la estructura exacta de estos complejos permaneció desconocida durante décadas, debido posiblemente al estado amorfo de estos compuestos, el uso de técnicas como la

espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN) ha permitido un progreso significativo en su caracterización (Frézard et al., 2008). Se sugiere que tanto el SSG como el AM son una mezcla compleja de polímeros de carbohidratos y antimonio. El SSG es un dímero cíclico formado por dos tartratos unidos por un puente a dos antimonios (Tapscott et al., 1969). El AM presenta una estructura en donde dos moléculas de meglumina (*N*- metil- D- glucamina) se coordinan con un solo átomo de Sb en una geometría simétrica (Headley et al., 1995) ver **figura 3**.

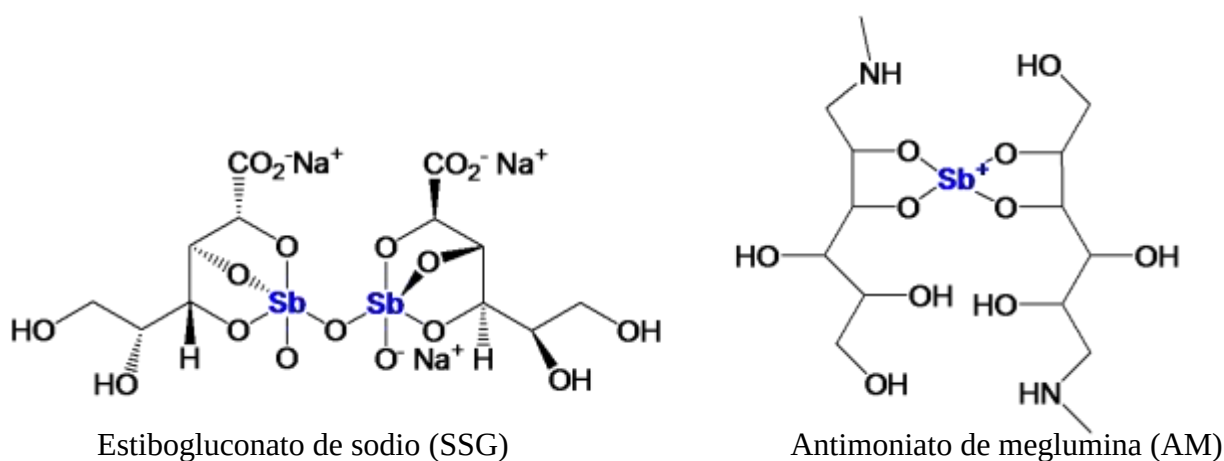


Figura 3. Estructura química del estibogluconato de sodio y el antimoniato de meglumina

2.4.2 Mecanismos de acción de los antimoniales. Sobre su entrada, se conoce que el Sb^{III} (antimonio trivalente) es internalizado pasivamente por los parásitos a través de una acuagliceroporina (proteína de membrana que forma canales permeables al agua y otros pequeños solutos, como urea o glicerol) llamada AQP1 (Gourbal et al. 2004). Se sugiere que el Sb^V utiliza una ruta de entrada distinta, proponiendo algunos autores, dada su analogía con el arseniato, que podría ser un transportador de fosfato, sin embargo, esta no está definido (Brochu et al. 2003). De todas maneras, la entrada del Sb a la célula huésped es necesaria para su actividad.

Los estudios de los mecanismos de acción moleculares o celulares de los antimoniales han dado a decir que no es uno sino varios mecanismos los que están ocurriendo simultáneamente. Aún no está muy claro si la forma final activa es el antimonio pentavalente (Sb^{V}) o su forma reducida el Sb^{III} o ambas (Frezard et al., 2009). Se han propuesto dos modelos: el modelo profármaco donde el Sb^{V} debe reducirse a Sb^{III} para ejercer actividad antileishmanial y el modelo de Sb^{V} activo donde el Sb^{V} es activo por sí mismo (**Figura 4**).

El modelo profármaco (reducción de Sb^{V} a una forma más tóxica y activa de Sb^{III}) ha sido planteado al encontrarse una mayor susceptibilidad de los amastigotes intracelulares y amastigotes axénicos al fármaco comparado con los promastigotes sugiriendo que la reducción del Sb^{V} a Sb^{III} es realizada por los amastigotes (y no por los promastigotes) (Denton et al., 2004; Zhou et al., 2004). Sobre esta reducción, aún no conoce bien el sitio (amastigotes o macrófago) donde ocurre o el mecanismo de reducción (enzimático o no enzimático) implicado. Sin embargo, el espectro en la respuesta encontrado (activo en amastigotes y no en promastigotes) ha ayudado a comprobar el modelo. Por ejemplo, factores relacionados con las condiciones de cultivo de amastigotes/promastigotes tales como la disponibilidad de tioles del medio, el pH (5,0 o 7,0), la temperatura (33- 27 °C) han demostrado que, por ejemplo, al mantener estas condiciones estables, la actividad del Sb^{V} fue similar en promastigotes, amastigotes intracelulares y amastigotes axénicos de *L. infantum* (Carrió et al., 2000). También ha sido demostrada una mayor susceptibilidad al Sb^{V} en los amastigotes intracelulares que en los amastigotes axénicos sugiriendo que la reducción de Sb^{V} a Sb^{III} está asociada con la célula hospedera (Serenio et al. 1997).

Con referencia a los tioles, se ha encontrado que la reducción Sb^{V} a Sb^{III} podría ocurrir espontáneamente en presencia algunos tioles como: glutatión (GSH, mecanismo lento) el tiol más abundante del citoplasma de la células hospedera; la cisteína (Cys) y cisteinil-glicina (Cys-Gly) de

los lisosomas; y el tripanotión (N,N-(bis)glutathionilpermidina) en estado ditiol denominado (T(SH)₂), del parásito (Fairlamb y Cerami 1992, Frézard et al. 2001; Yan et al. 2003). Dado que ellos son agentes reductores especialmente a pH ácidos y que tanto los promastigotes como los amastigotes intracelulares mantienen valores de pH intracelulares aproximadamente de 7,0, la reducción de Sb^V a Sb^{III} mediada por tioles sería realizada preferentemente en la célula huésped. Otros estudios han demostrado la participación de enzimas específicas en la reducción del Sb^V. Se ha sugerido que enzimas propias de los parásitos como la reductasa I dependiente de tiol (TDR1) que utiliza el glutatión como agente reductor y la *Leishmania* As^V reductasa (LmACR2) participan en el proceso (Denton et al., 2004, Zhou et al., 2004).

Sobre la actividad del Sb^{III} se ha demostrado que tiene alta afinidad hacia ligandos que contienen nitrógeno y sulfídrido presentes en tioles, péptidos, proteínas o enzimas. Se conoce que el Sb^{III} se une al tripanotión T(SH)₂ formando el complejo Sb^{III}-(TS₂) o con un GSH (GS) -Sb^{III}-(TS₂) formando un complejo ternario (Yan et al., 2003). Estos complejos pueden acumularse dentro de la vacuola o ser extruidos por transportadores de casete de unión a ATP (ABC) (Yan et al., 2000, Ferreira et al., 2003). Por lo tanto, el aumento en los tioles totales (Cys, GSH y T(SH)₂) y/o la sobreexpresión del transportador ABC podrían estar asociados a resistencia al Sb^V como se ha observado en cepas *Leishmania* resistente a los metales (Manzano et al. 2013). El Sb^{III} también se une a al sitio activo de la tripanotión reductasa (TR) inhibiendo su actividad enzimática conduciendo a la muerte del parásito y a proteínas de los dedos de zinc al unirse a los residuos de Cys inhibiendo la expresión génica (Baiocco et al., 2009). La TR es la enzima que mantiene el tripanotión como T(SH)₂. La interacción con TR afectaría el metabolismo de T(SH)₂ y GSH intracelular de *Leishmania*, además, la disminución de la concentración de T(SH)₂ aumentaría la posibilidad de daño oxidativo evitando la eliminación de equivalentes reductores para la síntesis

de ADN. Sereno et al., 2014 encontraron que el tratamiento de *L. infantum* con Sb^{III} inducía la fragmentación del ADN provocando un mecanismo similar a la apoptosis (Sereno et al., 2004).

Sobre la actividad del Sb^{III} es importante decir, que éste se ha encontrado en el Glucantime comercial hasta un 30%, lo que indica que la actividad del fármaco podría estar mediada también por esta cantidad residual de Sb^{III} (Salaün y Frezard 2013)

Sobre el segundo modelo, el modelo activo Sb^{V} , se ha demostrado que el Sb^{V} (de SSG) es un inhibidor selectivo de la actividad de la enzima topoisomerasa I del ADN (TopI), enzima que actúa sobre la topología del ADN de doble cadena enredándolo o desenredándolo: rompe las cadenas de ADN y se une covalentemente al ADN a través de un enlace de fosfotirosina (Fosfo-Tyr) presente en el sitio catalítico de la enzima formando un complejo reversible cuando se completa la catálisis enzimática. Cuando se inhibe la TopI el complejo ADN-topoisomerasa se estabiliza, evitando la separación de la enzima del ADN y, por lo tanto, impidiendo su actividad catalítica. Esto ha sido demostrado en *L. donovani* e *in vitro* (Chakraborty y Majumder, 1988). En cepas de *L. (V.) panamensis* resistentes (natural o experimental) al Sb^{V} se encontró una correlación positiva entre la susceptibilidad *in vitro* al Sb^{V} y la formación de complejos de ADN-proteína escindibles, indicativos de inhibición de la TopI (Lucumi et al., 1998). Además, se ha demostrado que el efecto citotóxico de Sb^{III} sobre los amastigotes axénicos de *L. infantum* está asociado con la fragmentación del ADN de los parásitos (Sereno et al., 2001), un tipo de daño que resulta típicamente de la inhibición TopI.

Por otro lado, se ha encontrado que el Sb^{V} puede formar complejos acuosos con ribonucleósidos (Sb^{V} -adenina), los cuales podrían actuar como inhibidores de los transportadores de purinas en *Leishmania*, o ser acumulado intracelularmente encontrando un ambiente de pH neutro e interferir en la vía de recuperación de purinas (Demicheli et al., 2002, Haldar et al., 2011).

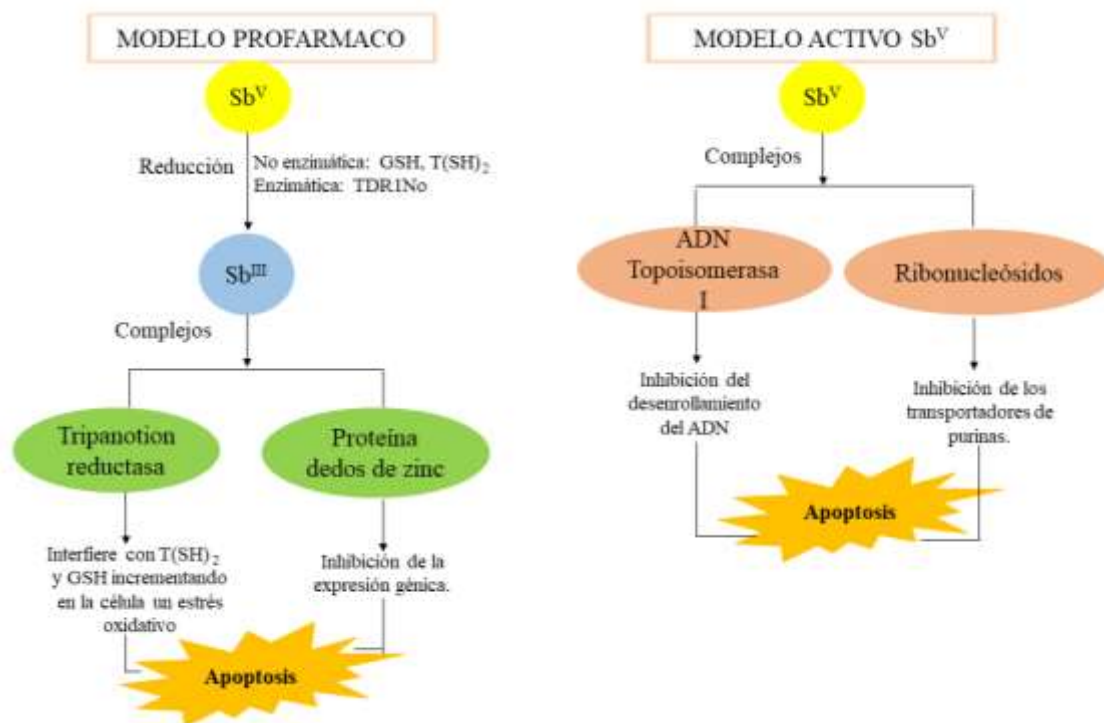


Figura 4. Modelos propuestos del mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes en *Leishmania*.

2.4.3 Toxicidad de los Sb^V. La terapia con antimonio se acompaña generalmente de dolor local durante las inyecciones intramusculares y de efectos secundarios sistémicos, que requieren una supervisión médica muy cuidadosa. Se encuentra que las reacciones adversas a los antimoniales ocurren en más del 64 % de las personas tratadas. Los efectos adversos causados por los Sb^V van de leves a severos. Se ha observado dolor musculoesquelético, trastornos gastrointestinales, erupción cutánea, dolor de cabeza de leve a moderado, pancreatitis aguda, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, anorexia, astenia, fatiga, fiebre, exantema, eritema y urticaria. Daños graves como cardiotoxicidad, insuficiencia renal reversible, pancreatitis, anemia, leucopenia, trombocitopenia y elevación de transaminasas y la amilasa (Franke et al., 1990, Saenz et al., 1991, López-Jaramillo et al., 2010, Oliveira et al., 2011). Franke y colaboradores en el año 1990

determinaron la toxicidad del SSG (20mg/Kg/día por 28 días) IV en 29 pacientes con LM, encontrando mialgias y artralgias en el 83 % de los pacientes, síntomas abdominales en el 28 %, dolor de cabeza en el 21 %. El 10 % de los 29 pacientes presentaron niveles de AST (0,83 a 2,1 U/L), por encima del límite superior de lo normal (0,68U/L). El uso de AM en pacientes con LC, ha mostrado en 54,8% de pacientes una pancreatitis tóxica asociada con aumento de la lipasa sérica y en menor grado de amilasa. Igual se encontraron manifestaciones gastrointestinales en la mitad de los pacientes. Gasser et al., 1994, en diferentes formas clínicas de leishmaniasis, mostraron que el tratamiento con SSG (20mg/Kg/día por 28 días) inducía pancreatitis tóxica la cual estaba asociada con hiperamilasemia y hiperlipasemia (Gasser et al., 1994). El mecanismo involucrado con pancreatitis tóxica no está bien dilucidado. Por otro lado, la cardiotoxicidad asociada al uso de antimoniales podría ser fatal presentando alteraciones como prolongación del segmento QT, extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular, torsión de puntas y fibrilación ventricular, por lo tanto, es importante valorar este parámetro antes de iniciar el tratamiento (electrocardiogramas y estudios de electrolitos) para determinar la cardiotoxicidad-hipocalemia (Ribeiro et al., 1999).

2.4.4. Uso del Sb^V en tratamientos combinados con otros fármacos. Las terapias combinadas con dos o más compuestos constituyen uno de los principales enfoques que buscan reducir el número de dosis de antimonio, al tiempo de tratamiento y efectos adversos de los fármacos en leishmaniasis (Trinconi et al., 2014). El Sb^V ha sido evaluado en combinación con otros fármacos presentando resultados variables. En un estudio realizado con pacientes del África Oriental, el uso del Sb^V (20 mg/Kg/día) en combinación con PM (15 mg/Kg) IM por 17 días, mostró una eficacia y seguridad similar al tratamiento con Sb^V por 30 días (Musa et al., 2012).

El tratamiento con Sb^V en combinación con alopurinol por 15 días, en pacientes infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*, resultó estadísticamente más efectivo que el tratamiento con Sb^V individualmente (Martínez y Marr, 1992). El uso del Sb^V combinado con Pentoxifilina® oral fue más efectivo que el tratamiento individual en lesiones por *L. (V.) braziliensis* (Machado et al., 2007). El uso de Sb^V con inmunomoduladores como el Imiquinod® tópico en pacientes infectados con LC aceleraron el tiempo de curación de las lesiones disminuyendo las secuelas de la enfermedad (Miranda et al., 2005). El uso de Sb^V inyectable con PM tópica por 7 días mostró curación en el 90% de pacientes (similar al tratamiento individual con Sb^V) en un primer estudio y del 58% (no superior al tratamiento individual con Sb^V) en un segundo (Soto et al., 1995, Soto et al., 1998). Combinaciones entre el Sb^V por 28 días con termoterapia no fueron efectivas (Lobo et al., 2006).

Algunas combinaciones con otros fármacos como la combinación de una sola dosis de AmB (5mg/Kg) con MTF a 100 mg/Kg/día por 14 días no resultó ser más efectiva que su uso individual (Sundar et al., 2008). Sin embargo, la combinación de MTF junto con PM y AmB logró niveles de efectividad superiores al 97% (Sundar et al., 2011).

2.4.5 Nuevas tecnologías aplicadas a los fármacos antileishmania. Dada las limitaciones de los fármacos actuales en leishmaniasis (efectos secundarios, fármaco-resistencia, tiempo de los tratamientos) es necesario encontrar nuevas tecnologías que faciliten la administración de los fármacos y el transporte específico a los blancos terapéuticos (Akbari et al., 2017). El diseño de sistemas de liberación de fármacos (SLF, o nano-SLF) de manera controlada y de tamaño nanométrico podrían facilitar la farmacocinética, la eficacia, y toxicidad de los compuestos contra el parásito además de favorecer la entrada de los mismos específicamente a los macrófagos

infectados con el parásito (Muller et al., 2001, Vyas y Gupta, 2006, de Carvalho et al., 2013, Kumara et al., 2014). Se han preparado algunas nanopartículas poliméricas, como las nanocápsulas y nanoesferas las cuales como nano-SLF han mostrado una mejor biodisponibilidad del fármaco, un tiempo de circulación prolongado un período de eliminación rápido por los fagocitos favoreciendo su mecanismo de acción y reduciendo la dosis requerida de los fármacos libres (Kreuter, 2005). Se han preparado nanopartículas conteniendo fármacos como primaquina, AmB, sitamaquina y artemisina (Akbari et al., 2017). Igualmente se han diseñado algunas nanopartículas metálicas las cuales debido a su amplia área de superficie favorece las interacciones con ADN o enzimas (como las implicadas en el metabolismo del tripación) y propiedades fisicoquímicas (reactividad química, producción de radicales de oxígeno), mostrando ser útiles ya sea solas o como nano-SLF (Elechiguerra et al., 2005). Algunas nanopartículas metálicas han sido capaces de inhibir diferentes especies de *Leishmania* (p.ej. nanopartículas metálicas de dióxido de titanio dopado, de selenio, de plata, de sulfato de zinc, las sales de platino, oro y otras (Akbari et al., 2017; de Souza et al., 2018). Las nanopartículas metálicas de selenio presentaron actividad en ratones infectados con *L. major* (Beheshti et al., 2013) y las de plata aumentaron la actividad inhibitoria de la miltefosina (Kalangi et al., 2016).

Sobre los liposomas, estos son vesículas artificiales pequeñas de 80 nm a 100 μ m formadas por bicapas lipídicas de fosfolípidos y algunas veces de colesterol. Mejoran la farmacocinética, biodistribución y liberación continua de los fármacos en los macrófagos infectados por *Leishmania* (Kelly et al., 2011). La AmB-L (AmBisome) fue aprobada por la FDA y constituye un tratamiento estándar para la LV y uno de segunda línea para la LC (Van de Ven et al., 2012). Después de ser endositada por los macrófagos infectados, la AmB se libera y se une al ergosterol del parásito formando poros en su membrana, tal como fue descrito anteriormente. Estudios farmacocinéticos

en ratones infectados con *L. major* mostraron una mayor biodistribución de la AmB después del tratamiento con AmB-L que con la AmB libre, correlacionada ésta con la reducción de la carga parasitaria y del tamaño de la lesión (Wijnant et al. (2017). Su uso en dosis repetidas se encuentra aún restringido debido a su eliminación lenta del cuerpo que propicia la nefrotoxicidad y su alto costo (da Costa Lima et al., 2014). Sin embargo, una dosis única de L-AMB (10 mg/Kg) ha sido efectiva en algunos pacientes (Sundar et al. 2010). Otros sistemas coloidales lipídicos, como las nanoemulsiones, las nanopartículas lipídicas sólidas y los portadores de lípidos nanoestructurados, podría ser una estrategia en la administración de fármacos lipofílicos siendo mucho más biocompatibles y biodegradables (Date et al., 2007). Algunos compuestos como Sb^V, AmB, MTF, PM, curcumina, chalcona, dinitroanilinas, buparvacuona han utilizados estos sistemas como nano-SLF en leishmaniasis (de Souza et al., 2018). Todos estos sistemas de nanoescala podrían ser una estrategia efectiva para el tratamiento de la leishmaniasis, sin embargo, se requieren de más estudios para lograr una terapia efectiva y asequible.

2.5 Variabilidad en la respuesta a los antimoniales

La efectividad en la respuesta a los Sb^V se ve afectada por variables dependientes del parásito (especies, mecanismos de resistencia, infección de los parásitos con algunos virus), el huésped (estado inmune, edad), el fármaco (dosis, farmacocinética, farmacodinámica) y de sus interrelaciones.

2.5.1 Generalidades. Algunas definiciones importantes según la (Eupati, 2015).

Farmacología: estudio de los fármacos: características, interacciones, usos y efectos bioquímicos o fisiológicos en las células, los tejidos, los órganos o el organismo.

Farmacodinámica: rama de la farmacología que estudia los efectos (biológicos y fisiológicos) de un fármaco en el organismo y sus mecanismos de acción en los órganos y las células.

Un estudio de farmacocinética el que permite investigar cómo se procesa un fármaco en el organismo, por lo general mediante la medición de la concentración del fármaco en la sangre, la orina y los tejidos en el transcurso del tiempo. Se usan para caracterizar la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME) de un compuesto.

La tolerabilidad del medicamento: representa el grado en el que un paciente puede «tolerar» o aceptar los efectos adversos.

Fase clínica del desarrollo de medicamentos: es la que involucra humanos

Ensayos no clínicos (preclínica): fase del desarrollo de fármacos en la que se usan animales, células o tejidos (no con humanos) con el objetivo principal de determinar la seguridad de un fármaco (efectos tóxicos, inducción de cambios genéticos y tumores). Se utiliza para planificar los ensayos clínicos con seres humanos, determinar la dosis inicial y el intervalo de las dosis que se van a probar y qué signos clínicos se deben buscar para detectar efectos adversos.

Estudios clínicos: se realizan en cuatro pasos denominados fases y cada uno de ellos está diseñado para responder a distintas preguntas de la investigación.

Toxicidad: se mide en relación con las distintas dosis o la duración del tratamiento con el fármaco. Además, se estudia la posibilidad de neutralizar cualquier efecto secundario.

Toxicología: es el estudio de los efectos tóxicos de las sustancias en los organismos vivos (los síntomas, los mecanismos, los tratamientos y la detección de las intoxicaciones, particularmente

en personas). El principal criterio sobre la toxicidad de una sustancia es la dosis, es decir, la cantidad de exposición a la sustancia.

Una dosis: es una cantidad única y medida de un medicamento que se toma una vez (p. ej., 1 cápsula, 10 ml, 2 gotas, 2 inhalaciones).

El riesgo es la probabilidad de daños o lesiones resultantes del uso de un tratamiento en la práctica clínica o como parte de un estudio de investigación. Los riesgos pueden ser los efectos secundarios del tratamiento o el uso de un medicamento que no es tan eficaz como el tratamiento estándar (durante un ensayo).

Un beneficio es un resultado positivo (por ejemplo, el alivio de los síntomas, la cura o la prevención) derivado del uso de un tratamiento o la participación en un estudio.

La eficacia se refiere a la capacidad de un medicamento de proporcionar un efecto beneficioso (una relación beneficio/riesgo positivo) cuando se estudia en un ensayo clínico (especialmente ensayos clínicos controlados) o estudios de laboratorio. Cuando se habla en términos de eficacia frente a efectividad, esta última se refiere al buen funcionamiento del tratamiento en la práctica de la medicina en el mundo real, una vez el fármaco que está disponible de forma generalizada (un medicamento puede tener una alta eficacia en la reducción de un síntoma X, pero puede tener baja efectividad, ya que causa tantos efectos adversos).

Poder estadístico es la capacidad de una prueba estadística para detectar un efecto, si este existe en realidad. El poder o la sensibilidad de una prueba estadística es la probabilidad de que se rechace correctamente la hipótesis nula. En algunos casos, puede no ser posible rechazar la hipótesis nula no porque sea verdadera, sino porque no tenemos suficientes pruebas contra ella.

El fracaso terapéutico o falla terapéutica (FT) es el fracaso para lograr los objetivos del tratamiento que resulta de una terapia farmacológica inadecuada o inapropiada y que no está relacionada con la progresión natural de la enfermedad.

2.5.2 Factores dependientes del parásito

2.5.2.1 Relacionados con la especie de *Leishmania*. Con respecto al parásito, la leishmaniasis es producida por diferentes especies de *Leishmania* las cuales tienen diferencias intrínsecas entre sí, con tropismos diferentes (dermotrópicas o viscerotrópica), con mecanismos inherentes de virulencia favorecido o no por la presencia de algunos virus de ARN (Bourreau et al., 2016).

La dependencia de la efectividad de los Sb^V relacionada con especie involucrada ha sido demostrada en algunos ensayos clínicos. En Perú, se observó falla terapéutica a los Sb^V del 21,9 %, siendo esta mayor en pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) peruviana* que con *L. (V.) guyanensis* (Arévalo et al., 2007). En Colombia, un estudio realizado con pacientes (soldados provenientes de la Amazonia y Orinoquia) no respondedores por lo menos a un ciclo de Sb^V (20 mg/Kg/día/20 días) mostró que la especie predominante era *L. (V.) braziliensis* (95,4 %) en un área donde coexisten otras especies (Pérez-Franco et al., 2016). Igualmente 35 % de los parásitos aislados mostraron una menor susceptibilidad a los Sb^V *in vitro* comparado con las cepas de referencia (Pérez-Franco et al., 2016). En Guatemala, el tratamiento con Sb^V (20mg/Kg/día/20 días, IV) en pacientes con LC por *L. (V.) braziliensis* y por *L. (L.) mexicana* mostró una eficacia del 96 % y 57 % respectivamente (Navin et al., 1992). En pacientes procedentes de áreas endémicas de Santander (El Carmen de Chucuri, San Vicente de Chucuri, Rionegro, El Playón, Lebrija, Cimitarra y Landáuzuri) en donde *L. (V.) panamensis* es la especie predominante, la efectividad de

los Sb^{V} (20 mg/Kg/día/20 días, IM) ha mostrado una eficacia del 94,8% (López-Jaramillo et al., 2010).

2.5.2.2 Relacionados con las poblaciones de parásitos en una determinada área endémica.

En cepas de *L. donovani* (especie involucrada en LV) obtenidas en el subcontinente indio (ISC), donde la resistencia a los antimoniales es reconocida, resultados de estudios filogenéticos de 204 aislados mostraron dos poblaciones distintas de parásitos: el grupo central (CG, ISC2-ISC10) en las llanuras del Ganges y el ISC1 en las tierras altas de Nepal (Dumetz et al 2018). La resistencia a Sb solo se ha encontrado dentro del grupo CG.

En el laboratorio, las ISC1 fueron más susceptibles al Sb^{III} que la CG y la generación de cepas CG resistentes a Sb^{III} fue más rápida, con menos cambios moleculares, sugiriendo una pre-adaptación a la resistencia. En las cepas CG (resistentes y susceptibles) se encontraron dos amplificaciones intracromosómicas de conjuntos de genes adyacentes, llamados loci M y H (Dumetz, et al., 2018) El locus H se relaciona con la resistencia a Sb^{III} debido a la presencia del gen MRPA (del inglés multidrug resistance protein A,) que codifica para un transportador MRPA de la subfamilia ABCC, involucrado en la resistencia al parásito por secuestrar conjugados metal-tiol ($\text{Sb}^{\text{III}}\text{-SH}$) en vesículas intracelulares de la *Leishmania* (Haimeur et al., 2000). Este amplicón surgió antes de la implementación de antimoniales para la quimioterapia de la LV (Dumetz et al., 2018).

2.5.2.3 Relacionados con el desarrollo de mecanismos moleculares de resistencia: El término resistencia se refiere generalmente al resultado de mutaciones genéticas que disminuyen la respuesta del parásito a un fármaco cuando el parásito está bajo presión del fármaco. En el noreste

de la India, una explicación plausible para la propagación de la resistencia al antimonio en esta región específica, podría ser consecuencia de los altos niveles de arsénico (metal pesado con similitudes con el Sb) que fueron utilizados en el agua potable los cuales pudieron haber llevado a la selección de parásitos con sensibilidad reducida a ambos metales pesados (Perry et al., 2011).

Estudios realizados en el laboratorio con cepas de *Leishmania* generadas *in vitro* o aislados de pacientes refractarios al tratamiento han logrado identificar algunos mecanismos involucrados en la resistencia a los antimoniales en *Leishmania*, tales como: fallas en la reducción del Sb^V a Sb^{III}, fallas de la entrada al fármaco, la inactivación o neutralización del fármaco a través de la unión a tioles, el secuestro de los complejos Sb^{III}-tioles en vesículas, el aumento del flujo de salida del fármaco y también sobreexpresión de enzimas como la triparedoxina peroxidasa (Croft et al., 2006).

Sobre la internalización disminuida del fármaco, se ha encontrado que la proteína AQP1 del parásito, responsable del transporte pasivo de agua, glicerol, urea, polioles y del Sb^{III} al parásito, se encuentra reducida o afuncional (dada la eliminación de genes o la mutación puntual) asociándose con la resistencia de los parásitos al Sb^{III} (Marquis et al., 2005). Parásitos resistentes, transfectados con el gen que codifica para la AQP1 (que expresan nuevamente la proteína), se vuelven susceptibles; y parásitos en donde se reduce la expresión de la proteína o se muta el gen, se vuelven resistentes (Marquis et al., 2005).

Sobre los niveles de tripanotión (tiol fundamental en mantener el potencial *redox* en el parásito), estos se encuentran elevados en algunas cepas resistentes al Sb^{III}. Esto ha sido relacionado con un incremento de las enzimas involucradas en dos de sus precursores: el glutatión (glutamylcisteína sintetasa, GCS) y las poliaminas (ornitina decarboxilasa, ODC). (Mukhopadhyay et al., 1996). Inhibidores de γ -GCS o ODC pueden revertir la resistencia en los parásitos (Haimeur et al., 2000).

La sobreexpresión del gen que codifica la γ -GCS en aislados clínicos resistentes de pacientes con LV de la India, establece por algunos autores, que los tioles representan los determinantes clave de la resistencia antimonial (Singh et al., 2014).

Sobre la inactivación y/o secuestro de los Sb^{III} , este podría deberse al aumento de los niveles de tiol en el parásito, dado que esos pueden formar complejos de antimonio-tiol (Sb^{III} -tioles) inactivando al Sb^{III} , y/o secuestrándolo (en forma de complejo Sb-tiol) por la proteína MRPA en orgánulos intracelulares o bombeándolos directamente (en forma de Sb^{III} libre) al exterior, por un transportador no caracterizado, reduciendo así la cantidad intracelular de antimonio (Sun et al., 2000, Légaré et al., 2001, Yan et al., 2003). (**Figura 5**). Las proteínas transportadoras ABC (casete de unión a ATP), son proteínas altamente conservadas que utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para transportar diferentes compuestos a través de membranas biológicas, incluyendo antimoniales, miltefosina, pentamidina y sitamaquina (Pérez-Victoria JM et al., 2001, Coelho et al., 2003, Ouellette et al., 2004, Castanys-Muñoz et al., 2008). El genoma de *Leishmania* contiene 42 genes ABC, los cuales se encuentran relacionados con las subfamilias ABCC, ABCB Y ABCG. Una sobreexpresión de estas proteínas ABC influye en el flujo de salida de fármaco y puede desempeñar un papel en la resistencia al antimonio en *Leishmania* (Frézard et al., 2014). El transportador ABCC3 (también conocido como PGPA o MRPA) se localiza en las membranas vesiculares intracelulares cerca del bolsillo flagelar del parásito y se ha encontrado que su sobreexpresión confiere resistencia antimonial tanto en amastigotes como en promastigotes al secuestrar conjugados de tiol-metal en vesículas intracelulares en cepas de *Leishmania* resistente al As^{III} y Sb^{III} (Perea et al., 2016). En *L. major* se encontró un nuevo transportador implicado en el flujo de salida del complejo Sb^{III} -tiol de la subfamilia ABCI (LABCI4) (Manzano et al., 2013). Este transportador se ubicó en la membrana mitocondrial y plasmática del parásito. Otros

Esta imagen explica los métodos utilizados por los antimoniales para ingresar al parásito y los mecanismos intracelulares utilizados por el parásito para expresar el fenotipo resistente. ABC; casete de unión a ATP. AQP, aquaporina; DR: resistencia a los medicamentos; IL-10: interleuquina 10; MDR1: proteína de resistencia a múltiples fármacos. Fuente: Ponte-Sucre et al., 2017.

2.5.3 Factores dependientes del huésped. La eficacia de los Sb^V es dependiente del estado inmune del huésped. Esta eficacia se ha visto comprometida en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (caracterizada por la reproducción incontrolada del parásito y numerosas lesiones diseminadas en la piel relacionada con inmunosupresión), coinfectados con VIH u otros eventos que involucren fallas en la respuesta inmune mediada por células tales como inmunosupresión por desnutrición o cáncer (Croft et al., 2006). Igualmente, experimentos realizados en ratones inmunodeficientes (p. ej. A citoquinas como interferón- γ y factor de necrosis tumoral- α , y de células T) han demostrado la dependencia en la eficacia del Sb^V al sistema inmune (Escobar et al., 2001).

En relación con la coinfección *Leishmania*-VIH, esta corresponde del 2 al 9% de todos los casos de LV (aunque en Humera, Etiopía, la tasa de coinfección en pacientes con LV es del 15 al 30%). Resultados de ensayos clínicos en general muestran tasas de curación más bajas, tasas de toxicidad y de mortalidad más altas que los pacientes inmunocompetentes. Aún no se han establecido regímenes de tratamiento óptimos para ninguna región. Una respuesta parasitológica al tratamiento no es indicativa de una ausencia de recaídas futuras, mientras que una respuesta clínica no necesariamente indica un aclaramiento parasitológico. Debido a que aún no se ha logrado la recuperación sin recaídas en pacientes inmunodeprimidos, se debe considerar la profilaxis secundaria, pero hay poca evidencia de su eficacia. (Alvar et al., 2008).

Algunos pacientes con LV-coinfectados con VIH presentan una LV más severa debido a la inmunosupresión, con una respuesta a los Sb^V diversa, en donde del 37,0 – 80,0 % de los pacientes presentan recaídas después del tratamiento (Pintado et al., 2001, Monge-Maillo y López-Vélez, 2016). Diro y colaboradores en el año 2014 realizaron un estudio que incluyó 57 pacientes con infección LV/VIH tratados con Sb^V con dos concentraciones 20 mg/Kg y 850 mg/Kg por 30 días, al final del tratamiento el 43,9 % de los pacientes se curó y el 31,6 % presentó un fracaso del tratamiento parasitológico. En otro estudio similar se comparó la eficacia a los Sb^V en pacientes con LV/VIH positivo frente a pacientes con LV/VIH negativo, un porcentaje de cura menor en los pacientes seropositivos (43,5 %) que en los seronegativos (92,1 %) (Ritmeijer et al., 2001).

Factores relacionados con la edad también están relacionados con la eficacia de los Sb^V, se ha demostrado que los niños con LC tienen una tasa de respuesta más baja a los Sb^V y una tasa de eliminación de antimonio significativamente mayor en comparación con los adultos (Cruz et al., 2007). Un estudio realizado en Cali y Tumaco, Colombia, que incluía niños y jóvenes principalmente el tratamiento con Sb^V (20 mg/Kg/día, IM) en esquemas de 10 y 20 días, mostró una eficacia dependiente de la edad, presentando una baja eficacia (11 % y 25 %) en menores de 5 años, mediana (67 % y 75 %) en niños de 5-14 años y medianamente alta (81 y 83%) en jóvenes de 15 o más años (Palacios et al., 2001).

2.5.4 Factores dependientes del fármaco. Los antimoniales deben administrarse por vía parenteral, diariamente, durante al menos 3 semanas (20 mg de Sb^V/Kg/día durante 20-30 días), pero en los últimos 10 a 20 años se ha observado un aumento de la resistencia clínica. Un ejemplo son los casos presentados en el norte de Bihar en India (Sundar et al., 2000), donde su uso ha sido reemplazado por AmB-L, MTF, PM debido a la resistencia generalizada al antimonio (en el 50-

65% de los pacientes tratados) (Sundar, 2001) y ha requerido el uso de medicamentos alternativos y terapias combinadas p. ej. AmB-L con MTF o AmB-L con PM con tasas de curación del 95 y 97 % respectivamente (Sundar et al., 2008, Sundar et al., 2011). Sin embargo, los Sb^V todavía están en uso en otras regiones del mundo, incluidas América Latina y África Oriental.

Las dosis utilizadas también han estado involucradas en la eficacia. Por ejemplo, dosis menores de Sb^V (10-20 mg/Kg por 10-20 días) mostraron una efectividad del 36 al 100%. El menor valor fue reportado en López de Micay, en Cauca donde de 33 pacientes con LC por *L. (V.) panamensis*, 12 (36%) curaron al tratamiento con Sb^V 20 mg/Kg/día, IM por 15 días (Martínez y Marr, 1992). Este resultado contrasta con el encontrado en Guatemala donde pacientes (soldados) con LC por *L. (V.) braziliensis* mostraron porcentajes de cura del 90 % al tratamiento con Sb^V (20 mg/Kg/día, IV) por 10 o 20 días (Arana et al., 1994); o el realizado en pacientes norteamericanos (militares) donde 100 % y 95 % de los pacientes curaron al tratamiento por 10 y 20 días respectivamente (Wortmann et al., 2002).

Las propiedades farmacocinéticas (PK) de los fármacos en cuanto su absorción, distribución, metabolismo y la excreción (ADME) o su farmacodinámica (PD) en cuanto a sus efectos y mecanismos de acción, también están involucradas en la eficacia a los mismos. Sin embargo, estos dos aspectos para los Sb^V no están muy claros lo cual es una gran falla debido a que no se tiene un marco científico lo suficientemente claro para elegir los medicamentos apropiados (o combinaciones) y sus dosis. La farmacocinética clínica de los fármacos en leishmaniasis permanece en gran parte inexplorada (Verrest y Dorlo, 2017). En general la PK del Sb^V se caracteriza por la rápida excreción renal del fármaco y una vida media terminal larga, posiblemente debido a la conversión intracelular en del Sb^V a antimonio trivalente (Kip et al., 2018). Después de la inyección IM, el antimonio se absorbe rápidamente y la concentración plasmática máxima (C_{max})

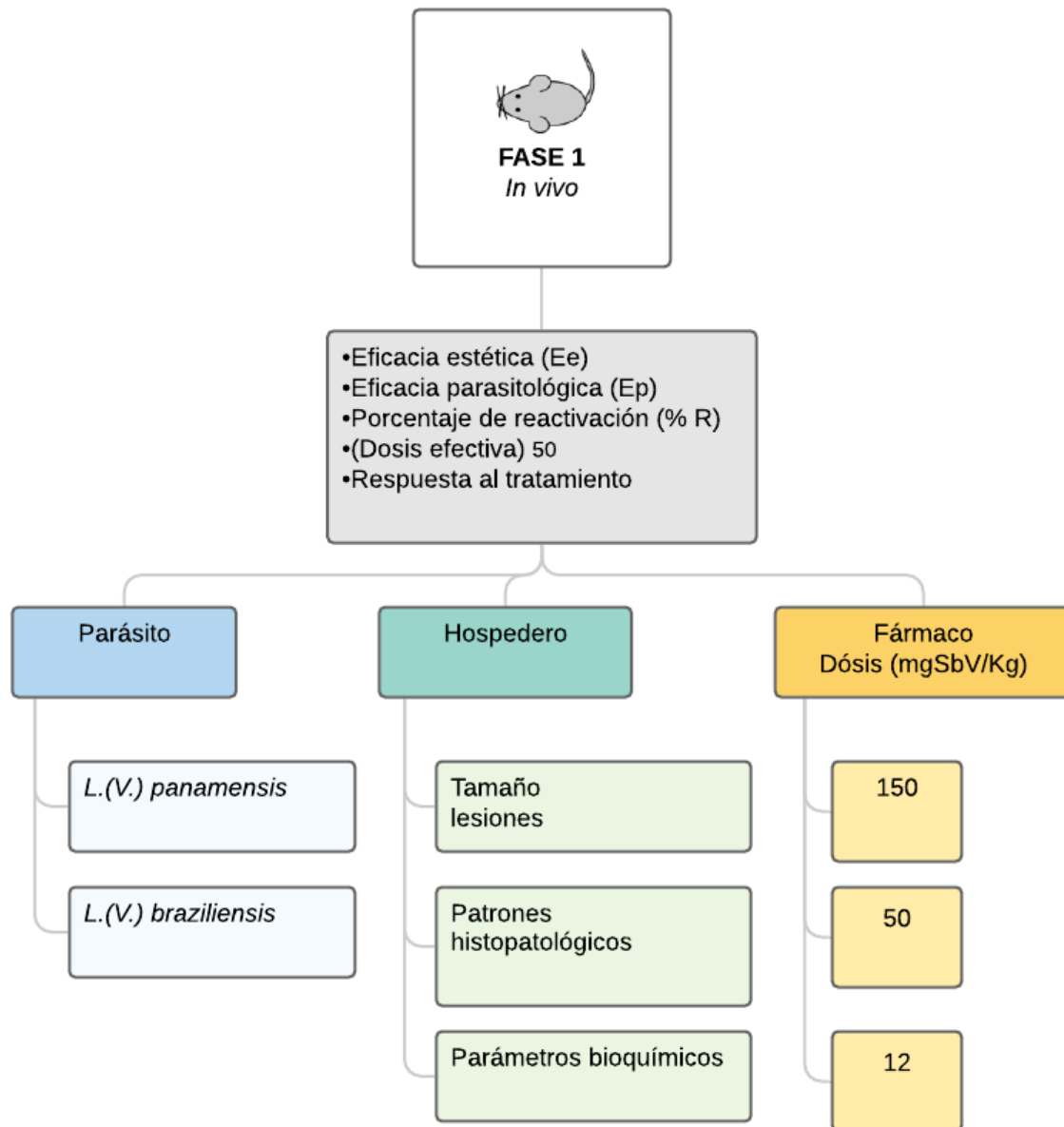
entre 0,5 y 2,0 horas. La mayor acumulación de antimonio en voluntarios humanos fue en hígado> tiroides> corazón; en monos Rhesus fue tiroides> uñas> hígado> vesícula biliar> bazo y en ratas, en bazo> riñón> tiroides> hígado. Al Jaser et al., 1995, identificaron un pequeño retraso en la distribución del compuesto en piel con un tiempo de C_{max} (t_{max}) de 2,1 horas. En las biopsias de piel de pacientes tratados con SSG ~10 mg/Kg/día por 10 días la distribución del antimonio fue similar en las lesiones que en la piel sana. Se han encontrado concentraciones tisulares de antimonio variables después al tratamiento con 10-20 mg Sb/Kg/día por 20 días en pacientes brasileiros. Miekeley et al., 2002 analizando concentraciones de Sb^{III} y Sb^V por separado mostraron la conversión de Sb^V a Sb^{III} del MA, en humanos. Se han encontrado concentraciones de Sb^{III} en orina de 111 $\mu\text{g/L}$, 11 días después de la última inyección de MA. En monos, la proporción de Sb^{III} en relación con el antimonio total aumentó del 5 % al 50 % el día 9, siendo posiblemente el Sb^{III} el radical principal en el plasma durante la fase de eliminación terminal lenta (Friedrich et al., 2012). La ruta principal de excreción de Sb y el aclaramiento de Sb ajustado por peso para adultos de 0,086-0,144 L/hora/Kg estaba en el mismo rango que las tasas normales de filtración glomerular en adultos. Entre el 40 % y el 80 % de la dosis total administrada se recupera en orina dentro de las 24 horas posteriores a la administración (Al-Jaser et al., 1995, Zaghloul et al., 2010). El exceso del antimonio se excreta en forma casi inalterada en su formulación en complejo con compuesto orgánico (Miekeley et al., 2001).

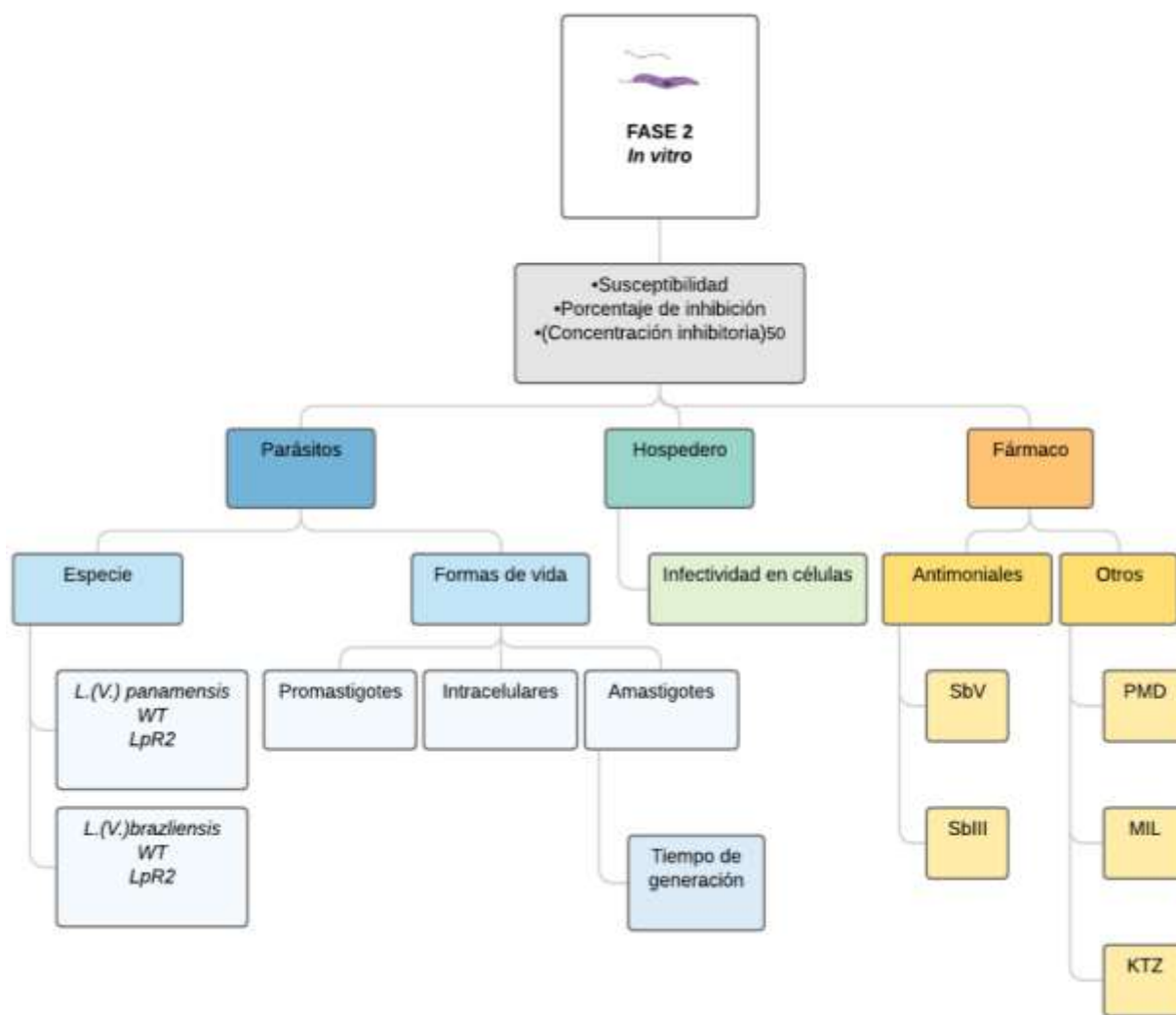
En el estudio mostrado anteriormente (en niños colombianos, ver Cruz et al., 2007) se encontraron diferencias específicas por edad en la PK del antimonio en niños vs. Adultos donde la exposición al fármaco fue significativamente menor en niños que en adultos tratados con el mismo régimen de AM ajustado al peso, lo cual fue relacionado con una mayor tasa de eliminación del antimonio (Cruz et al., 2007).

3. Metodología

El presente trabajo de investigación tipo experimental fue desarrollado en modelos *in-vivo* e *in vitro* y realizado en 2 fases (Ver diseño experimental). En la fase 1 se determinó respuesta al tratamiento con antimoniales pentavalentes (Sb^V) aplicados en tres diferentes dosis en ratones BALB/c con lesiones de LC infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*. En la fase 2 se realizaron ensayos *in vitro* con los parásitos WT y los aislados de las lesiones que presentaron una cura estética pero que posteriormente se reactivaron. Los experimentos contaron con el aval de Comité de Ética de la UIS y fueron realizados en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la UIS y en el Departamento de Patología UIS.

3.1 Diseño experimental.





3.2 Fármacos

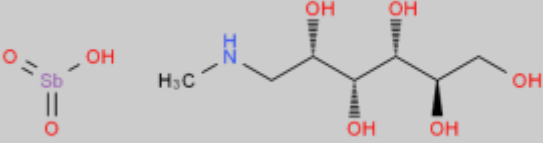
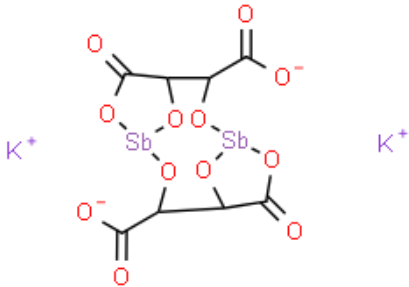
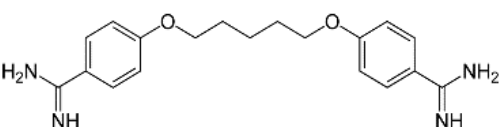
Se utilizó el antimonio de meglumina (AM), Glucantime (de Sanofi Aventis, Brasil, lote 357345) el cual fue donado muy amablemente por la Secretaria de Salud del Departamento de Santander, Colombia. Como fármaco control se utilizó la miltefosina (MTF, Cayman, Michigan, USA) en una formulación tipo gel a base de carbopol conteniendo 0,5% de MTF siguiendo el procedimiento descrito por Neira, et al., 2019.

Adicional al Sb^{V} , en los experimentos *in vitro* (Fase 2), se utilizaron los siguientes fármacos: pentamidina (PMD), ketoconazol (KTZ), y antimonio trivalente (Sb^{III}) los cuales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, St Louis, USA. Las soluciones stock de PMD y KTZ se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, España) y las del Sb^{V} , Sb^{III} y MTF en medio de cultivo Schneider (Sigma-Aldrich).

La estructura del de los compuestos utilizados y algunas de sus características fisicoquímicas se muestra en la **tabla 1**.

Tabla 1.

Estructuras y características fisicoquímicas de los fármacos empleados en el estudio.

Nombre	Estructura	PM (g/mol) Formula	pKa Carga	Solubilidad en agua (mg/ML)
AM		365,98 $\text{C}_7\text{H}_{18}\text{NO}_8\text{Sb}$	12,65	240
Sb^{III}		613,83 $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$	ND	ND
PMD		592,68 $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}_2$	12,13	0,0236

Nombre	Estructura	PM (g/mol) Formula	pKa Carga	Solubilidad en agua (mg/ml)
KTZ		531,43 $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$	6,75	0,0866
MTF		407,58 $C_{21}H_{46}NO_4P$	1,88	0,00022

Nota: AM: antimonio de meglumina, Glucantime; Sb^{III}: Tartrato de antimonio (III) y potasio; PMD: pentamidina; KTZ: ketoconazol; MTF: miltefosina; PM: peso molecular; ND: no determinado.

3.37 Parásitos de *Leishmania*

3.3.1 Cepas nativas o WT. Se utilizaron dos especies de *Leishmania*: *L. (V.) panamensis* (ATCC, MHOM/PA/71/LS94) y *L. (V.) braziliensis* (ATCC, MHOM/BR/75/M2903). Los promastigotes fueron cultivados en medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor (SFBi) (Gibco, New York, USA) a una temperatura de 28 °C. Se realizaron pases continuos de parásitos semanalmente.

3.3.2 Cepas reactivadas ®. Adicionalmente (para los experimentos de la fase 2, *in vitro*), se utilizaron parásitos obtenidos de las lesiones de ratones tratados con Sb^V que después de disminuir el tamaño de sus lesiones al 100 % estas reactivaban (ver numeral 3.9.1). Estos promastigotes fueron mantenidos en cultivo tal como se describió para la WT y crio preservados a -80°C para estudios posteriores.

Los parásitos utilizados en el estudio fueron los codificados como *LpR2* y *LbR1* aislados de ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente que fallaron al tratamiento con 150 mg Sb^V/Kg/día por 29 días.

3.4 Animales

Se utilizaron ratones del linaje BALB/c de ambos sexos, procedentes del Instituto Nacional de Salud, con 10 a 12 semanas de edad y masa corporal de 25-30 gramos. Los animales fueron alojados en cajas especiales en la Unidad Experimental en Animales /UIS Guatiguará a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) con agua y comida *ad libitum*, humedad relativa ambiental (50-70 %), luminosidad de ciclos luz/oscuridad de 12 horas.

3.5 Consideraciones éticas

Se contó con el aval del Comité de Ética en la Investigación Científica (CENCI) de la UIS (Acta No. 17). Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo la Ley 84 de 1989 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.

3.6 Procedimiento de 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. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* 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.

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

De una manera general, 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 área de la lesión fue calculada en mm^2 teniendo en cuenta la medida del diámetro longitudinal y transversal. Esto se realizó semanalmente desde que los ratones empezaron a mostrar las lesiones, durante el tratamiento y hasta el final del experimento. Los animales fueron sacrificados utilizando una mezcla de anestésicos: xilacina (Virbac, México) y ketamina (Holliday-Scott S.A, Buenos Aires, Argentina). Los tiempos utilizados dependieron de cada experimento como se irá diciendo adelante en cada metodología.

La sangre fue recolectada por punción cardiaca con una jeringa de un mililitro la cual fue colocada en viales para procesar y realizar posteriormente con el suero obtenido las pruebas bioquímicas: Se diseccionó la lesión y se tomaron improntas apoyando un portaobjetos sobre el tejido lesionado. Se recolectaron fragmentos de la lesión, piel, bazo, hígado, riñón, páncreas y

corazón en recipientes conteniendo una solución de formalina tamponada al 10 % (Ph 7,0) para estudios histopatológicos (numeral 3.8.5.5).

3.8 Evaluación del efecto del tratamiento con Glucantime intralesional (IL)

3.8.1 Tamaño de muestra. Se calculó utilizando software G Power (Statistical Power Analyses 3.1.9.4 for Windows). El tamaño de muestra ideal se calculó asumiendo un α de 0,05 y un poder de prueba del 80% utilizando la formula derivada de la prueba t de la siguiente manera:

$$N = 1 + 2 C \left(\frac{s}{d} \right)^2$$

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.

3.8.2 Grupos experimentales. Los ratones infectados fueron divididos en tres grupos experimentales para cada una de las especies de parásitos utilizadas, tal como se describe en la **tabla 2**.

Tabla 2.

Grupos experimentales (ensayos in vivo) para cada especie de Leishmania

Grupo	N	Fármaco	Concentración del fármaco	Vía de aplicación	Dosis	Días PT
1	6	Glucantime	150,0 mg/Kg	Intralesional	29	60
	6		50,0 mg/Kg			60
	6		16,6 mg/Kg			60
2	2	MTF	0,5 %	Tópico	20	15

Grupo	N	Fármaco	Concentración del fármaco	Vía de aplicación	Dosis	Días PT
3	2	Sin fármaco	0 (solución salina)	Intralesional	29	60

Nota: N: Número de animales por grupo; MTF: miltefosina; PT: días postratamiento en que los ratones fueron sacrificados.

3.8.3 Esquema del tratamiento. Los ratones infectados para cada especie de *Leishmania*, fueron tratados intralesionalmente con 100 µL de Glucantime por 29 días en tres diferentes concentraciones (mg/Kg de peso/día), ver **tabla 2**. El gel de MTF fue aplicado tópicamente sobre las lesiones una vez al día por 20 días. Como control negativo, los ratones recibieron 100 µL de suero fisiológico intralesionalmente.

3.8.4 Determinación del tiempo final del experimento. Para determinar el tiempo de sacrificio postratamiento se realizó una prueba piloto. Los ratones infectados con cada especie de *Leishmania* fueron tratados con 150 mgSb^V/Kg/día de Glucantime intralesional por 29 días (N = 4). Los ratones fueron sacrificados en diferentes tiempos postratamiento (15, 22, 29, 42 días). Cada día se sacrificó un ratón. Para determinar este tiempo final se tuvo en cuenta un tiempo después de la cura estética, esto para evaluar la posibilidad de reaparición (reactivación) de las lesiones.

3.8.5 Evaluación de la respuesta al tratamiento

3.8.5.1 En las lesiones: Semanalmente y hasta por dos meses postratamiento se realizó seguimiento del tamaño de las lesiones, tal fue descrito anteriormente (numeral 3.7).

El porcentaje de reducción del área de lesión se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de reducción del área de lesión} = \frac{(Ai - Af) * 100}{Ai}$$

Donde, Ai : Área de la lesión al inicio del tratamiento, Af : Área de la lesión finalizado el seguimiento.

Se determinó la eficacia estética (E_e) al tratamiento teniendo en cuenta el porcentaje de ratones que redujeron el tamaño de las lesiones entre el 75 y 100 % en los diferentes tiempos postratamiento.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del porcentaje de reducción del área de la lesión en cada una de las dosis de Sb^V utilizadas en los ratones, se determinó la dosis efectiva (DE)₅₀ definida como la concentración de Sb^V que reduce el 50% del tamaño de las lesiones. La DE ₅₀ se calculó por regresión sigmoideal utilizando el software MxslfitTM (ID Business Solution, UK).

3.8.5.2 En los parásitos: La presencia de parásitos fue determinada a partir de improntas (ver numeral 3.7) tomadas directamente de las lesiones y de biopsias de los órganos. Para las improntas, se tomó un fragmento de la piel y/o lesión y se realizó una impronta en láminas portaobjetos. Las láminas fueron fijadas con metanol, coloreadas con Giemsa y observadas por microscopia óptica. Las biopsias fueron procesadas tal como se describirá en el numeral 3.8.5.5. Los resultados fueron expresados utilizando una escala semicuantitativa de clasificación: -, ausentes, +, escasos; ++, moderados; +++, abundantes.

Se determinó la eficacia parasitológica (E_p) teniendo en cuenta el porcentaje de ratones sin (ausentes) parásitos al análisis microscópico de improntas y biopsias de lesiones y órganos.

3.8.5.3 En el peso, signos de dolor, y bienestar animal: Los ratones fueron pesados semanalmente en una balanza de brazo (Ohaus, Florham Park, USA). Diariamente, durante el

tratamiento los ratones fueron observados para determinar si presentaban signos de dolor o pérdida del bienestar según lo descrito en la tabla 3 y figura 6.

Tabla 3.

Signos de pérdida del bienestar animal, basados en la observación del peso corporal respuesta al manejo, apariencia y piel

CENTRO DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES TROPICALES (CINTROP)		
UNIDAD EXPERIMENTAL EN ANIMALES		
SIGNOS DE PERDIDA DE BIENESTAR SEGÚN LÍNEA DE INVESTIGACIÓN		
Código de caja:	Animal #:	edad: Sexo: Responsable:
Observación	Evaluación	Fecha de monitoreo
Peso corporal		
Normal o disminución <5%		
Disminución 5-10 / 10-15 / 15-20%		
Disminución >20%		
Respuesta al manejo		
Normal		
Ligeramente disminuido/aumentado		
Muy disminuido/aumentado, agresivo		
Apariencia		
Esteriotipias		
piloerección		
Piloerección y exudado nasal/ocular		
Automutilaciones		
Deshidratación		
Piel		
Picor		
enrojecimiento		
hinchazón		
lesiones de rascado		
color amarillo y/o rojizo		
formación de costras		
descamación		
exudación		
perdida de pelo a parches		
alopecia		
Tumores		
Tamaño inferior a 2 cm ³ / 40cm ³		
Tamaño superior a 2 cm ³ / 40cm ³		
Necrosis, ulceración y/o sangrado		
* presencia: 1 ; ausencia: 0 0-5: aumentar la frecuencia de revisión 6-11: consultar al veterinario 12-21: valorar eutanasia Observaciones:		



Figura 6. Representación gráfica de los signos de dolor expresados por el ratón.

En la columna 1 se muestra las expresiones corporales normales, columna 2 dolor moderado y columna 3 dolor severo, los signos de dolor a evaluar son aprensión ocular, abultamiento nasal, abultamiento en las mejillas, posición de las orejas y cambios en la posición de los bigotes.

3.8.5.4 En los parámetros bioquímicos sanguíneos: Después del sacrificio, se obtuvo sangre por punción cardiaca. La sangre fue centrifugada a 3500 rpm por 10 min, y el sobrenadante fue recolectado en viales estériles. Se determinaron parámetros bioquímicos tales como: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), urea y α -amilasa utilizando pruebas comerciales (BioSystem, Costa Brava, Barcelona). Los resultados fueron expresados en unidades por litro (U/L). Los valores fueron comparados con los valores de referencia obtenidos de sueros de ratones no tratados en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP.

3.8.5.5 En los parámetros histopatológicos: Los fragmentos de lesión y órganos fijados con formalina (ver numeral 3.7) fueron embebidos en parafina. Cortes de 5 micras fueron realizados con un micrótopo 2135 (Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, USA) y colocados sobre una lámina portaobjetos. Estos fueron deparafinizados y posteriormente coloreados con hematoxilina-eosina para ser analizados microscópicamente.

Los experimentos del procesamiento de las biopsias fueron realizados en el laboratorio del Departamento de Patología de la Escuela de Medicina, bajo la asesoría del profesor Julio Cesar Mantilla. Los resultados fueron expresados utilizando una escala semicuantitativa ajustada a cada patrón histopatológico utilizando una escala semicuantitativa de clasificación: -, ausencia, +, leve; ++, moderado; +++, severo. Los parámetros histopatológicos tenidos en cuenta en cada órgano fueron:

En las lesiones en piel: en la epidermis se determinó la acantosis (aumento en la proliferación celular), hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo y queratina), paraqueratosis (núcleos en las células del estrato córneo), espongiosis (visualización de los desmosomas), exocitosis. En la dermis se determinó la presencia de infiltrado inflamatorio (invasión de leucocitos), de

granulomas (acúmulo de células inflamatorias), de fibrina y leucocitos y la presencia de células plasmáticas, macrófagos, linfocitos, eosinófilos, polimorfonucleares, bacterias. En el bazo: se determinaron nódulos linfáticos activados, hiper celularidad, presencia de células plasmáticas. En el hígado: la presencia de aglomeración de capilares, sinusoides, fibrosis, granuloma y necrosis.

En el riñón: se determinó el depósito de amiloideo en membrana basal, glomerulonefritis mesangioproliferativa, granuloma.

En el corazón: fibrosis intersticial. En el páncreas: inflamación del conducto interlobulillar e islotes de Langerhans. En todas las biopsias se determinó la presencia o ausencia de parásitos.

Los resultados de la prueba histopatológica de los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*, tratados con la máxima concentración de Glucantime fueron comparadas con los ratones control.

3.8.6 Análisis de resultados (fase 1)

3.8.6.1 Variables estudiadas: En la tabla 4 se muestra el resumen de los ensayos realizados in vivo, variables y unidades

3.8.6.2 Eficacia del tratamiento: Para el análisis de la eficacia al tratamiento se tuvieron en cuenta los resultados de: eficacia estética (Ee) (porcentaje de ratones que redujeron el tamaño de las lesiones entre el 75 y 100 %, eficacia parasitológica (Ep) [porcentaje de ratones sin parásitos en las lesiones u órganos (ausentes) según los métodos utilizados] y la eficacia final (Ef): Ee más Ep al final del experimento. Para determinar la actividad del SbV en inhibir el 50% de las lesiones se calculó la DE50 tal como se describió anteriormente.

Adicionalmente, la respuesta al tratamiento se clasificó según Wortmann et al., 2002 como:

100 % de las lesiones, 100 % de re-epitelialización y ausencia de parásitos en improntas y cortes histopatológicos); respuesta parcial (reducción del 75 - 99 % de las lesiones); respuesta estable (reducción del 0 - 74 %); no efectivo (aumento de las lesiones).

La recaída (reactivación) se definió como la aparición de una nueva lesión en un sitio previamente cicatrizado o nuevas lesiones a lo largo de la vía de drenaje linfático de la lesión original. Se calculó el porcentaje de reactivación (% R) = número de ratones que reactivaron *100/6

3.8.6.3 Factores asociados al parásito: Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en la eficacia al tratamiento IL con Sb^V entre las dos especies de *Leishmania* utilizadas se utilizó una prueba t student. Se consideró un nivel de significancia estadística: $p < 0,05$.

3.8.6.4 Factores asociados al hospedero: Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en la eficacia al tratamiento IL con Sb^V con el tamaño y las características de las lesiones antes del tratamiento, con los patrones histológicos resultantes, parámetros bioquímicos, peso, etc.

La distribución de las variables cuantitativas se determinó mediante ANOVA de dos vías y la comparación multiple mediante la prueba Turkey, la distribución normal se comprobó mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov.

La comparación estadística del área de lesión de los ensayos se utilizó una prueba t student.

Se hizo un análisis cualitativo con respecto a los patrones histopatológicos, en donde dos patrones: un patrón de cura y uno de no cura. Estos se obtuvieron con los encontrados en este y trabajos previos, con el tratamiento tópico con miltefosina (patrón de cura) y con los resultados de un tratamiento que no cura (p. ej. Solución salina o KTZ tópico), se realizó mediante la prueba Mann Whitney U test

Se consideró un nivel de significancia estadística: $p < 0,05$.

3.8.6.2 Factores asociados al fármaco: Se determinó si existían diferencias significativas en la eficacia al tratamiento IL con Sb^V entre las dosis utilizadas. Los resultados fueron analizados mediante el área bajo la curva, se calculó mediante el software GraphPad SigmaStat en su versión 3,1 para Windows O.S. Se consideró un nivel de significancia estadística: $p < 0,05$

Tabla 4.

Resumen de los ensayos realizados in vivo, variables y unidades

Dosis utilizadas	mg Sb ^V /Kg/día, intralesional	150
		50
		16,6
Especie de <i>Leishmania</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>	
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	
Esquema de tratamiento	29 días de tratamiento, seguimiento hasta por 60 días postratamiento (PT)	
Tamaño de lesiones	Evolución semanal de las lesiones, cálculo del diámetro en mm ²	
Aspecto de las lesiones	Fotografías	Nódulo
		Úlcera
		Fondo de lesión
Porcentajes de reducción de la lesión	Tamaño antes versus tamaño PT (en diferentes tiempos) x 100%	Antes del tratamiento
		43 días PT
		60 días PT (fin del experimento)
Controles	Solución salina	100 µL/día por 29 días, IL

Peso	Gel de miltefosina 0,5% gramos	Una dosis diaria por 20 días Peso semanal antes y PT
Signos	Presentes, ausentes	Observación de comportamiento y expresiones corporales
Parásitos	Microscópicamente clasificados en: -, ausentes, +, escasos; ++, moderados; +++, abundantes	En improntas de lesiones y órganos
	Porcentaje de ratones que redujeron el tamaño de las lesiones entre el 75 y 100 %	En biopsias de lesiones y órganos
	Porcentaje de ratones sin parásitos (ausentes) en improntas y biopsias	Eficacia estética (E_e) en diferentes días PT
	Porcentaje de ratones que reducen entre el 75-100 % el tamaño de sus lesiones y muestran ausencia de parásitos al final del experimento	Eficacia parasitológica (E_p) al final del experimento
Respuesta al tratamiento con Glucantime	Porcentaje de ratones que después de reducir el 100% del tamaño de las lesiones, estas volvían aparecer	Eficacia final (E_f): E_e más E_p al final del experimento
	Porcentaje de ratones que después de reducir el 100% del tamaño de las lesiones, estas volvían aparecer	Porcentaje de reactivación (% R) = número de ratones con reactivación * 100 / 6
	Dosis de Sb^V que reduce el 50 % del tamaño de las lesiones (DE) ₅₀	Dosis de 150, 50 y 16,6 mg Sb^V /Kg/día versus porcentaje de inhibición del tamaño de las lesiones
	Respuesta al tratamiento según Wortmann et al., 2002	Completa (100 % de reducción, 100 % de re-epitelialización y ausencia de parásitos); parcial (75 - 99 % de reducción); estable (0 - 74 % reducción); no efectivo (aumento de las lesiones)
Estudio histopatológico en lesión	Microscópicamente clasificados como (-), ausencia, (+), leve; (++) moderado; (+++) severo	Acantosis
		Hiperqueratosis
		Necrosis
		Infiltrado inflamatorio
		Linfocitos
		Macrófagos
		Neutrófilos
		Células gigantes

Estudio histopatológico en órganos	Microscópicamente clasificados como (-), ausencia, (+), leve; (++) moderado; (+++) severo	Amastigotes
		Agl.de sinusoides
		Necrosis hepática
		GN mesangial
		I. de Langerhans
		N. linfáticos (bazo)
Parámetros bioquímicos	Valores normales (VN): 91-142,12 U/L	Amastigotes
		AST
		ALT
		Urea
		α -Amilasa

3.9 Evaluación de la susceptibilidad a fármacos y características biológicas *in vitro*

Los experimentos descritos a continuación se realizaron en las cepas de *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* nativas (WT) y de las obtenidas de lesiones que se reactivaron al tratamiento con 150 mg/Kg/día por 29 días (Ver numeral 3.5)

3.9.1 Aislamiento de parásitos de las lesiones (reactivadas) postratamiento. Después del sacrificio, se tomó un fragmento de la lesión en condiciones estériles, la cual fue colocada en tubo y macerada con el embolo de una jeringa en medio de cultivo. Posteriormente 500 μ L del macerado fue cultivado en medio Schneider-10% SFBi a 28°C. Los parásitos aislados obtenidos de la reactivación fueron codificados como *LpR2* y *LbR1*, donde *Lp* es *L. (V.) panamensis* y *Lb* es *L. (V.) braziliensis*

3.9.2 Obtención de amastigotes axénicos. Los amastigotes axénicos fueron obtenidos a partir de promastigotes (30×10^6 promastigotes/mL) realizando cambios progresivos en la temperatura (de 27 a 32 °C) y del pH (de 7,0 a 5,5) del medio, según lo descrito en Casadiego, 2018.

3.9.3 Actividad antiparasitaria de los fármacos

3.9.3.1 En las formas libres de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*: Los promastigotes (2×10^6 parásitos/mL) y los amastigotes axénicos ($2,5 \times 10^6$ amastigotes axénicos/mL, después de 8 días de transformación) fueron tratados por triplicado con 4-6 diluciones seriadas 1:3 y 1:5 de los fármacos Sb^V, Sb^{III} a partir de 900 µg/mL de Sb, durante 72 horas a 28°C y 32°C respectivamente. 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 están vivos y oxidada a un color azul cuando los parásitos están muertos. 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 ecuación (Bio-Rad, 2017.):

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

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; R2: E del resazurina reducido a 600 nm; A1: Absorbancia de los pozos tratados 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

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

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{\% \text{ reducción en células tratadas}}{\% \text{ reducción del control positivo}} \right) \right] * 100$$

Finalmente, la actividad *in vitro* de los fármacos tanto en promastigotes como en amastigotes axénicos de *L. (V.) panamensis* *L. (V.) braziliensis* y cepas aisladas fue expresada como la concentración capaz de inhibir el 50 % y 90 % de los parásitos (CI₅₀ y CI₉₀) calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxslfit™ (ID Business Solution,UK) (Neira, Stashenko, y Escobar, 2014). Este experimento fue realizado dos veces.

3.9.3.2 En las formas intracelulares: Se utilizaron células THP-1 (monocitos humanos ATCC TIB-202) como células hospederas las cuales fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado al 10% de SFBi a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Las células fueron diferenciadas a su fenotipo adherente utilizando forbol miristato acetato (PMA, Sigma-Aldrich) por 72 horas antes de los experimentos de infección.

Las células THP-1 diferenciadas fueron infectadas con promastigotes de *Leishmania* en fase estacionaria en una proporción parásito: célula de 5:1 por 24 horas a temperatura de 32 °C 5 % CO₂. Las células infectadas fueron tratadas con diluciones seriadas 1:3 de Sb^{III} (66,6 - 200 µg/mL) y Sb^V (100 a 900 µg/mL) durante 5 días a 32°C con recambio de compuestos al 3 día. Las células control fueron mantenidas en medio de cultivo. Las células fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. La actividad de los antimoniales fue determinada por conteo microscópico en un total de 300 células (infectadas y no infectadas). La actividad de los antimoniales fue expresada como la concentración inhibitoria 50 y 90 (CI₅₀ y CI₉₀), calculada por análisis de regresión sigmoideal. Este experimento fue realizado una vez.

3.9.4 Caracterización biológica in vitro de las cepas de Leishmania

3.9.4.1 Cinética de transformación promastigotes-amastigotes: Para determinar el tiempo de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos (tAmA) diariamente y por 10 días se realizó recuento microscópico tanto de promastigotes como amastigotes axénicos en cámara de Neubauer, utilizando eosina amarilla al 0,25 % (Merck, Darmstadt, Alemania) para distinguir los parásitos vivos de los muertos. Los resultados fueron expresados gráficamente como el número de parásitos/mL versus los días de cultivo. Este experimento fue realizado por triplicado. Adicionalmente, se realizaron extendidos diarios de los parásitos en láminas portaobjetos, los cuales fueron fijados con metanol y coloreados con Giemsa, para determinar las características morfológicas. Se tuvo en cuenta: la agrupación (individual, duplas, cadenas); la forma del cuerpo celular (elongada, circular, ovoide); y el flagelo (presente, ausente, restringido al bolsillo flagelar).

3.9.4.2 Ensayos de infección en células: Las células THP-1 diferenciadas fueron infectadas con promastigotes de Leishmania en fase estacionaria en una proporción parásito: célula de 5:1 por 24, 48 y 72 horas a temperatura de 32 °C, 5 % de CO₂. Las células fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Los porcentajes y rangos de infección fueron determinados por conteo microscópico de células infectadas, no infectadas y el número de amastigotes por célula en 100 células. Los resultados fueron expresados semicuantitativamente de acuerdo con los intervalos de infección establecidos de la siguiente manera: 0, 1-10, 11-20 y >20 amastigotes/célula. Este experimento fue realizado dos veces.

3.9.5 Análisis de resultados (fase 2)

3.9.5.1 Variables estudiadas: En la tabla 5 se muestra el resumen de los ensayos realizados in vivo, variables y unidades

3.9.5.2 Susceptibilidad al Sb^V: Se tuvieron en cuenta la susceptibilidad al Sb^V, Sb^{III} y fueron determinadas por medio de una ANOVA de dos vías

3.9.5.3 Factores asociados al parásito: Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en la susceptibilidad al Sb^V entre las dos especies de Leishmania utilizadas, las diferentes formas de vida evaluadas fueron determinadas por medio de una ANOVA de dos vías, las diferencias estadísticamente significativas en la transformación de promastigotes a AMA se calculo mediante una prueba t multiple para cada día.

3.9.5.4 Factores asociados al hospedero: Se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de la infección de las células y entre las cepas infectantes estas diferencias fueron analizadas por medio de una ANOVA de dos vías.

3.9.5.5 Factores asociados al fármaco: Las diferencias estadísticamente significativas entre los fármacos evaluados (Sb^V, Sb^{III} PDM, KTZ y MTF) y las especies de Leishmania se realizaron mediante una ANOVA de dos vías. En todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de significancia estadística: $p < 0,05$

Tabla 5.

Descripción de los experimentos, variables, unidades de en ensayos in vitro

Parásitos de <i>Leishmania</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>	<i>Lp</i> WT: cepa nativa	
		<i>Lp</i> R2: cepa reactivada	
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Lb</i> WT: cepa nativa	
		<i>Lb</i> R1: cepa reactivada	
Fármacos	Glucantime Sb ^V (405 mg Sb ^V , lote 357345)		
	Antimonio trivalente (Sb ^{III})		
	Pentamidina (PMD)		
	Ketoconazole (KTZ)		
	Miltefosina (MTF)		
Susceptibilidad a fármacos	Promastigotes	% de inhibición de los parásitos	
	Amastigotes axénicos	Concentración inhibitoria (CI ₅₀) en µM	
	Amastigotes intracelulares		
Transformación promastigotes/ amastigotes	Número de promastigotes/amastigotes/día durante 10 días		
Infectividad en células	Porcentajes de infección	24, 48, 72 horas postinfección	% de células infectadas
	Número de amastigotes/células		Rango: 0, 1-10, 11-20- mayor de 20 amastigotes/células

4. Resultados

A continuación, se muestran los resultados que se encontraron de los experimentos realizados en la fase 1 (*in vivo*) y en la fase 2 (*in vitro*). El orden que se utilizará para mostrar los resultados encontrados en cada fase será: 1. Implementación de la fase (experimentos pilotos, obtención de parásitos, establecimiento de las condiciones del ensayo, controles, etc.) 2. Resultados encontrados sobre la respuesta a los Sb^V en términos de eficacia y actividad (DE₅₀) y aspectos relacionados

con la reactivación; 3. Relación de los resultados de efectividad con factores dependientes de los parásitos, el huésped y el fármaco.

4.1 Resultados fase 1 *in vivo*

4.1.1 Implementación

4.1.1.1 Esquema de tratamiento: El esquema del tratamiento que se llevó a cabo se encuentra representado gráficamente en la figura 7. La aplicación del tratamiento IL se realizó como se describió en la metodología en el ítem 3.8.3



Figura 7. Esquema del tratamiento intralesional con Glucantime.

4.1.1.2 Tiempo de seguimiento postratamiento (PT): Para determinar el tiempo de observación de los animales después del tratamiento (días PT), los ratones infectados con las dos especies de *Leishmania* fueron tratados con 150 mg Sb^V/Kg/día por 29 días y sacrificados los días

15, 22, 29, 42 PT. La prueba piloto mostró que los ratones sacrificados los días 15, 22 y 29 días PT (ver figura 8 como R1, R2 y R3 para cada una de las especies de *Leishmania*) mostraron una inhibición del 100 % en el tamaño de las lesiones. No se observaron microscópicamente parásitos en las improntas (dato no mostrado). Sin embargo, 42 días PT, el ratón R4 de cada especie de *Leishmania* reactivó la lesión, figura 8. Se determinó que, para los ensayos realizados en este trabajo, los ratones serían sacrificados 60 días PT para así, determinar la efectividad y poder alcanzar a evaluar la reactivación de las lesiones en caso de que esta se presentara.

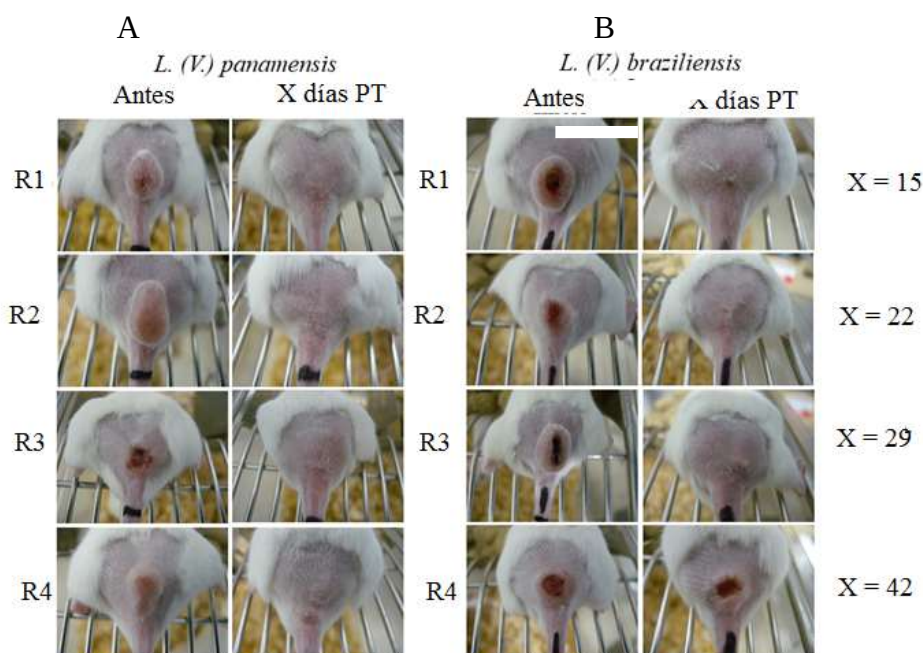


Figura 8. Evaluación de la efectividad del tratamiento intralesional con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días en diferentes días postratamiento (PT). Las fotos muestran las lesiones de los ratones (R1–R4) infectados con A. *L. (V.) panamensis* y B. *L. (V.) braziliensis* antes del tratamiento (primera columna en cada especie) y en los diferentes días PT en que fueron sacrificados (X= 15, 22, 29, 42 días). N = 1.

4.1.1.3 Respuesta a al gel de miltefosina (fármaco control): El tratamiento tópico con el gel de 0,5% MTF aplicado tópicamente por 20 días presentó una eficacia del 100% en los ratones

infectados con las dos especies de *Leishmania*. No se observó la presencia de parásito en improntas de piel y biopsias. En los estudios histopatológicos se observó una epidermis normal, en la dermis un infiltrado inflamatorio leve, los órganos evaluados (hígado, bazo y riñón) no presentaron daño ni presencia de parásitos.

4.1.2 Efectividad a los Sb^V en los ratones infectados con las dos especies de parásitos.

Como se observa en la tabla de variables (**Tabla 4**), los resultados obtenidos de la respuesta al Glucantime (Sb^V) se expresaron en términos de: eficacia estética (E_e), antes, al final del tratamiento y en diferentes días PT; la eficacia parasitológica (E_p) al final del experimento; la eficacia final (E_f) E_e más E_p al final del experimento; la actividad de los Sb^V en términos de DE₅₀; y según la clasificación de la respuesta al tratamiento utilizada por Wortmann et al., 2002. el porcentaje de reactivación (% R);

4.1.2.1 Efecto del tratamiento con Glucantime en las lesiones (E_e): El resumen de los resultados de E_e obtenidos al tratamiento con A. 150 mg Sb^V/Kg/día; B. 50 mg Sb^V/Kg/día; y C. 16,6 mg Sb^V/Kg/día al final del tratamiento (día 29) y 43 y 60 días PT para *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* se muestran en la en la tabla 6 y 7 respectivamente.

Infectados con *L. (V.) panamensis* (150 mg)

Los ratones mostraron una E_e del 83 % al final del tratamiento y 43 días PT y una E_e del 66,6 % al final del experimento (60 días PT).

Teniendo en cuenta el tamaño de las lesiones (mm²) antes y después del tratamiento (porcentaje de inhibición, Ver **tabla 6**) se observó que 83,3 % (5 de 6 ratones) de los ratones infectados con *L. (V.) panamensis*, disminuyeron el tamaño de sus lesiones entre un 75-100 % al final del

tratamiento y 43 PT. Sin embargo, 60 días PT, se observó la reactivación de la lesión en uno de los ratones (Ver R6 **tabla 6C**). Por lo tanto, la E_e al tratamiento intralesional con 150 mg Sb^V/Kg/29 días fue de 66,6 % (4 de 6 ratones). El ratón que no curó (ratón R5), incrementó tres veces el tamaño de las lesiones de 50,3 a 153,2 mm² (**Tabla 6A**) similar al incremento mostrado por el control tratado con solución salina sin Sb^V (de 13,8 a 46,5 mm²).

Infectados con *L. (V.) panamensis* (50 mg)

Los ratones mostraron una E_e del 33,3 al final del tratamiento, del 50 % a los 43 días PT y del 0 % los 60 días PT.

El día 43 PT, dos ratones (R4 y R6) mostraron una inhibición del tamaño de las lesiones del 100 % y uno (ratón R5) del 89 %. Sin embargo, el día 60 PT, los ratones R4 y R6 reactivaron sus lesiones mostrando un tamaño final de lesión del 11,6 y 3,5 mm² respectivamente (**Tabla 6B**). La lesión del ratón R5 también incrementó de tamaño, de 5,3 a 17,3 mm²

Infectados con *L. (V.) panamensis* (16,6)

Los ratones mostraron una E_e de 0 en todos los tiempos evaluados.

El tratamiento con 16,6 mg Sb^V/Kg/día por 29 días no fue efectivo estéticamente. No se presentó una disminución del tamaño de las lesiones mayor del 75% en ninguno de los tiempos evaluados (**Tabla 6C**).

Infectados con *L. (V.) braziliensis* (150 mg)

Los ratones mostraron una E_e de 83 % al final del tratamiento y 43 días PT y una E_e del 50 % a los 60 días PT

Con respecto a los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*, se encontró una E_e de 83,3 % (5 de 6 ratones), al final del tratamiento IL y 43 días PT. Los ratones R1, R2, R4, R5, R6, disminuyeron el tamaño de sus lesiones del 80,9 al 100 %. El día 60 PT, el ratón R3 también

mostró una disminución del 100 % de la lesión, sin embargo, los ratones (R4, R5, R6) que habían curado, reactivaron sus lesiones con tamaños entre 8,7 y 30,6 mm² (**Tabla 7A**). Por lo tanto, la E_e al tratamiento intralesional con 150 mg Sb^V/Kg/día por 29 días fue del 50 % (3 de 6 ratones). Los ratones tratados con solución salina (sin Sb^V) incrementaron 8,3 veces el tamaño inicial de la lesión (de 13,65 a 113,54 mm²).

Infectados con *L. (V.) braziliensis* (50 mg)

Los ratones mostraron una E_e de 33,3 % al final del tratamiento, de 66,6 % a los 43 días PT y del 16,6 % los 60 días PT

El día 43 PT cuatro ratones infectados con *L. (V.) braziliensis* (R2, R4, R5 y R6) inhibieron entre el 80 y 100 % el tamaño de las lesiones después del tratamiento con 50 mg Sb^V/Kg/día por 29 días (**Tabla 7B**). Sin embargo, 2 de estos ratones (R2 y R6) reactivaron sus lesiones al día 60 PT mostrando un tamaño de las lesiones entre 7,8 y 20,0 mm² (**Tabla 7B**). El ratón R4, mostró un incremento en el tamaño de su lesión el día 60 PT: de 10 a 18,3 mm² igual que el ratón R1 de 11,3 a 34,8 mm² (**Tabla 7B**).

Infectados *L. (V.) braziliensis* (16,6 mg)

Los ratones mostraron una E_e de 0 en todos los tiempos evaluados.

El tratamiento con 16,6 mg Sb^V/Kg/día por 29 días no fue efectivo estéticamente (**Tabla 7C**). No se presentó una disminución del tamaño de las lesiones mayor del 75 % en ninguno de los tiempos evaluados (**Tabla 7C**).

4.1.2.2 Efecto del tratamiento con Glucantime en los parásitos (E_p): No se evidenciaron parásitos (amastigotes) en las muestras evaluadas de piel y órganos (improntas y biopsias) de los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y tratados 150 mg Sb^V/Kg/día por 29 días, que inhibieron un 100 % el tamaño de sus lesiones 60 días PT, (Tabla 6A). Al contrario, abundantes

(+++)
amastigotes intra y extracelulares fueron observados en las lesiones del ratón R5 (el que en ningún tiempo presentó cura estética) y en el ratón R6 (el que mostró una reactivación de la lesión) (Tabla 6A). En este caso, al igual que en los ratones tratados con dosis inferiores de 50 y de 16,6, la E_p correspondió a la mismas E_e , es decir, se encontró una E_p de 66,6 % en la concentración de 150 mg Sb^V/Kg/día y una E_p de 0 en las concentraciones menores (Ver ítem anteriores resultados de E_e).

En los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis* y tratados 150 mg Sb^V/Kg/día por 29 días, no se observaron parásitos microscópicamente detectables en dos de los ratones que inhibieron el 100 % el tamaño de la lesión 60 días PT. Sin embargo, en uno de ellos (el ratón R3), se pudieron observar amastigotes (++) en la biopsia de lesión (**Tabla 7A**). En las lesiones de los tres ratones que se reactivaron, se observaron abundantes (+++) amastigotes intra y extracelulares similar al control. En este caso la E_p fue menor que la E_e , es decir, se encontró una E_p de 33,6 % en la concentración de 150 mg Sb^V/Kg/día (la E_e en esta concentración fue del 50 %). Con el tratamiento con 50 mg Sb^V/Kg/día por 29 días, la situación fue similar, se encontró una E_p del 0 % en contraste con la E_e que fue del 16,6 %.

En ninguno de los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* o *L. (V.) braziliensis* se observaron parásitos en las improntas o biopsias de los órganos (hígado, bazo, riñón, corazón). Ver ejemplo en **figura 9**.

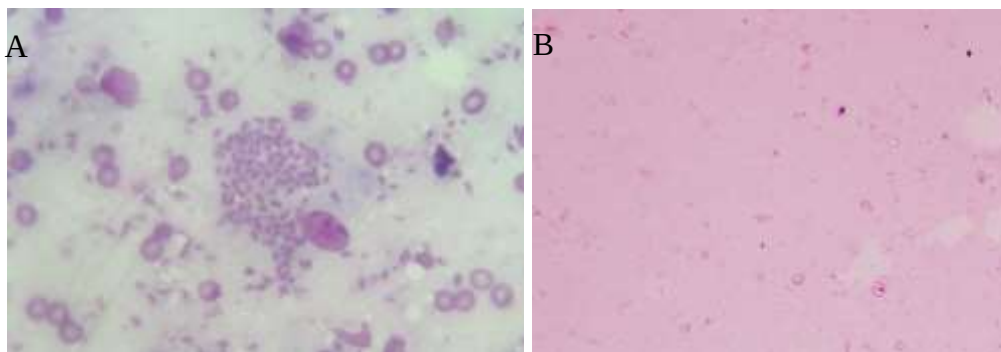


Figura 9. Observación microscópica de parásitos.

Las fotos muestran un ejemplo de una impronta tomada de la lesión de un ratón que no curó, A. presencia de amastigotes y otro del sitio de infección de un ratón que curó; B. ausencia de parásitos. Coloreados con Giemsa, observados en un aumento de 1000X.

4.1.2.3 Respuesta final del tratamiento: En las lesiones + parásitos, en la actividad del Sb^V (DE₅₀), según la clasificación de Wortmann et al., 2002. Finalmente se mostrará la tabla 8, mostrando el número de ratones curado versus los no curados.

Teniendo en cuenta el efecto del tratamiento lesiones y parásitos, la eficacia final (E_f) del tratamiento con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días fue del 66,6 % y 33,3 % para *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente (**Tabla 6 y 7**).

La actividad el Glucantime en términos de DE₅₀ fue de 145 mg Sb^V/Kg/día y mayor de 150 mg Sb^V/Kg/día para *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente.

Según Wortmann et al., 2002 la respuesta al tratamiento puede ser: Completa (100 % de reducción, 100 % de re-epitelialización y ausencia de parásitos); parcial (75 - 99 % de reducción); estable (0 - 74 % reducción); no efectivo (aumento de las lesiones)

En ratones infectados con *L. (V.) panamensis*: el tratamiento con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días mostró un repuesta completa en 4/6 ratones (66,6 %), parcial (0 %), estable (0 %), no efectivo en

1/6 ratones (16,6 %), reactivación en 1/6 ratones (16,6 %). Al tratamiento con 50 mgSb^V/Kg/día por 29 días la respuesta fue completa (0 %), parcial (0 %), estable (1/6 ratones, 16,6 %), no efectivo (3/6 ratones, 50 %) y reactivación (2/6 ratones, 33,3 %)

En ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*: al tratamiento con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días la respuesta fue: completa (3/6 ratones, 50 %), parcial (0 %), estable (0 %), no efectiva (0 %) y reactivación (3/6 ratones, 50 %). Al tratamiento con 50 mgSb^V/Kg/día por 29 días, la respuesta fue completa: (0 %), parcial (1/6 ratones, 16,6 %), estable (3/6 ratones, 50 %) no efectivo (0 %), reactivación (2/6 ratones, 33,3 %)

De los 36 ratones tratados IL con Sb^V, el número final de ratones que curaron fue de 6 [cuatro de los infectados con *L. (V.) panamensis* y dos de los infectados con *L. (V.) braziliensis*]. El total de ratones que no curaron fue de 30. A continuación se tratará de dilucidar algunos factores asociados a la cura en estos 6 ratones (**Tabla 8**).

Tabla 6.

Efecto del tratamiento intralesional con Sb^V en ratones infectados con L. (V.) panamensis.

Tratamiento con A. 150; B. 50; y C. 16,6 mg de Sb^V/Kg/día por 29 días.

Ratón	Día 0 mg mm ² inicial	Día 29 (fin tratamiento)			día 43 PT			día 60 PT (fin del experimento)					
		mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Parásitos		E _f
											Imp.	Bio.	
A. 150													
R1	36,6	3,5	90,5	83,3	0	100	83,3	0	100	66,6	-	-	66,6
R2	35,4	0	100		0	100		0	100		-	-	
R3	32,5	0	100		0	100		0	100		-	-	
R4	45,9	6,2	86,6		0	100		0	100		-	-	
R5	50,3	35,2	29,9		19,6	61		153,2	0		+++	+++	
R6	46,7	3,1	93,3		0	100		31,6	Re		+++	+++	
SS	13,8	28,7	0	NA	30,1	0	NA	46,5	0	NA	+++	+++	NA
B. 50													
mg	mm ²	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Imp.	Bio.	E _f

A. 150 mg Ratón	Día 0 mm ² inicial	Día 29 (fin tratamiento)			día 43 PT			día 60 PT (fin del experimento)					
		mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Parásitos		E _f
											Imp.	Bio.	
R1	50	24,3	51,4	33,3	20,8	58,4	50,0	59,9	0	0	+++	+++	0
R2	40,5	29,3	27,6		22,8	43,7		132,0	0		+++	+++	
R3	59,2	26,4	55,4		26,4	55,4		70,8	0		+++	+++	
R4	33,9	0	100		0	100		11,6	Re		+++	ND	
R5	50,9	18	64,6		5,3	89,5		17,3	66		+++	ND	
R6	32,1	0	100		0	100		3,5	Re		+++	ND	
SS	13,8	28,7	0	NA	30,1	0	NA	46,5	0	NA	+++	+++	NA
C. 16,6 mg Ratón	mm ²	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Imp.	Bio.	E _f
R1	39,7	19,2	51,6	0	24,5	38,2	0	78,8	0	0	+++	+++	0
R2	40,2	34,2	14,9		59,9	0		121,7	0		+++	+++	
R3	42,9	38,9	9,3		40,1	6,5		125,8	0		+++	+++	
R4	42,8	24,2	43,4		25	41,5		140,9	0		+++	ND	
R5	28,7	26,3	8,3		25,1	12,5		41,3	0		+++	ND	
R6	23,6	19,8	16,1		18,1	23,3		29,9	0		+++	ND	
SS	13,8	28,7	0	NA	30,1	0	NA	46,5	0	NA	+++	+++	NA

Nota: R: ratón; % I: porcentaje de inhibición de la lesión; E_e: eficacia estética: porcentaje de ratones que redujeron las lesiones entre el 75 y 100 % de su área (en negrillas); E_f: eficacia final (estética y parasitológica); mm²_{inicial}: tamaño de la lesión antes del tratamiento (rojo); Parásitos -, ausentes, +, escasos; ++, moderados; +++, abundantes. Re= reactivación; PT: postratamiento. Gris: fin tratamiento, verde: 43 días PT, azul: 60 días PT; Imp: improntas; Bio: biopsias; ND: no determinado.

Tabla 7.

Efecto del tratamiento intralesional con Sb^V en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*.

Tratamiento con A. 150; B. 50; y C. 16,6 mg de Sb^V/Kg/día por 29 días.

A. 150 mg Ratón	Día 0	Día 29 (fin tratamiento)			día 43 PT			día 60 PT (fin del experimento)					
	mm ²	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Parásitos		E _f
	inicial										Imp.	Bio.	
R1	55,9	0	100	83,3	0	100	83,3	0	100	50	-	-	33,3
R2	34,9	0	100		0	100		0	100		-	++	
R3	14,5	23,2	0		10,4	28,6		0	100		-	-	
R4	32,8	6,3	80,9		0	100		30,6	Re		+++	+++	
R5	35,7	0	100		0	100		11,9	Re		+++	+++	
R6	43,1	0	100		0	100		8,7	Re		+++	+++	
SS	13,65	49,64	0	NA	57,8	NA	NA	113,5	NA	NA	+++	+++	NA
B. 50 mg													
	mm ²	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Imp.	Bio.	E _f
R1	42,0	18,1	56,9	33,3	11,3	73,0	66,6	34,8	17,1	16,6	+++	+++	0
R2	36,4	0	100		0	100		7,8	Re		+++	+++	
R3	45,3	21	53,6		20	55,8		39,4	13,0		+++	+++	
R4	50,2	22	56,1		10	80,0		41	18,3		+++	ND	
R5	45,8	20	56,3		0	100		0	100		-	ND	
R6	48,9	9	81,5		0	100		20	Re		+++	ND	
SS	13,65	49,64	0	NA	57,8	NA	NA	113,5	NA	NA	+++	+++	NA
C. 16,6 mg													
	mm ²	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	mm ²	I (%)	E _e (%)	Imp.	Bio.	E _f
R1	42,8	33,3	22,1	16,6	33,3	22,1	16,6	53,3	0	0	+++	+++	0
R2	38,9	32,0	17,7		22,0	43,4		68,5	0		+++	+++	
R3	38,1	44,7	0		54,6	0		125,5	0		+++	+++	
R4	40,6	42,7	0		30,1	25,8		120,4	0		+++	ND	
R5	44,7	48,0	0		37,8	15,4		78,0	0		+++	ND	
R6	40,7	8,7	78,6		5,2	87,2		29,8	26,7		+++	ND	
SS	13,65	49,64	0	NA	57,8	NA	NA	113,5	NA	NA	+++	+++	NA

Nota: R: ratón; % I: porcentaje de inhibición de la lesión; E_e: eficacia estética: porcentaje de ratones que redujeron las lesiones entre el 75 y 100 % de su área (en negrillas); E_f: eficacia final (estética y parasitológica); mm²_{inicial}: tamaño de la lesión antes del tratamiento (rojo); Parásitos -, ausentes, +, escasos; ++, moderados; +++, abundantes. Re= reactivación; PT: postratamiento.

Gris: fin tratamiento, verde: 43 días PT, azul: 60 días PT; Imp: improntas; Bio: biopsias; ND: no determinado

Tabla 8.

Resumen de resultados in vivo (número de ratones curados versus no curados)

Dosis Sb ^V	Cura*			No cura		
	R _T	L. (V.) <i>panamensis</i>	L. (V.) <i>braziliensis</i>	R _T	L. (V.) <i>panamensis</i>	L. (V.) <i>braziliensis</i>
150	6	4	2	6	2	4
50	0	0	0	12	6	6
16,6	0	0	0	12	6	6
total	6	4	2	30	8	10

Nota: * Respuesta completa (100 % de reducción de las lesiones, 100 % de re-epitelialización y ausencia de parásitos); R_T: total de ratones

4.1.2.4 Estudio de reactivación en los ratones tratados: Se consideró que hubo reactivación cuando las lesiones que disminuían macroscópicamente el 100% de su tamaño (tamaño de 0 mm², cura estética) volvían a aparecer. Los ratones que reactivaron se observan en la tabla 6 y 7 y en color rojo en la tabla 9. De los ratones que redujeron el 100 % de las lesiones y reactivaron después de un ciclo de tratamiento con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días fue de 16,6 % (1 de 6, ratón R6) en los infectados por L. (V.) panamensis y del 50% (3 de 6, ratones R4, R5 y R6) en ratones infectados con L. (V.) braziliensis. La lesión reactivada del ratón R6 infectado con L. (V.) panamensis y la de los tres ratones R4, R5 y R6 infectados con L. (V.) braziliensis mostraron un tamaño final del nódulo de 31,6, 30,6, 11,9 y 8,7 mm² respectivamente (Tabla 10). Las lesiones reactivadas se presentaron en el mismo sitio de inoculación. Comenzaron con una pápula que con el tiempo evolucionó a un nódulo con bordes levantados, que en algunos casos presentaban úlceras típicas de fondo limpio, color rosado y tejido granuloso, redondeada con bordes regulares y elevados (Tabla 10).

Al tratamiento con 50 mgSb^V/Kg/día por 29 días, todos los que mostraron algún efecto, reactivaron, exceptuando el R5 infectado con *L. (V.) braziliensis* (Ver **Tabla 9** en amarillo)

La lesión reactivada de los ratones R4 y R6 infectado con *L. (V.) panamensis* y la de los ratones R2 y R6 infectados con *L. (V.) braziliensis* presentaron un tamaño de nódulo de 11,6; 3,5 y 7,8; 20,0 mm² respectivamente (**Tabla 10**). Las lesiones reactivadas se presentaron en el mismo sitio de inoculación. Iniciaron con una pápula que con el tiempo evolucionó a un nódulo con bordes levantados, no presentaron úlcera (**Tabla 10**).

Tabla 9.

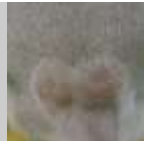
*Reactivación de las lesiones en las diferentes dosis utilizadas. Se muestran el efecto del tratamiento con diferentes dosis de Glucantime (Sb^V) los ratones (R1-R6) infectados con *L. (V.) panamensis* (p) y *L. (V.) braziliensis* (b).*

Dosis mg Sb ^V /Kg/ 29 días)	Días PT	R1		R2		R3		R4		R5		R6	
		p	b	p	b	p	b	p	b	p	b	p	b
150	43												
	92												
50	43												
	92												
16,6	43												
	92												

Nota: Los cuadros azules representan los que mostraron una inhibición del 100% de las lesiones; los cuadros morados, los que no inhibieron el 100% de sus lesiones y los cuadros rojos los que reactivaron. Se muestran los resultados del día 43 y 92 post tratamiento (PT) En amarillo se muestra el raton donde no se reactivó la lesión, pero si se encontraron parásitos en las improntas.

Tabla 10.

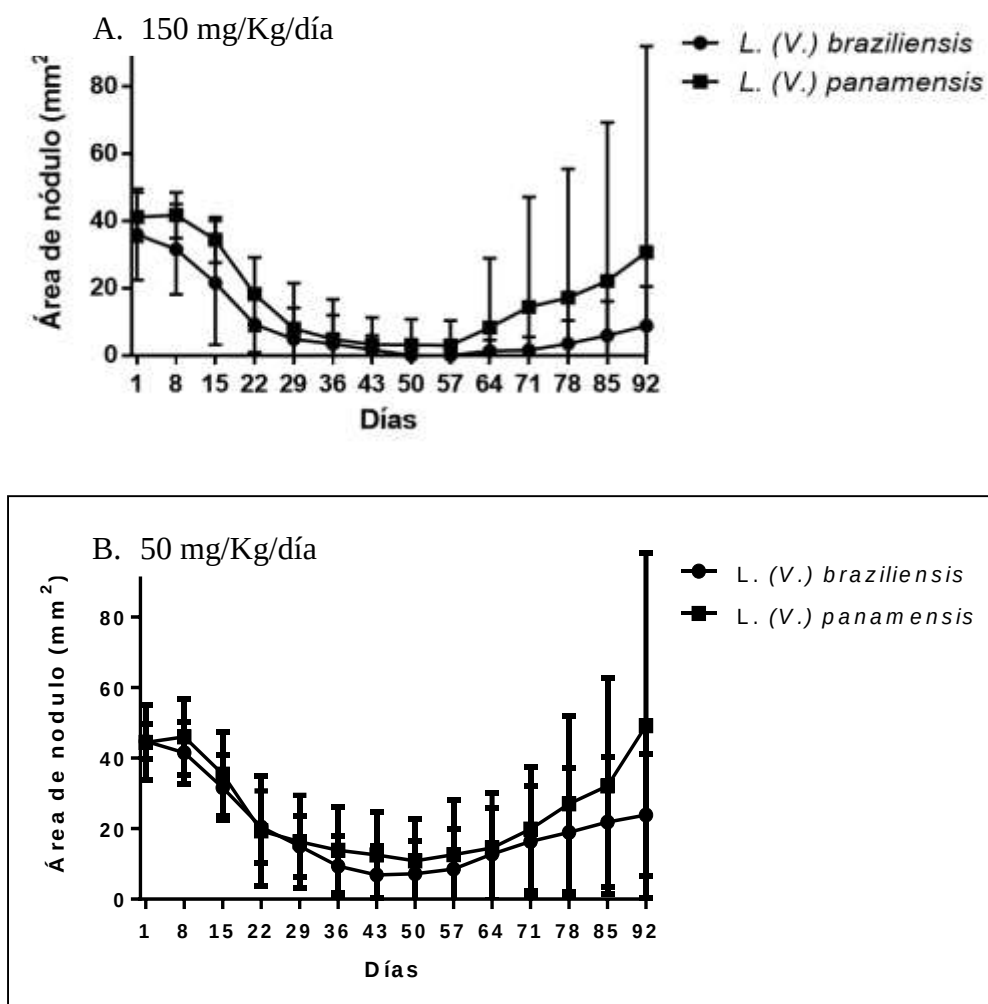
Reactivación de las lesiones después de 60 días PT en ratones infectados. Antes: lesión al iniciar el tratamiento, Reactivada= lesión a los 60 días PT.

Dosis mg Sb ^V /kg/29 días	<i>L. (V.) panamensis</i>			<i>L. (V.) braziliensis</i>		
	Ratón	Antes	Reactivada	Ratón	Antes	Reactivada
150	6			4		
				5		
				6		
50	4			2		
	6			6		

4.1.3 Factores relacionados con los parásitos Con respecto a la especie de parásito involucrada, la infección con *L. (V.) panamensis* mostró una mejor respuesta (en términos de ratones curados) al tratamiento; siendo completa en 4 de 6 ratones tratados, comparada con los 2 de 6 ratones mostrados en los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*. Además, no se observó reactivación de las lesiones, cosa que no sucedió en los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*, donde tres ratones reactivaron sus lesiones a 150 mg/kg dosis y dos a 50 mg/Kg/dosis. Sin embargo, un punto negativo en la infección con *L. (V.) panamensis*, es que un ratón si bien mostró

una disminución inicial de la lesión de 50,3 a 19,6 mm², al final del experimento (60 días PT) esta incrementó casi 3 veces su tamaño inicial (153,2 mm²), **tabla 6A**.

Sin embargo, al comparar el tamaño (mm²) final de los ratones infectados con las dos especies de *Leishmania* tratados intralesionalmente con Sb^V para cada una de las concentraciones (150, 50 y 16,6 mg Sb^V/Kg), no se encontraron diferencias estadísticamente en el tratamiento entre las dos especies de *Leishmania* (**Figura 10**).



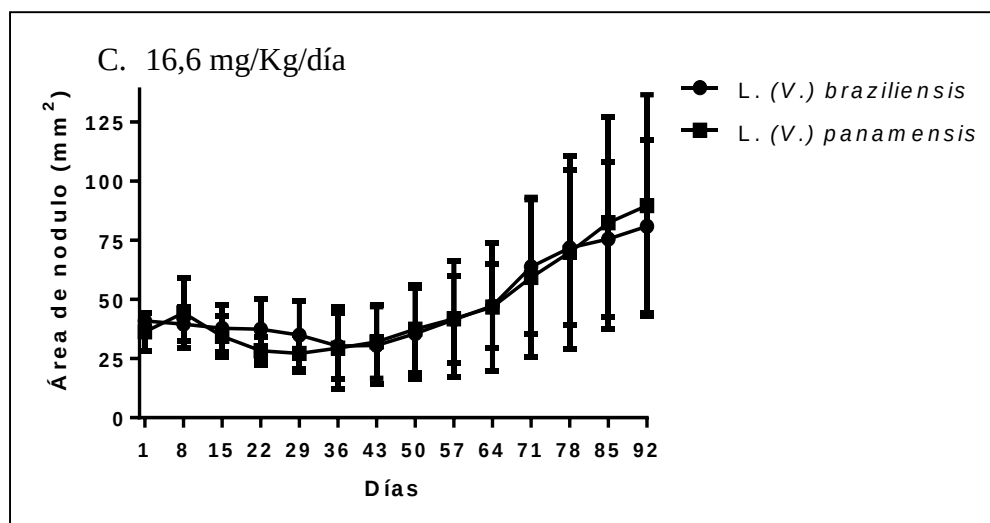


Figura 10. Efecto del tratamiento intralesional con 150, 50 y 16,6 mg Sb^V/Kg/día por 29 días en ratones BALB/c infectados

4.1.4 Factores relacionados con el huésped

4.1.4.1 Efecto del tamaño y características de la lesión inicial: Se encontró que el tamaño inicial del nódulo no estuvo relacionado con la cura tal como se observa en las siguientes figuras. En los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* tratados con 150 mgSb^V/Kg/día que curaron, el tamaño promedio del nódulo fue de $37,6 \pm 5,7 \text{ mm}^2$ y la úlcera fue de $5,7 \pm 4,4 \text{ mm}^2$, y de los que no curaron fue de $48,5 \pm 2,5 \text{ mm}^2$ y $1,9 \pm 2,6 \text{ mm}^2$.

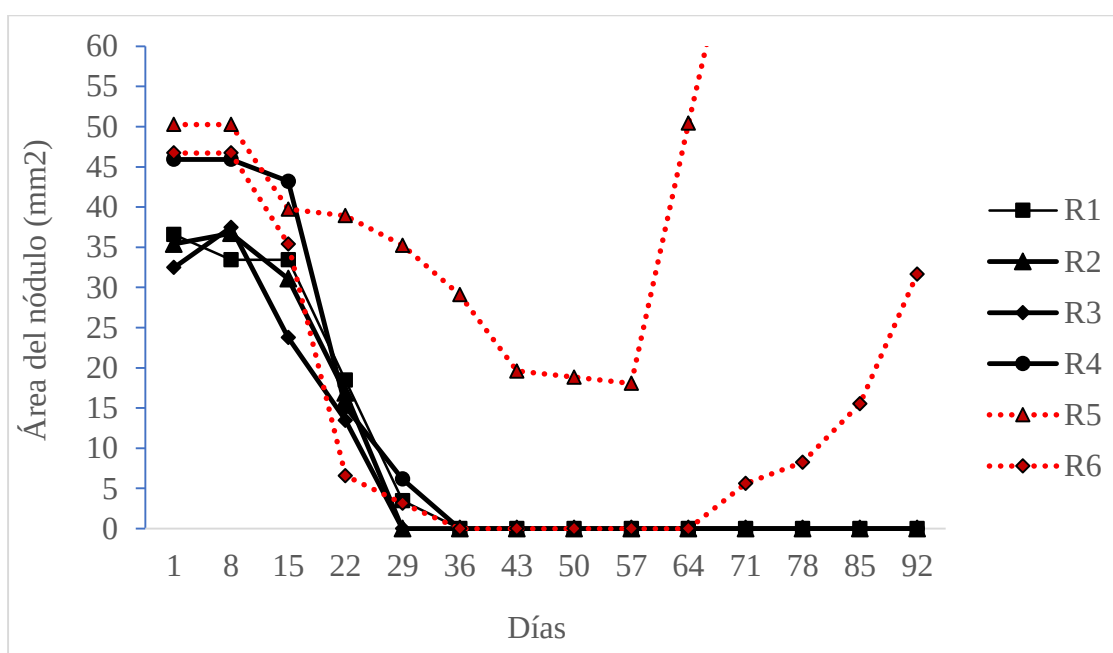
En los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis* tratados con 150 mgSb^V/Kg/día que curaron, el tamaño promedio del nódulo fue de $35,1 \pm 20,7 \text{ mm}^2$ y la úlcera fue de $2 \pm 3,4 \text{ mm}^2$, y de los que no curaron fue de $37,2 \pm 5,3 \text{ mm}^2$ y $6,5 \pm 8,3 \text{ mm}^2$.

La figura 11 y 12 muestra los resultados del efecto del tratamiento con Sb^V en el tamaño del nódulo (A), úlcera (B) y aspecto de lesión (C), en los ratones tratados con 150 mgSb^V/Kg/día infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente.

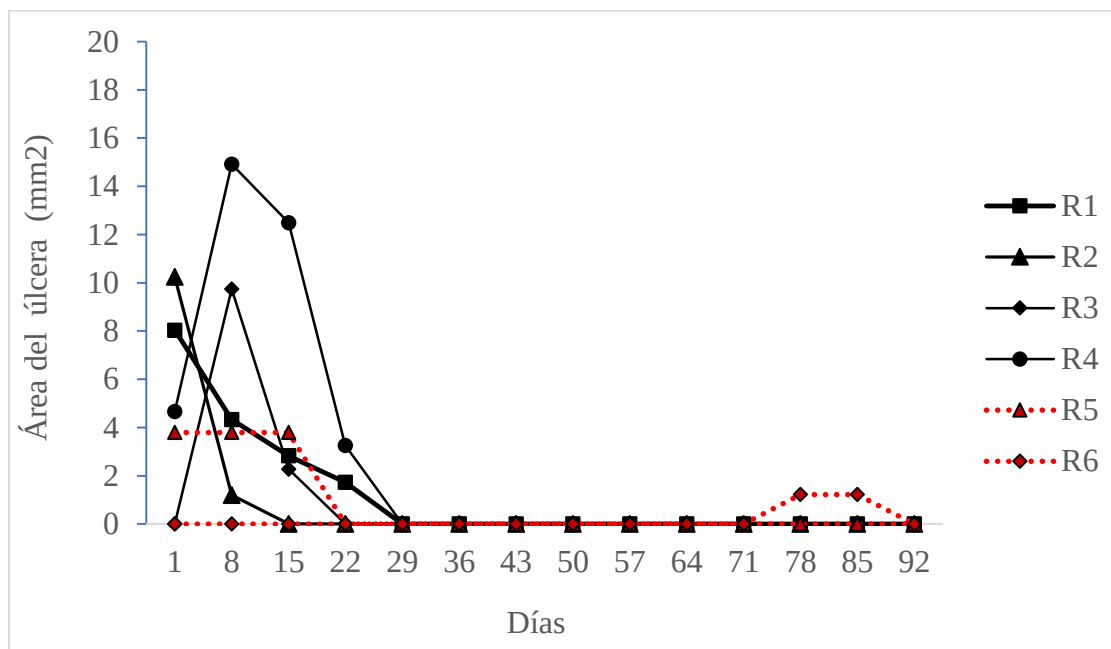
La figura 13 y 14 muestra los resultados del efecto del tratamiento con Sb^{V} en el tamaño del nódulo (A), úlcera (B) y aspecto de lesión (C), en los ratones tratados con $50 \text{ mgSb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{día}$ infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente.

La figura 15 y 16 muestra los resultados del efecto del tratamiento con Sb^{V} en el tamaño del nódulo (A), úlcera (B) y aspecto de lesión (C), en los ratones tratados con $16,6 \text{ mgSb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{día}$ infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente.

11A. Tamaño del nódulo: *L. (V.) panamensis* $150 \text{ mgSb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{día}$



11B. Tamaño de la úlcera: *L. (V.) panamensis* 150 mgSb^V/Kg/día



11C. Lesión, *L. (V.) panamensis* 150 mgSb^V/Kg/día

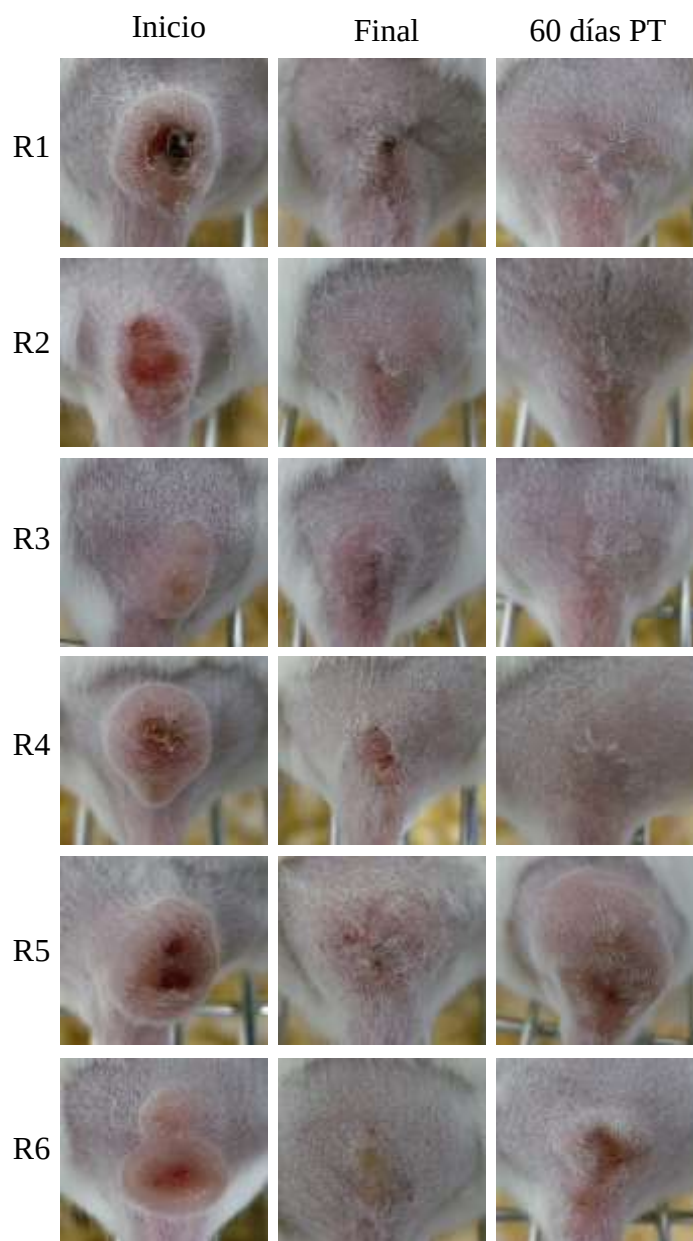
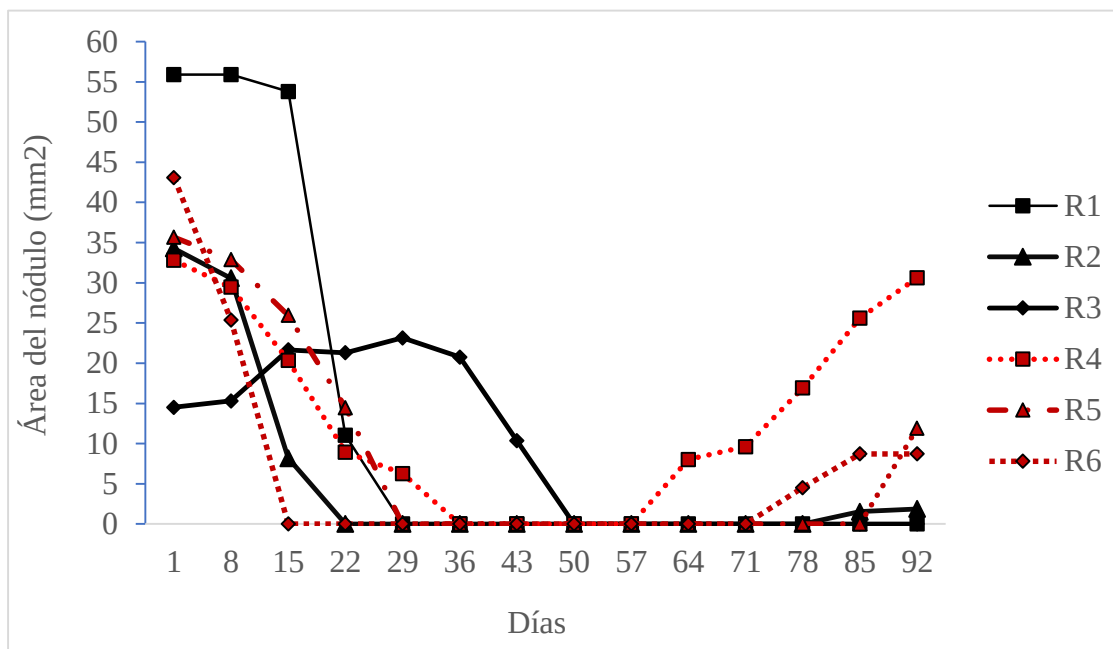
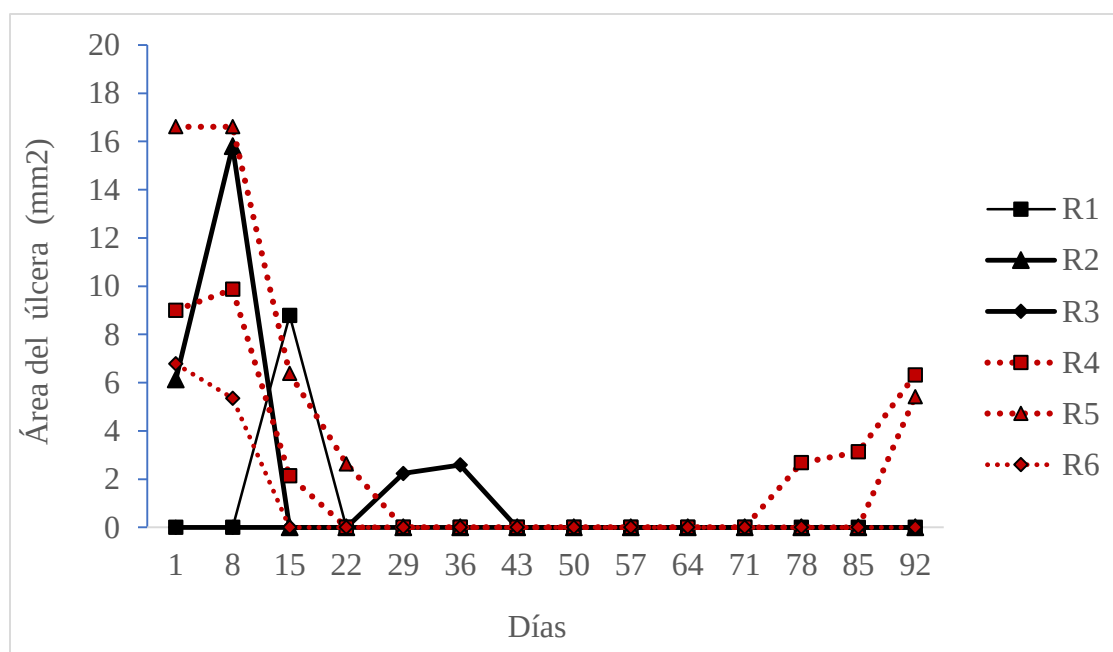


Figura 11. *L. (V.) panamensis* 150 mgSb^V/Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión

En rojo se observa el tamaño de las lesiones de los ratones que no curaron

12A. Tamaño del nódulo: *L. (V.) braziliensis* 150 mgSb^V/Kg/día12B. Tamaño de la úlcera: *L. (V.) braziliensis* 150 mgSb^V/Kg/día

12C. Lesión, *L. (V.) braziliensis* 150 mgSb^V/Kg/día

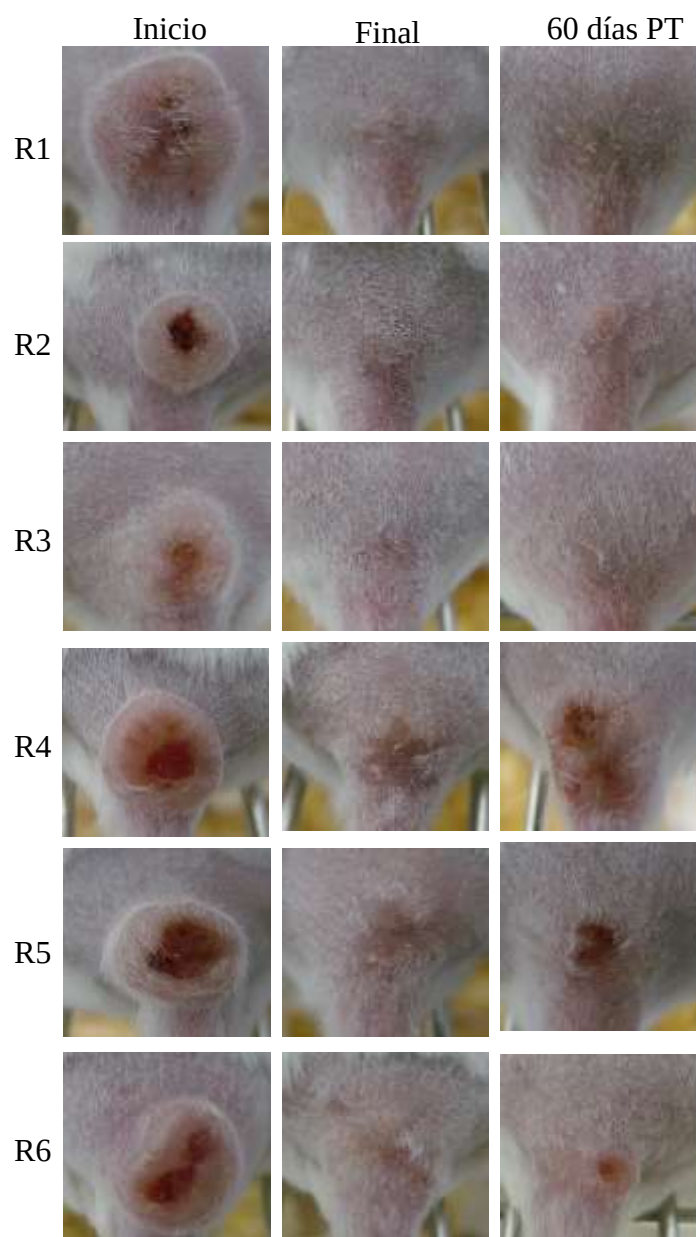
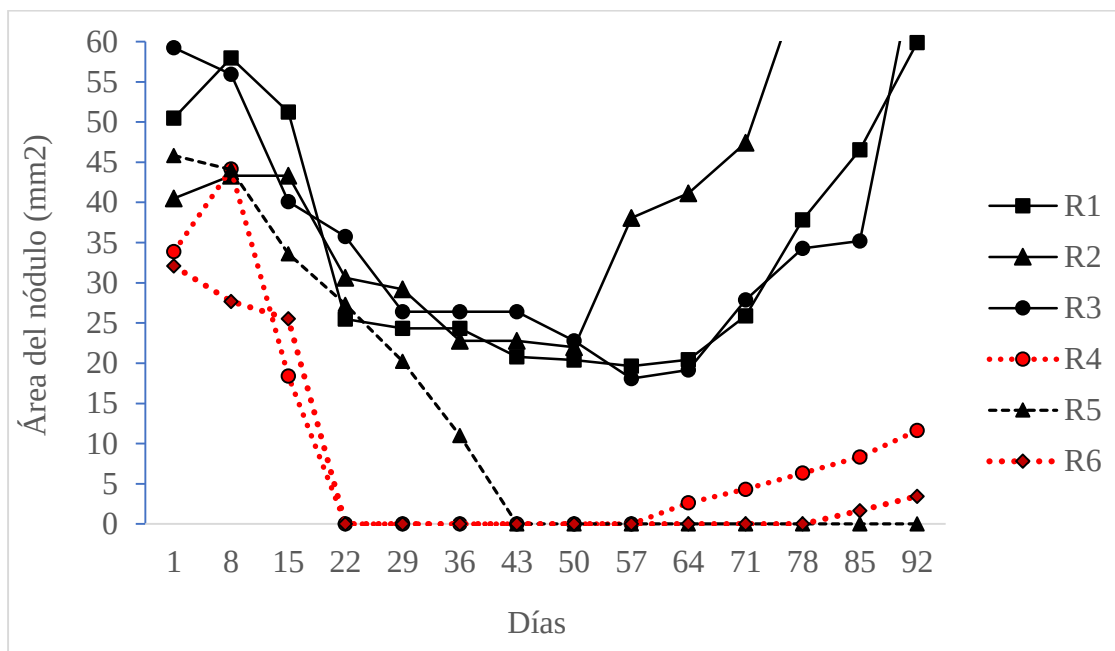
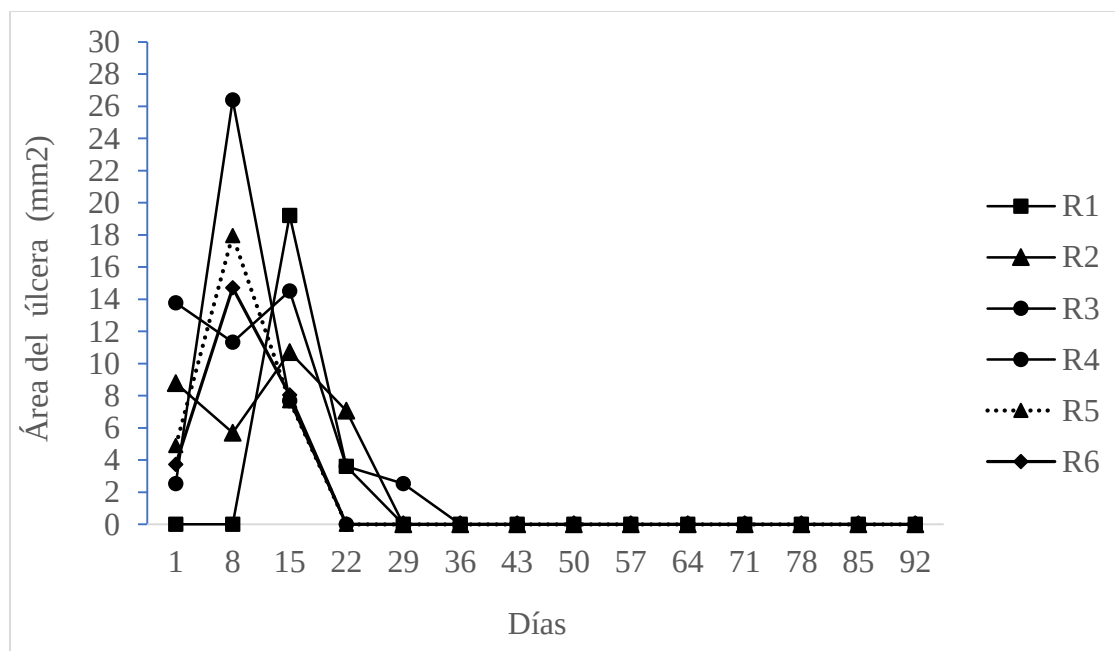


Figura 12. *L. (V.) braziliensis* 150 mgSb^V/Kg/día. A. nódulo, B úlcera, C. lesión

13A. Tamaño del nódulo: *L. (V.) panamensis* 50 mgSb^V/Kg/día13B. Tamaño de la úlcera: *L. (V.) panamensis* 50 mgSb^V/Kg/día

13C. Lesión, *L. (V.) panamensis* 50 mgSb^V/Kg/día

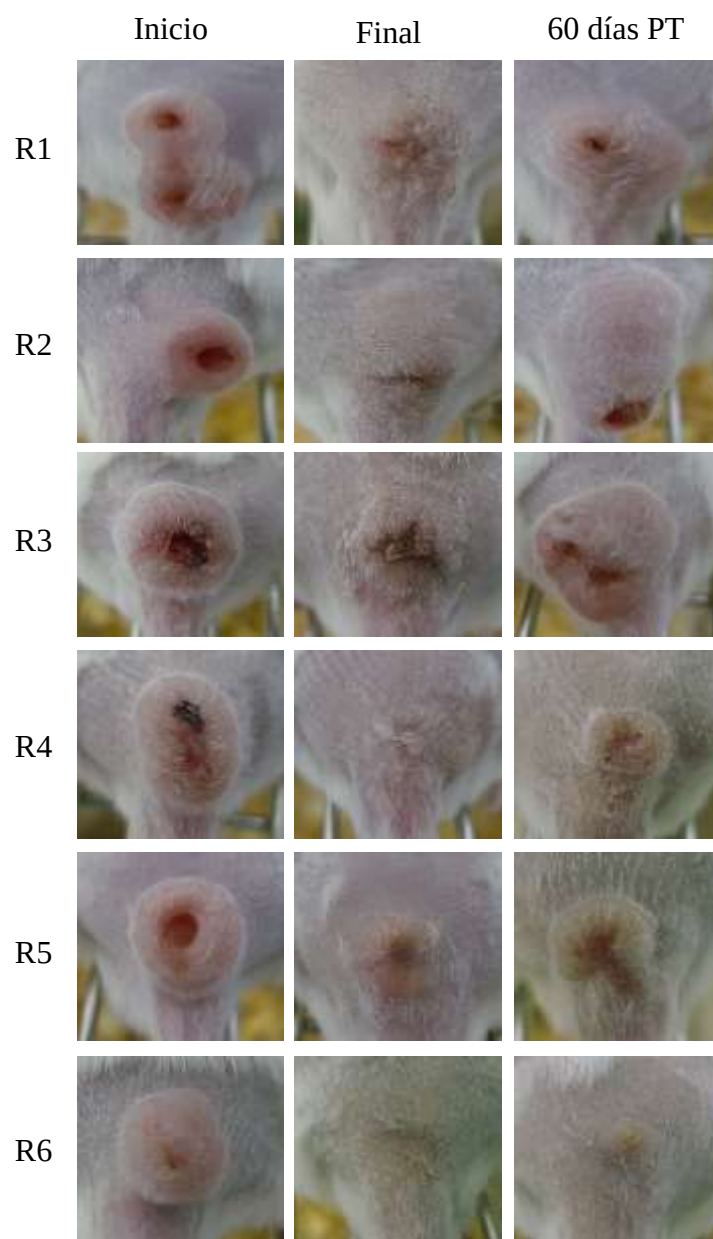
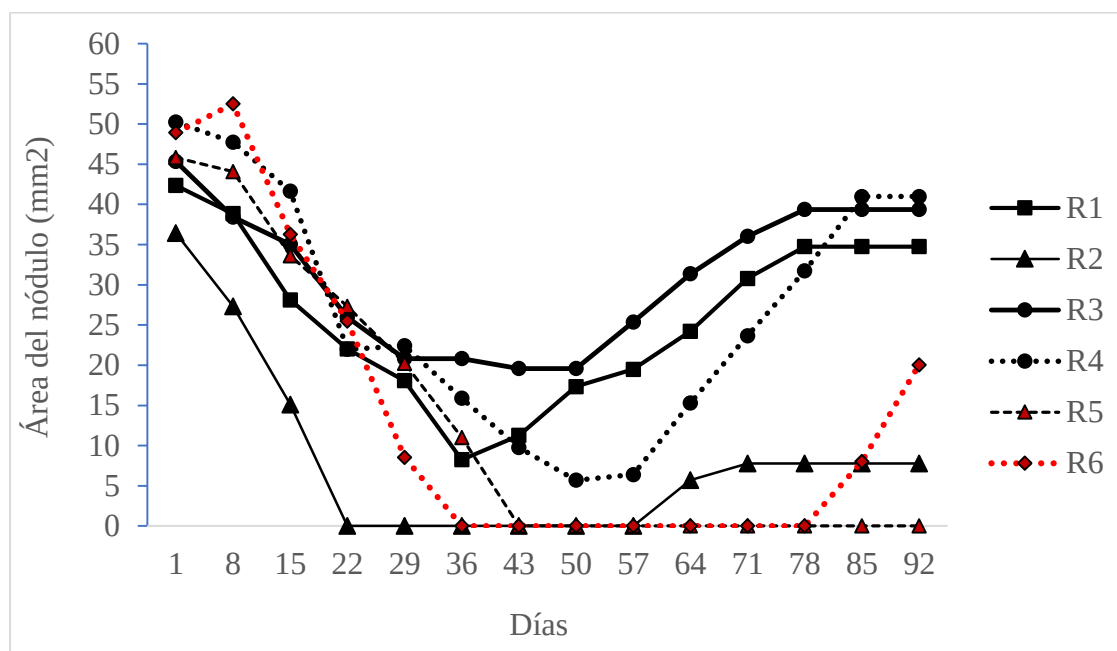
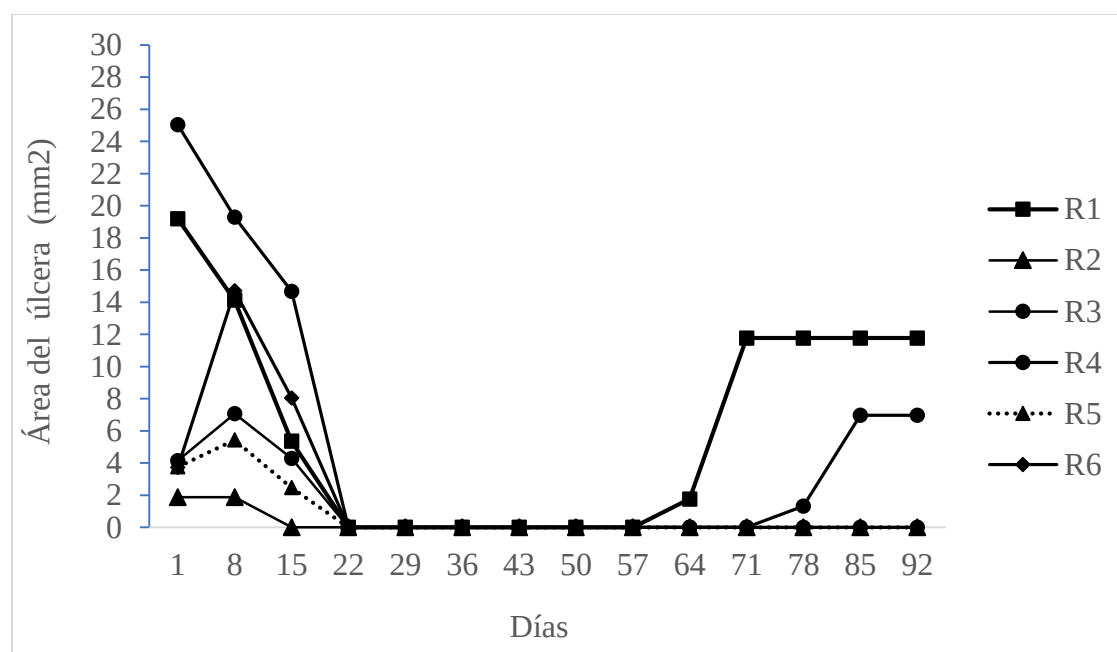


Figura 13. *L. (V.) panamensis* 50 mgSb^V/Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión

14A. Tamaño del nódulo: *L. (V.) braziliensis* 50 mgSb^V/Kg/día14B. Tamaño de la úlcera: *L. (V.) braziliensis* 50 mgSb^V/Kg/día

14C. Lesión, *L. (V.) braziliensis* 50 mgSb^V/Kg/día

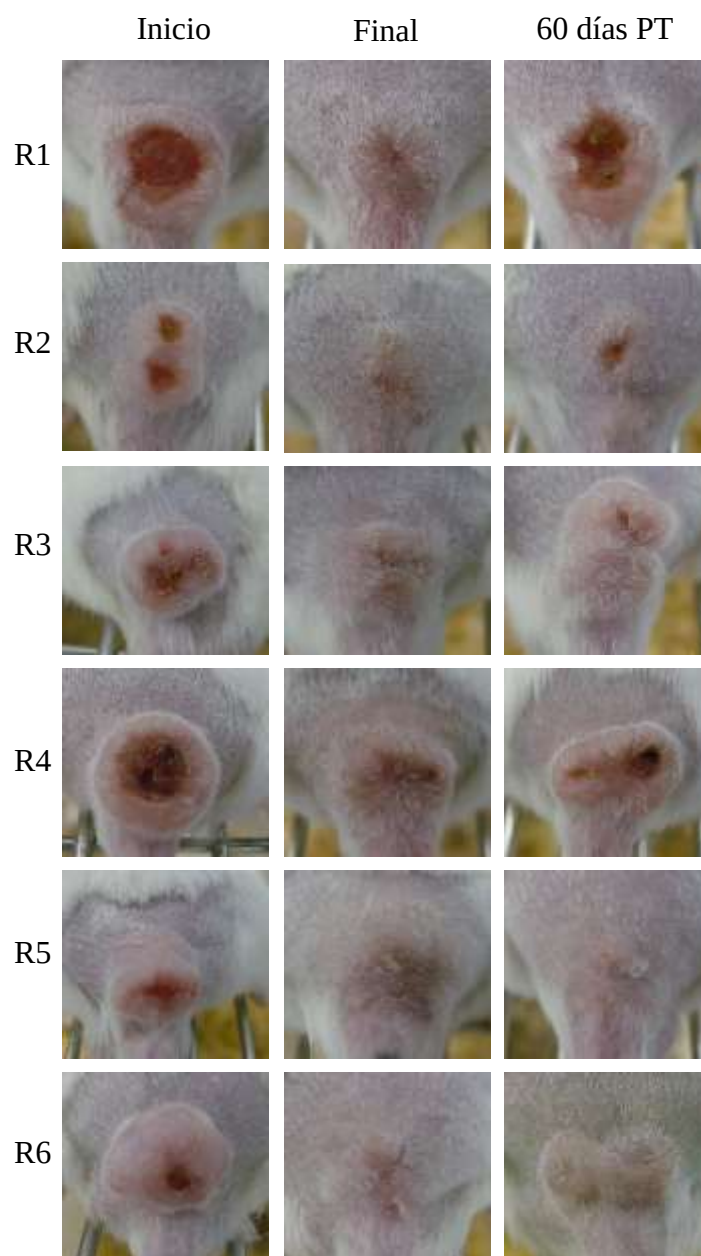
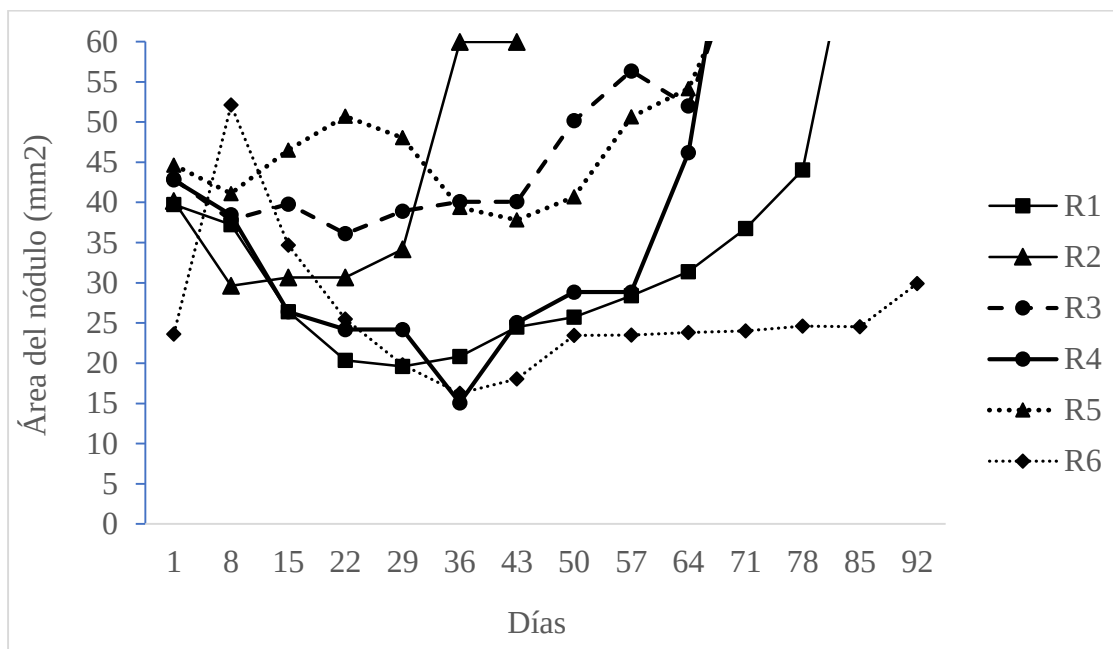
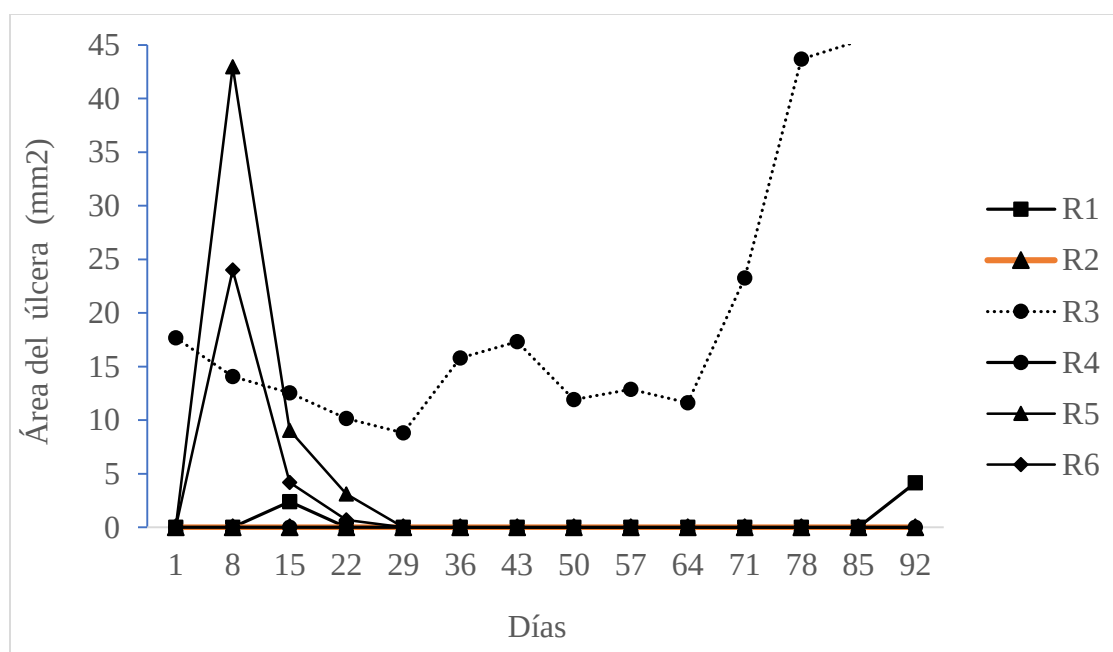


Figura 14. *L. (V.) braziliensis* 50 mgSb^V/Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión

15A. Tamaño del nódulo: *L. (V.) panamensis* 16,6 mg/kg/día15B. Tamaño de la úlcera: *L. (V.) panamensis* 16,6 mg/kg/día

15C. Lesión, *L. (V.) panamensis* 16,6 mg/kg/día

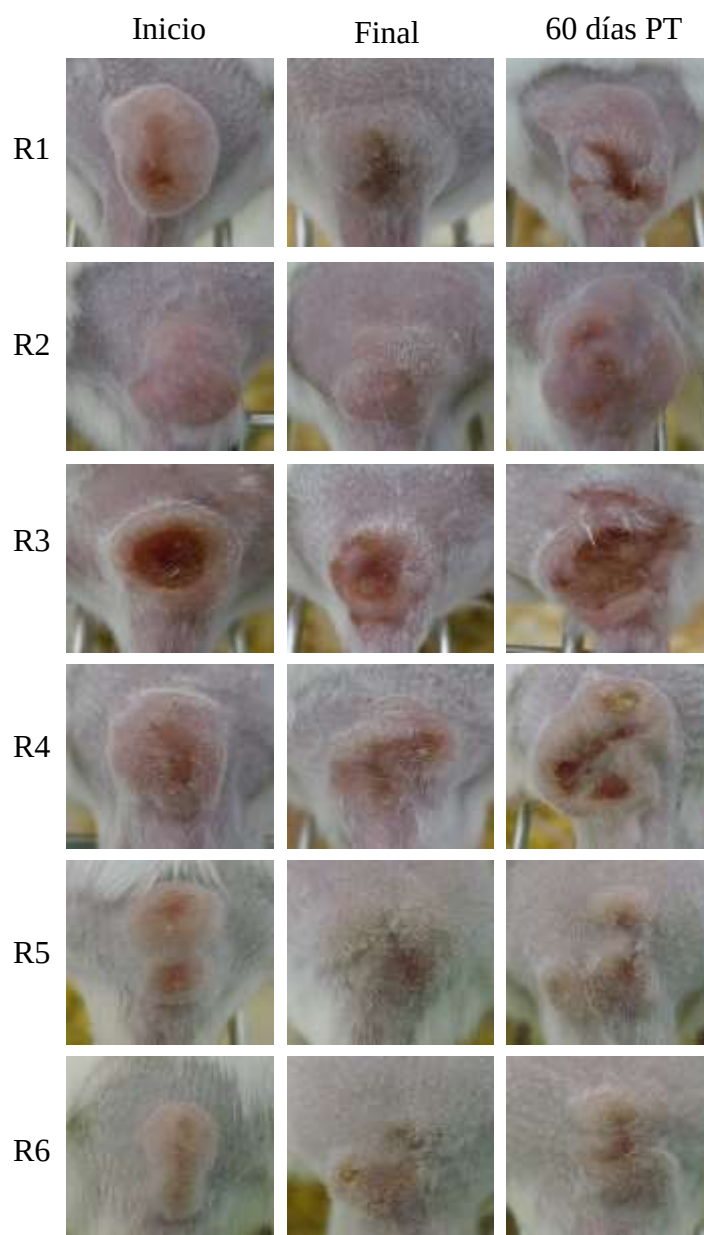
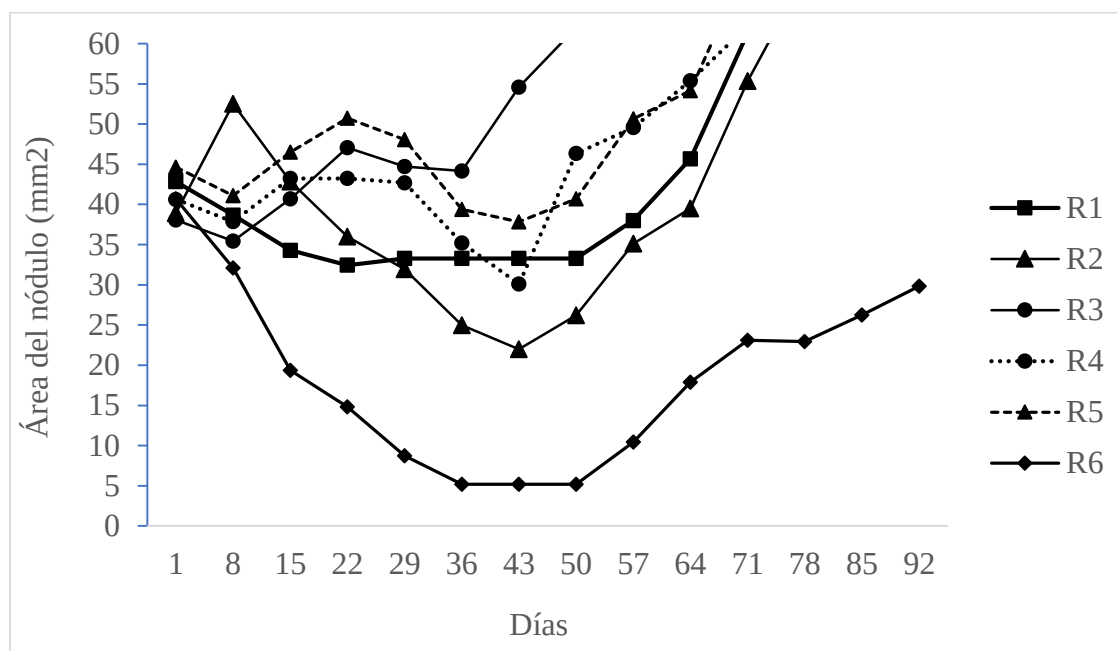
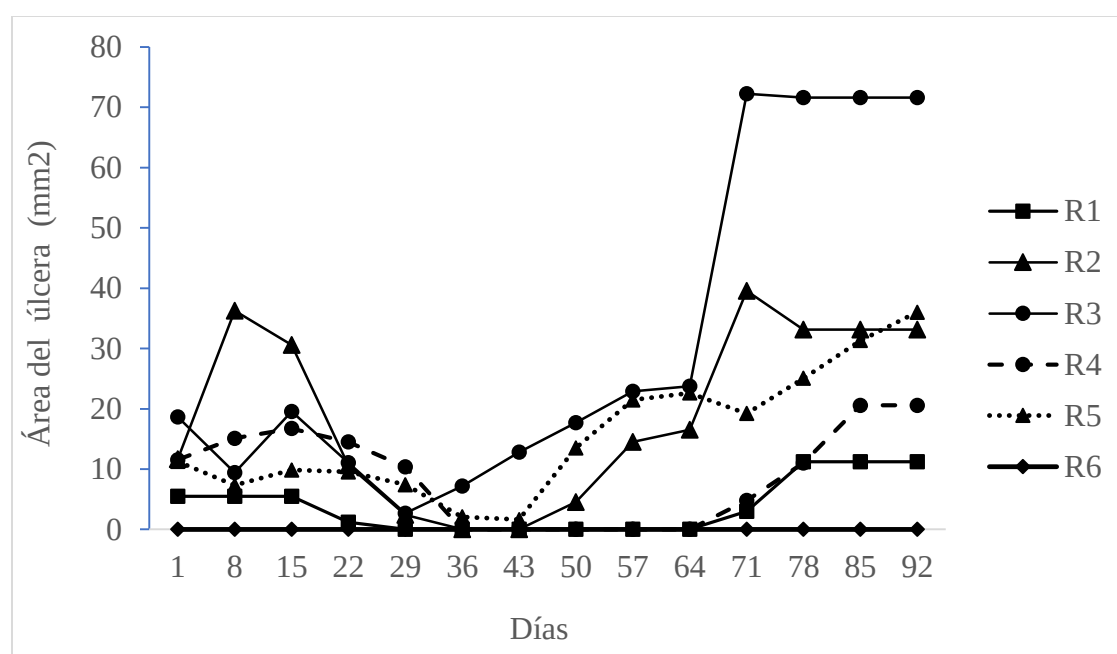


Figura 15. *L. (V.) panamensis* 16,6 mg/kg/día A. nódulo, B úlcera, C. lesión

16A. Tamaño del nódulo: *L. (V.) braziliensis* 16,6 mgSb^V/Kg/día16B. Tamaño de la úlcera: *L. (V.) braziliensis* 16,6 mgSb^V/Kg/día

16C. Lesión, *L. (V.) braziliensis* 16,6 mgSb^V/Kg/día

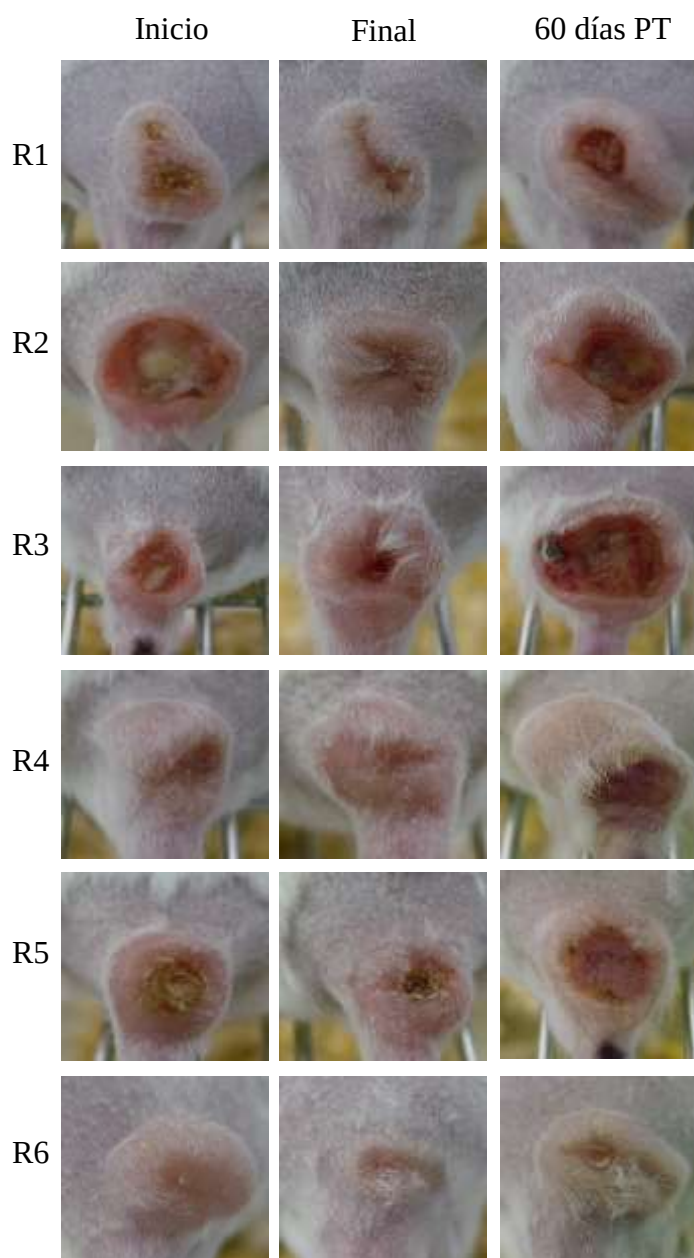


Figura 16. *L. (V.) braziliensis* 16,6 mgSb^V/Kg/día, A. nódulo, B úlcera, C. lesión

4.1.4.2 Efecto de la respuesta histopatológica de las lesiones en la efectividad al tratamiento:

Los ratones tratados con miltefosina (control de cura) y con el vehículo (solución salina, SS), mostraron dos patrones histopatológicos: patrón de cura y patrón de no cura (infección).

Patrón de cura

Los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* tratados tópicamente con MTF (los cuales curaron las lesiones), mostraron en la epidermis: ausencia o leve acantosis, espongiosis y paraqueratosis y ligera hiperqueratosis. En la dermis se observó leve infiltrado inflamatorio difuso con predominio de linfocitos y células plasmáticas, con ausencia de amastigotes en todos los campos evaluados (**Figura 17A**)

Patrón de no cura

Los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* tratados con el vehículo mostraron en la epidermis: moderada a severa acantosis y espongiosis, moderada hiperqueratosis y pérdida de la unión dermoepidérmica. En la dermis se encontró un severo infiltrado inflamatorio difuso con predominio de linfocitos, células plasmáticas y abundantes macrófagos infectados con amastigotes (**Figura 17B**).

Patrones asociados a la respuesta al tratamiento con 150 mgSb^V/Kg/día

Los cuatro ratones infectados con *L. (V.) panamensis* (ratones R1, R2, R3 y R4) que presentaron al día 60 PT una disminución del 100% en las lesiones, sin parásitos observables por las técnicas estudiadas, mostraron un patrón de cura al análisis microscópico. En la epidermis se encontró: ausencia o leve acantosis, hiperqueratosis y paraqueratosis, sin espongiosis o necrosis y una dermis definida con un leve infiltrado inflamatorio de macrófagos, linfocitos y neutrófilos sin células gigantes ni presencia de amastigotes.

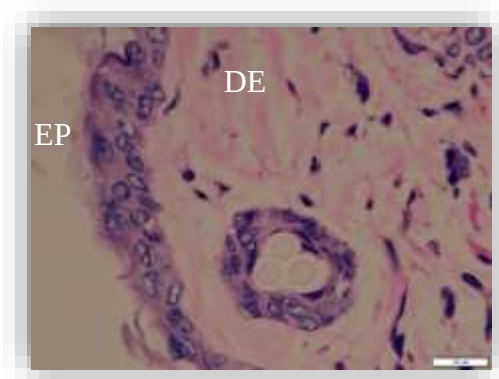
Por el contrario, el ratón R5 (que falló al tratamiento) y el R6 (que presentó una reactivación) presentaron un patrón de no cura con daño de leve a moderado en la epidermis y un infiltrado inflamatorio severo y presencia de abundantes amastigotes en la dermis (**Tabla 11, figura 18A**).

Los dos ratones infectados con *L. (V.) braziliensis* (ratones R1 y R3) que mostraron cura estética y parasitológica al día 60 PT, mostraron un patrón de cura con una epidermis normal y un infiltrado inflamatorio de ausente a leve (**tabla 11, figura 18B**). Los ratones en los que la lesión se reactivó (ratones R4, R5 y R6) se encontró un patrón de no cura observándose de leve a severa acantosis, hiperqueratosis, paraqueratosis y espongiosis y de leve a moderada necrosis. Estos ratones presentaron también, en la dermis, un moderado a severo infiltrado inflamatorio en el que predominaron células como linfocitos, neutrófilos, macrófagos y células gigantes y presencia de abundantes amastigotes

El ratón R2 que presentó cura estética al tratamiento, con parásitos ausentes en las improntas, presentó un patrón de no cura parcial. Si bien no se observaron cambios evidentes en la epidermis, se entraron moderadas áreas de necrosis y de infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos. Se encontraron escasas células gigantes y una moderada cantidad de amastigotes (**tabla 11, figura 18B**).

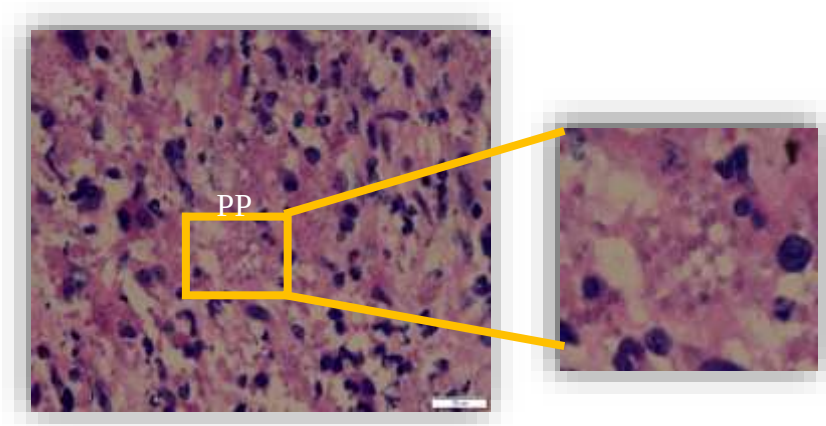
Teniendo en cuenta los resultados de los ratones que curaron con los que no curaron, según la tabla 8 resumen y analizando los parámetros histológicos en epidermis, dermis y presencia de parásitos, se puede concluir que la eficacia parasitológica del Glucantime con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días estuvo relacionada con el patrón de cura y la no eficacia parasitológica (presencia de parásitos) en los cortes histopatológicos estuvo relacionada con un patrón de no cura. Esto fue evidente en ambas especies de parásitos.

17.A Patron histopatológico despues del tratamiento con miltefosina 0,5% (cura)



EP: epidermis, DE: dermis

17.B Patron histopatológico despues del tratamiento con el vehiculo (no cura)



PP: presencia de parásito

Figura 17. Patrones histopatológicos de cura y de no cura

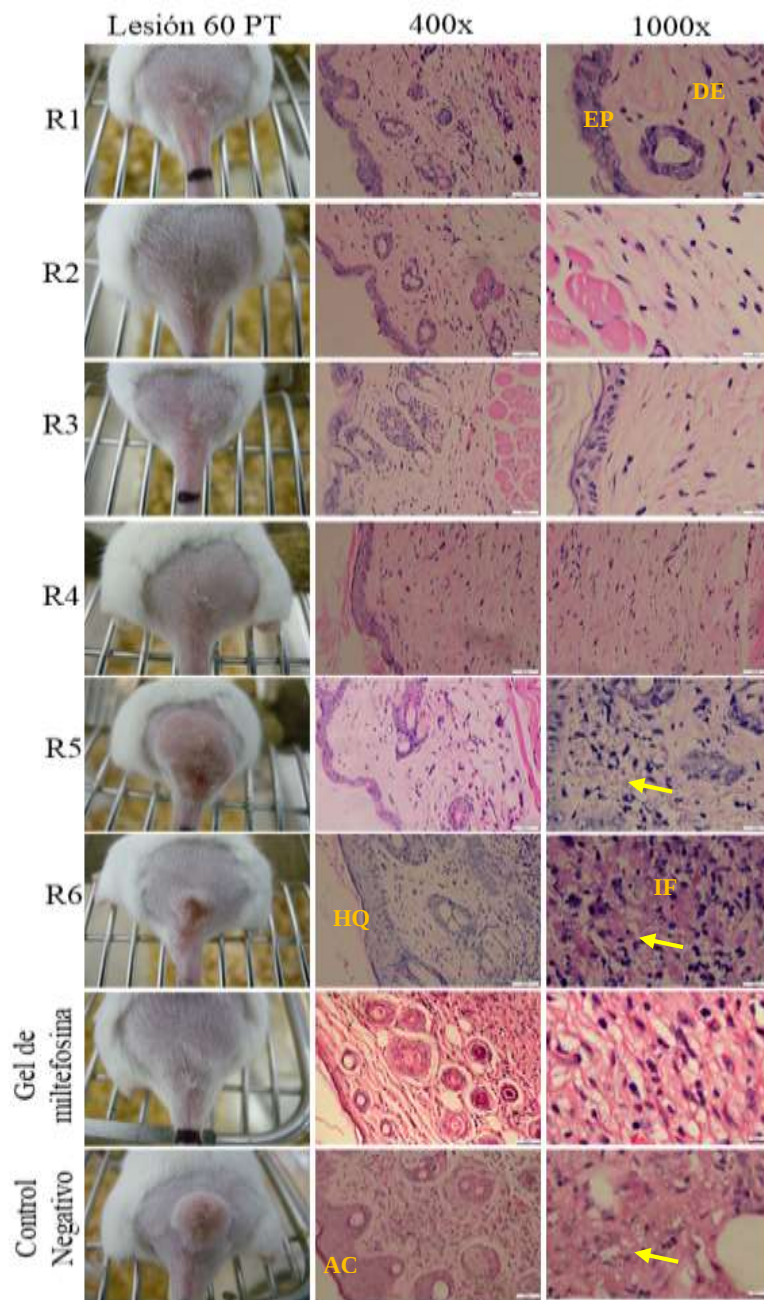
Tabla 11.

Intensidad de las variables histopatológicas en lesiones de ratones BALB/c infectados con L. (V.) panamensis y L. (V.) braziliensis tratados con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días encontradas en la epidermis y dermis 60 días postratamiento.

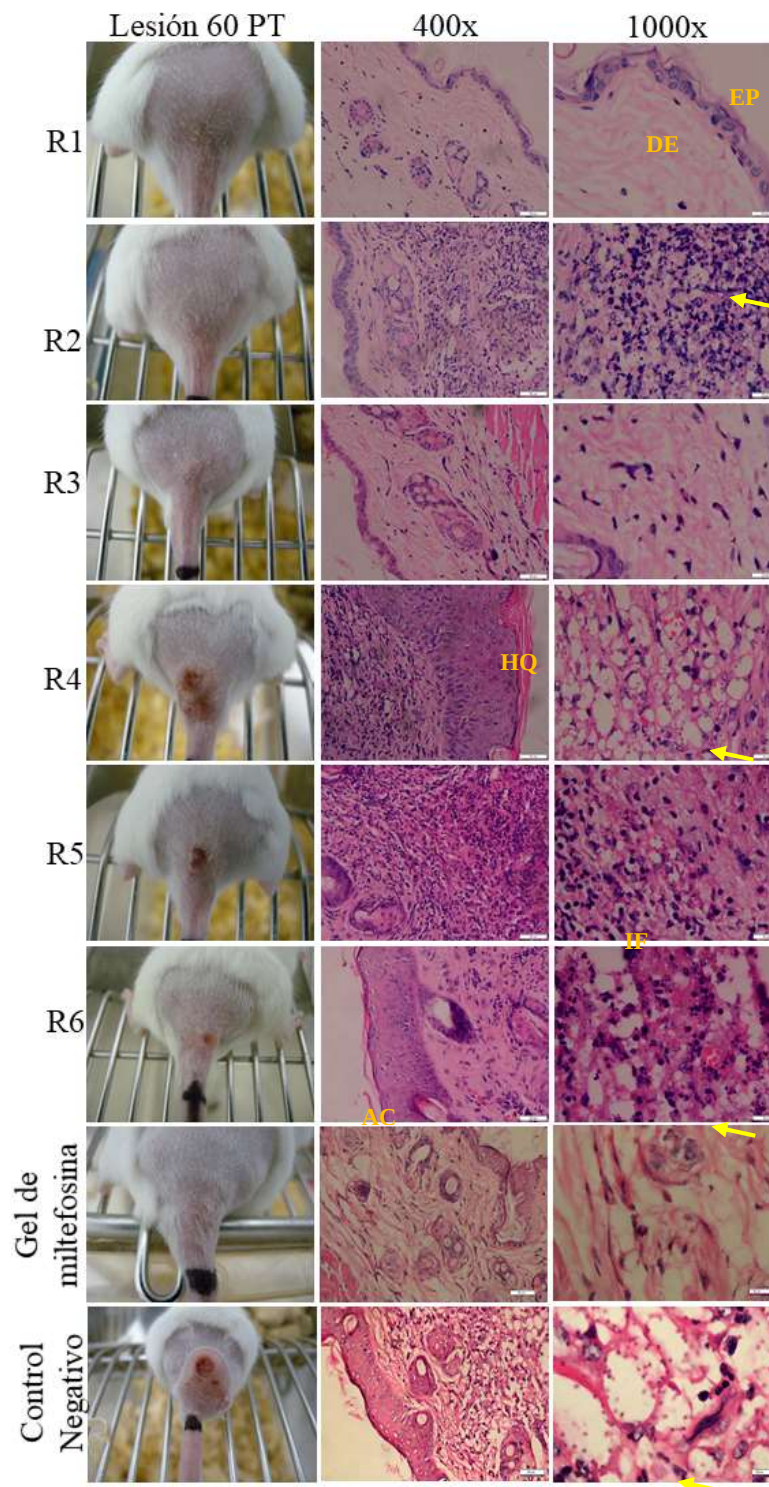
Característica histopatológica	L. (V.) panamensis						L. (V.) braziliensis					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Acantosis	-	-	+	-	+	++	-	-	-	+++	+	+++
Hiperqueratosis	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Paraqueratosis	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	++
Espongiosis	-	-	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++
Necrosis	-	-	-	-	+	-	-	++	-	+	-	++
Infiltrado inflamatorio	+	+	+	+	+++	+++	-	++	+	++	++	+++
Composición celular del infiltrado												
Linfocitos	+	+	+	+	+++	+++	-	+++	+	+	+++	+++
Macrófagos	+	+	+	+	+++	+++	-	+	+	+++	+++	+++
Neutrófilos	+	+	+	+	+++	+++	-	+	+	+++	+++	+++
Células gigantes	-	-	-	-	+	+++	-	+	+	+	++	++
Amastigotes	-	-	-	-	+++	+++	-	++	-	+++	+++	+++

Nota: Parámetros histológicos evaluados (-, ausencia, +, leve; ++, moderado; +++severo); R: ratón.

Los valores fueron obtenidos de las áreas histopatológicas más dominantes. Observación en 50 campos microscópicos, aumentos de 1000X. Color azul: ratón que falló al tratamiento; color rojo: ratones que presentaron una reactivación de la lesión; color verde: ratón que presentó amastigotes en una lesión curada.

18A. Infectados con *L. (V.) panamensis*

Aumento de 400X y 1000X. Las flechas amarillas indican la presencia de amastigotes. EP: epidermis. DE: dermis. AC: acantosis. HQ: hiperqueratosis. IF: infiltrado inflamatorio. R: ratón.

18B. Infectados con *L. (V.) braziliensis*

Aumentos en 400X y 1000X. Las flechas amarillas indican la presencia de amastigotes extracelulares. EP: epidermis. DE: dermis. AC: acantosis. HQ: hiperqueratosis. IF: infiltrado inflamatorio. R: ratón. Las biopsias fueron analizadas por dos observadores.

Figura 18. Características histopatológicas de las lesiones de los ratones tratados con IL con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días, 60 días PT.

4.1.3.3 Efecto de la respuesta histopatológica en los órganos: Con los resultados encontrados en la respuesta histopatológica no fue posible involucrar este factor en la eficacia al Glucantime debido la variabilidad de la respuesta histopatológica encontrada en los órganos. Se procedió hacer una descripción resumida de los principales resultados encontrados (Figura 19) y al final se colocó el patrón de cura encontrado al tratamiento con MTF tópica descrito por Neira et al., 2019.

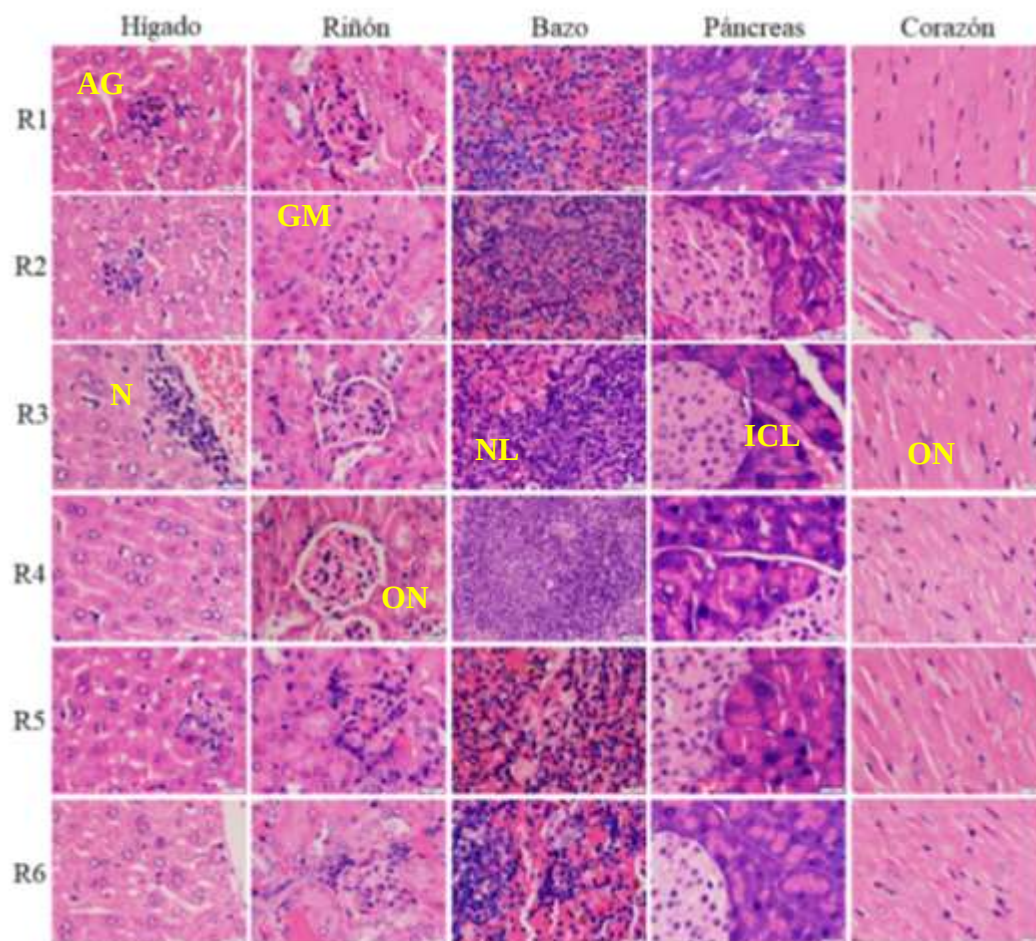
En los órganos de los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* analizados se evidenciaron, después del tratamiento IL con $150 \text{ mgSb}^V/\text{Kg}/\text{día}$ por 29 días algunos hallazgos histopatológicos. En el hígado se observó aglomeración de sinusoides (capilares entre las láminas de hepatocitos) leve, en el riñón se observó una glomerulonefritis mesangial proliferativa leve (proliferación generalizada y diseminada de las células mesangiales con aumento de la cantidad de matriz), mientras que el bazo, el corazón y el páncreas se observaron normales (**Figura 19A**).

En los órganos de los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*, el tratamiento indujo una toxicidad leve (necrosis) en el hígado con una aglomeración de sinusoides, degeneración de los hepatocitos observándose vacuolados. El 50% de los ratones tratados presentaron daño en el riñón como glomerulonefritis mesangial proliferativa leve, el páncreas de un ratón presentó un aumento de los islotes de las células Langerhans, en el bazo se observaron nódulos linfáticos activados, presencia de células plasmáticas. No se evidenciaron cambios en el corazón (**Figura 19B**). En ninguno de los órganos estudiados se evidenció la presencia de amastigotes.

El patrón de cura con MTF tópica encontrado descrito en el artículo de Neira et al., 2019 mostró que en ninguno de los órganos estudiados se evidenció la presencia de amastigotes. Se observaron cambios histopatológicos similares para ambas especies de parásitos. En el hígado se observó ligera aglomeración de sinusoides, linfocitos y polimorfonucleares, sin fibrosis o granulomas, en el bazo se observó una ligera pérdida de la proporción entre la pulpa roja y la pulpa blanca con

aumento de folículos esplénicos, linfocitos y en la pulpa roja con aumento de eritrocitos, megacariocitos y leucocitos. Los ganglios se observaron aumentados de tamaño y microscópicamente se observó un aumento linfocitos acompañados de células dendríticas; no se observó la medula ni el hilio del ganglio. En ningún órgano se observaron amastigotes (intracelulares o extracelulares) en los campos microscópicos observados.

19A Infectados con *L. (V.) panamensis*



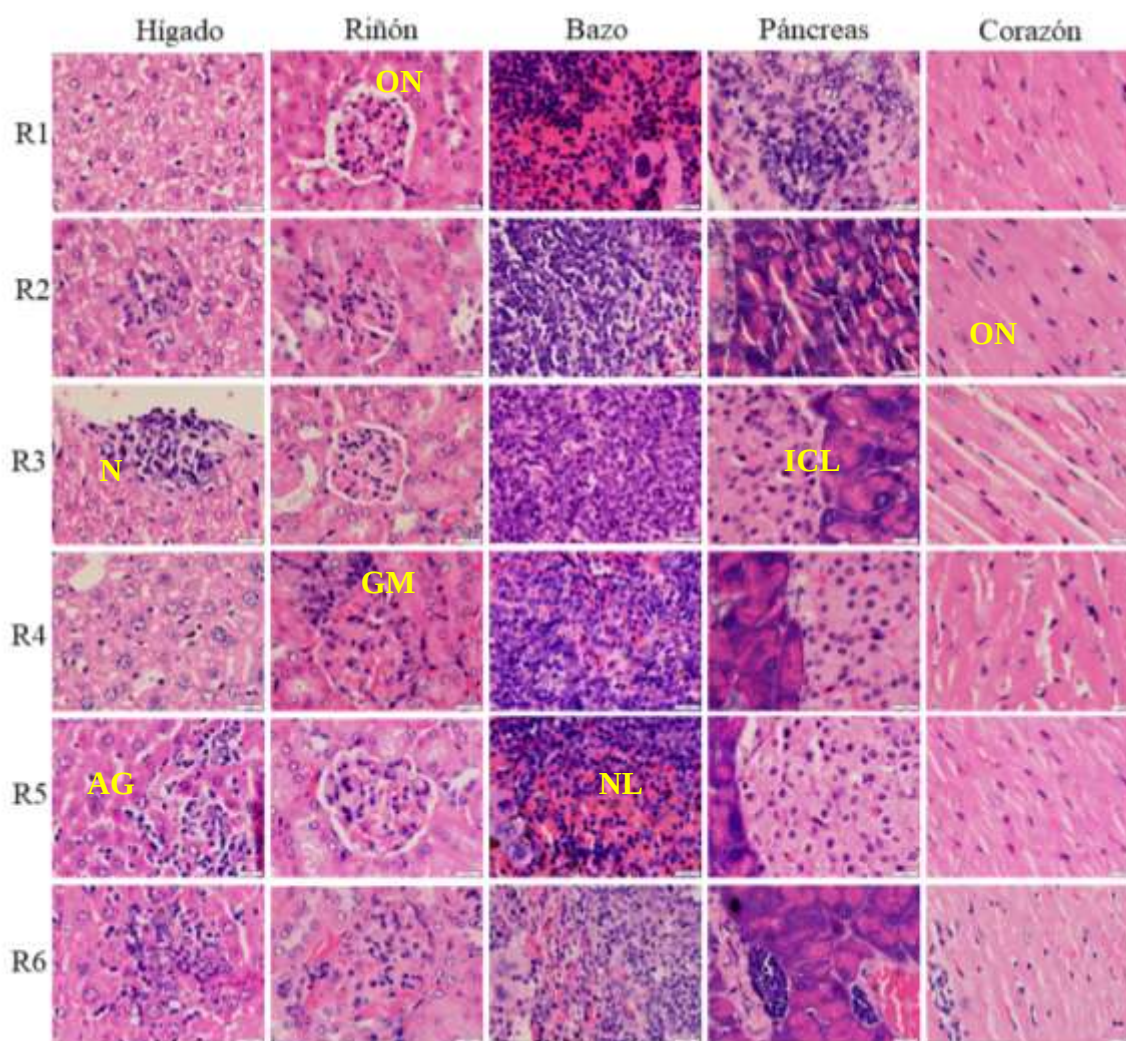
19B Infeccionados con *L. (V.) braziliensis*

Figura 19. Características histopatológicas de órganos de ratones BALB/c infectados tratados con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días, 60 días PT.

Aumentos en 1000X. R: ratón. AG: aglomeración de sinusoides. GM: glomerulonefritis mensagio-proliferativa. ICL: islotes de las células Langerhans. NL: nódulos linfáticos. N: necrosis. ON: órgano normal. Las biopsias fueron analizadas por dos observadores.

4.1.4.4 Efecto de algunos parámetros bioquímicos en la respuesta al tratamiento: Con respecto a este resultado es importante antes del análisis, decir la dificultad que se tuvo en la obtención de la sangre por punción cardíaca. Algunas de las muestras se hemolizaron y tuvieron que ser descartadas y la cantidad de muestra no fue siempre la necesaria (lo cual hizo que no se pudieran repetir algunas mediciones). Las muestras que se pudieron analizar se muestran en la tabla 12.

Resultados encontrados con referencia a los valores normales:

Los resultados de las pruebas bioquímicas en los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y tratados con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días mostró en los 6 ratones que se trataron, el ratón R4 presentó un aumento en los niveles de ASL 166,38 U/L así como de urea 61,75mg/d/L y valores disminuidos de α -amilasa 362,12 U/L. El ratón R2 mostró valores de urea de 52,75 mg/d/L (por debajo del control).

Con respecto a los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*, el ratón R3 presentó una disminución en los niveles bioquímicos de AST 72,1 U/L y urea 45,1 mg/d/L así como el ratón R6 con valores de 73,9 y 51,1 mg/d/L respectivamente. Los resultados de los ratones R1 y R2 no se realizaron, no fue posible tomar la muestra de sangre.

Todos los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* y tratados con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días presentaron valores inferiores en α -amilasa con respecto a los valores de referencia (ratones sin tratamiento) **ver tabla 12.**

Tabla 12.

Pruebas bioquímicas en suero de ratones BALB/c infectados con las dos especies de Leishmania

Prueba bioquímica	Valores de referencia	<i>L. (V.) panamensis</i>						<i>L. (V.) braziliensis</i>			
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R3	R4	R5	R6
AST (U/L)	91,00-142,12	135,0	92,4	116,3	166,3	90,6	120,2	72,1	68,4	110,9	73,9
ALT (U/L)	8,18-34,97	39,7	14,7	23,8	15,9	13,6	21,53	15,9	14,7	29,5	17,0
Urea (mg/dL)	53,67-59,63	56,8	52,8	68,1	61,8	74,5	53,8	45,9	54,0	44,8	51,1
α -Amilasa (U/L)	981,01-1243,27	602,4	533,3	516,8	362,1	454,3	521,2	476,2	483,9	482,8	429,1

Nota: AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; R: ratón. Números de color rojo: niveles bioquímicos aumentados; números de color azul: niveles bioquímicos disminuidos.

Parametros bioquimicos asociados con la respuesta al tratamiento

Teniendo en cuenta la **tabla resumen 8**, analizando los promedios en los valores en los parámetros bioquímicos entre los ratones que curaron y no curaron al tratamiento con Sb^V utilizando una dosis 150 mg/Kg/día/ 29 días (**Tabla 13**), se encontró una gran heterogeneidad en los resultados (Ver desviación estándar, DE), no encontrándose una asociación de la cura con los parámetros bioquímicos evaluados.

Tabla 13.

Promedios de los parametros bioquímicos en suero de ratones curados y no curados al tratamiento con 150 mg/Sb^V/Kg/día/29 días

150 mg/kg/día	Cura			No cura		
	Vt	L.p	L.b	Vt	L.p	L.b
AST	116,5	127,6	72,1	107,7	105,4	84,4
(U/L±DS)	±36,6	±31,1	±0,0	±43,5	±20,9	±23,1
ALT	22,0	23,5	15,9	20,6	17,6	20,4

150 mg/kg/día	Cura			No cura		
	Vt	L.p	L.b	Vt	L.p	L.b
(U/L±DS)	±10,5	±11,5	±0,0	±8,9	±5,6	±8,0
Urea	57,1	59,9	45,9	57,0	64,2	50,0
(mg/dL±DS)	±8,5	±6,6	±0,0	±13,5	±14,6	±4,7
Amilasa	498,2	503,7	476,2	621,1	487,8	465,3
(U/L±DS)	±88,7	±101,4	±0,0	±212,2	±47,3	±31,3

Nota: Vt: valor total, L.p: *L. (V.) panamenisis*, L.b: *L. (V.) brazilienis*; ASL: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa, DE: desviación estándar

4.1.4.5 Efecto del peso en la respuesta al tratamiento: Para determinar si el peso de los ratones tomados antes del tratamiento y 43 y 60 días PT, afectaban el tratamiento con Sb^V a una dosis de 150 mg/kg/día por 29 días, nuevamente se tuvo en cuenta las diferencias entre los 6 ratones que curaron con los ratones que no curaron mostrados en la tabla 8. Los datos se dividieron en cuatro subgrupos: los que presentaban cura y aquellos que no para cada especie y se aplicó análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, teniendo como factores el tiempo y la cura completa. Tal como se observa en la tabla 14, el factor tiempo era estadísticamente influyente con respecto al peso (p menor a 0,05), mientras que el factor peso no estaba relacionado con la curación. Al realizar comparación múltiple mediante prueba de Turkey, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro subgrupos ($p < 0,05$). Esto indica que no existen una relación estadísticamente significativa entre el peso de los roedores y la cura o no cura estética de las lesiones.

Tabla 14.

Promedios peso de ratones curados y no curados al tratamiento con 150 mg/Sb^V/Kg/día/29 días

	150 mg Sb ^V /kg/día	Cura			No cura		
		Vt	L.p	L.b	Vt	L.p	L.b
Peso (gramos ± DE)	Antes del tratamiento	26,1 ±1,3	26,5 ±1,5	25,4 ±0,7	27,1 ±1,8	29,4 ±0,7	25,9 ±1,7
	43 PT	26,7 ±1,2	26,9 ±1,4	26,2 ±1,1	27,8 ±1,4	29,7 ±0,4	26,6 ±2,9
	60 PT	26,7 ±1,2	26,9 ±1,4	26,2 ±1,1	28,7 ±1,3	30,2 ±1,1	26,9 ±2,6

Nota: PT: postratamiento; Vt: valor total, L.p: *L. (V.) panamensis*, L.b: *L. (V.) braziliensis*

4.1.5 Factores relacionados con el fármaco en la respuesta al tratamiento. Según la **tabla 8**, de número de ratones curados versus no curados a las diferentes concentraciones, seis ratones evaluados en el estudio curaron y 30 no lo hicieron.

La respuesta al tratamiento con los Sb^V fue dependiente de la dosis de fármaco utilizado. Utilizando un esquema igual de tratamiento (100 µL) por 29 días, la eficacia del tratamiento con 150 mgSb^V/Kg/día por 29 días para *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* fue del 66,6 % y 33,3% respectivamente. La respuesta a dosis menores se observa en la figura 20.

Sobre la actividad el Glucantime en términos de dosis efectiva (DE)₅₀ solo fue posible calcularla en los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* que fué de 145 mg Sb^V/Kg/día. En los infectados con *L. (V.) braziliensis* fue mayor de 150 mg Sb^V/Kg/día.

Es necesario utilizar una dosis mayor de Sb^V para comprobar este resultado.

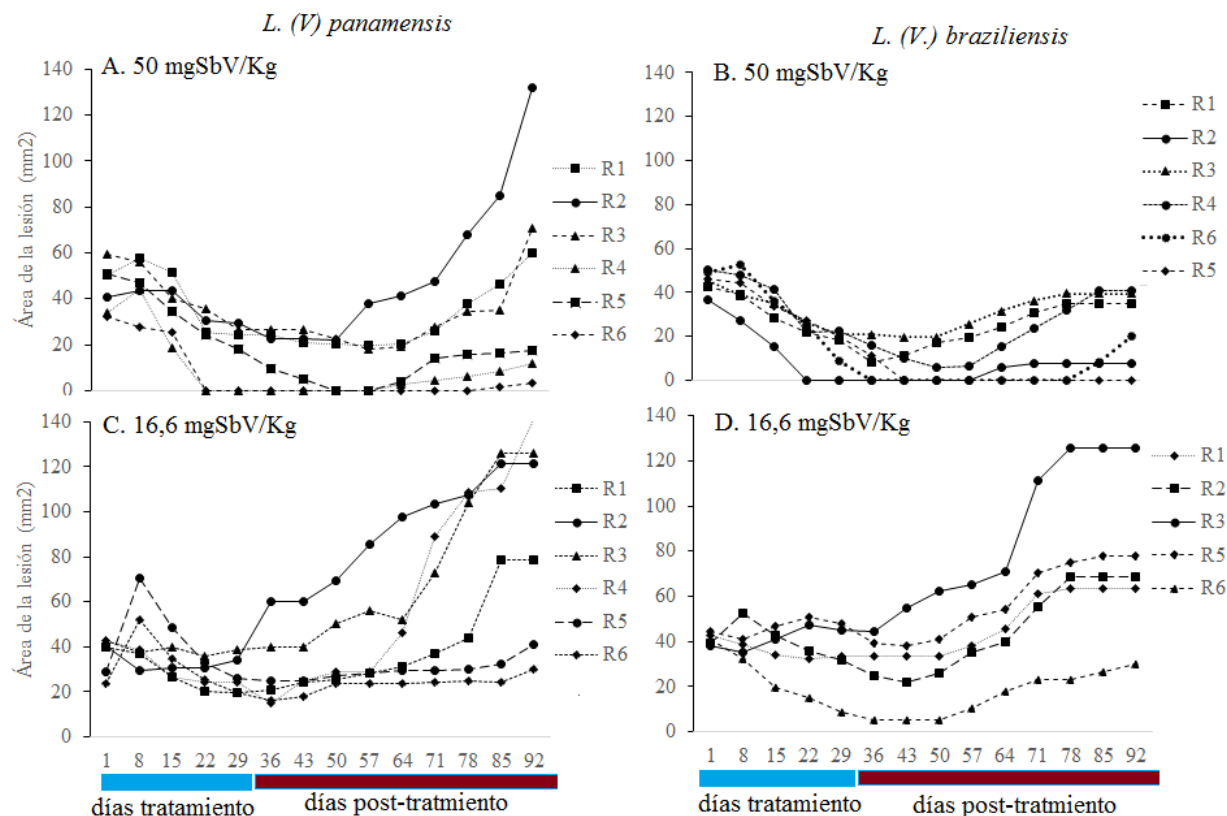


Figura 20. Efecto del tratamiento intralesional con 50 y 16,6 mgSb^V/Kg/día por 29 días en las lesiones de ratones BALB/c infectados. La figura A y C muestra en los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y la figura B y D los resultados de los ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*. Se muestra la evolución de las lesiones (nódulo) desde el inicio del tratamiento hasta 60 días PT. R: ratón.

4.2 Resultados fase 2 *in vitro*

En la fase dos, se determinó la susceptibilidad de los parásitos a los Sb^V la cual fue relacionada con factores dependientes de los parásitos, célula hospedera y el fármaco.

4.2.1 Implementación. Los parásitos utilizados en la fase *in vitro* fueron la cepa nativa o *wild type* (WT) y los parásitos codificados como *LpR2* (del ratón que reactivó R6) y *LbR1* (del ratón

que reactivó R6), aislados de ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* respectivamente, tratados con 150 mg Sb^V/Kg/día por 29 días. Los parásitos fueron obtenidos tal como se describió en la metodología numeral 3.3.2.

4.2.2 Susceptibilidad *in vitro* a los Sb^V. Ninguno de los promastigotes de los parásitos evaluados (WTLp, WTLb, LpR2 y LbR1) fueron susceptibles al tratamiento con Sb^V (Glucantime)

4.2.3 Factores relacionados con los parásitos

4.2.3.1 Con respecto a las especies del parásito y a los parásitos de la reactivación: Dada la no actividad del SbV en los promastigotes de todos los parásitos evaluados, la no respuesta al SbV no se puede relacionar ni con la especie del parásito ni con el hecho que los parásitos hubieran sido sometidos a un ciclo de tratamiento *in vivo* con SbV.

4.2.3.2 Con respecto a la forma de vida: En los parásitos estudiados (WTLp, WTLb, LpR2 y LbR1), ningún estadio estudiado: promastigotes, amastigotes axénicos o amastigotes intracelulares infectando células THP-1, fueron susceptibles al SbV *in vitro*. La no respuesta a los SbV no estuvo relacionada con la forma de vida del parásito. Estos experimentos fueron repetidos hasta cuatro veces.

4.2.3.3 Con respecto a la cinética de transformación promastigotes amastigotes: Obtención de amastigotes axénicos: A partir de promastigotes, se pudieron obtener amastigotes axénicos en

los parásitos estudiados (WTLp, WTLb, LpR2 y LbR1) cuando estos fueron cultivados a 32 °C, 5 % CO₂ y 20 % de SFBi pH 5,5.

Cinética de transformación entre los parásitos estudiados

Como se observa en la **figura 21** la cepa WT de *L. (V.) braziliensis* fue la que mayor concentración de amastigotes axénicos presentó desde el primer día de transformación ($5,0 \times 10^7$ parásitos/mL). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número de amastigotes entre las especies, desde el día primero al cuarto, para el octavo día todas las cepas de *Leishmania* lograron la transformación a amastigotes axénicos (figura 21). Durante cada día se podía observar los cambios morfológicos que presentaban los parásitos hasta llegar a células ovaladas sin flagelo (amastigotes axénicos) que aumentaba su concentración al pasar el tiempo y células con cuerpo elongado y flagelados (promastigotes) la cual iba disminuyendo ver **figura 22**. Como se observa en la **figura 23**, en algunos tiempos la transformación a amastigotes axénicos (cuadros más oscuros) fue menor en las cepas obtenidas de la reactivación que de las WT, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Relación de las diferencias en la cinética de transformación en la respuesta al Sb^V

La no respuesta a los Sb^V no estuvo relacionada con las diferencias encontradas en la cinética de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos.

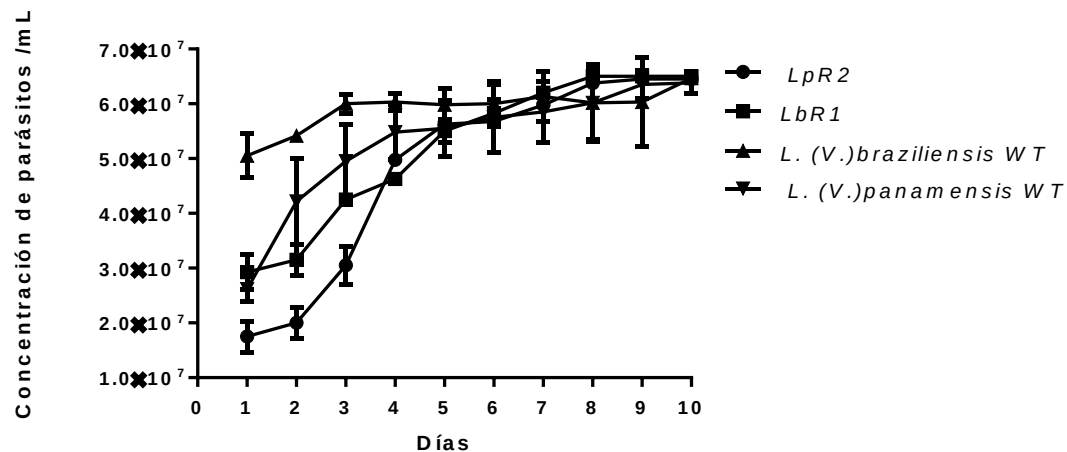


Figura 21. Concentración de amastigotes axénicos durante 10 días de transformación en las especies de *Leishmania*. WTp: *L. (V.) panamensis*. WTb: *L. (V.) braziliensis*. LpR2: cepa *L.V. panamensis* aislada. LbR1: cepa *L. (V.) braziliensis* aislada.

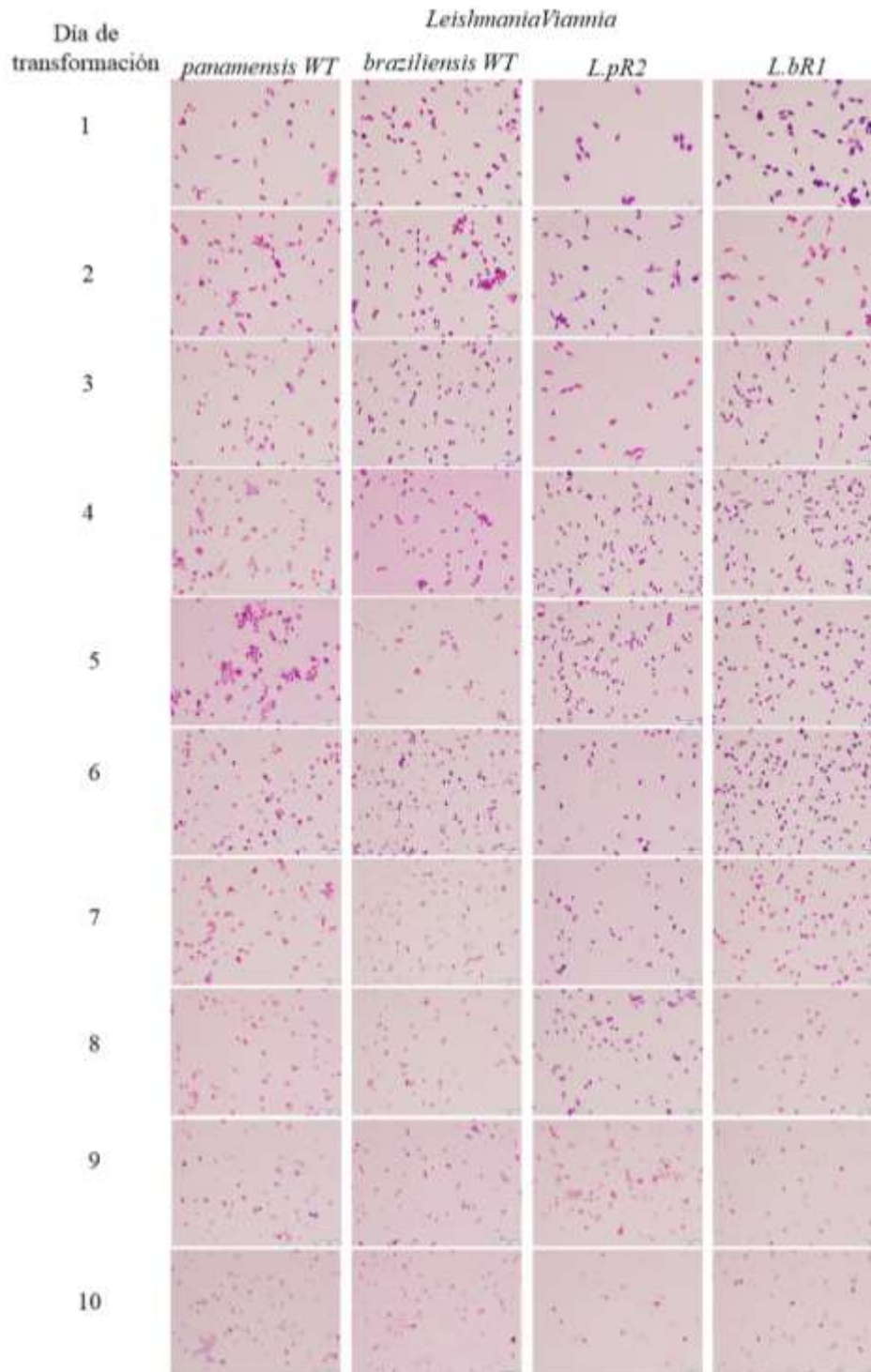


Figura 22. Morfología de los parásitos en los diferentes días de transformación de promastigotes a amastigotes axénicos.

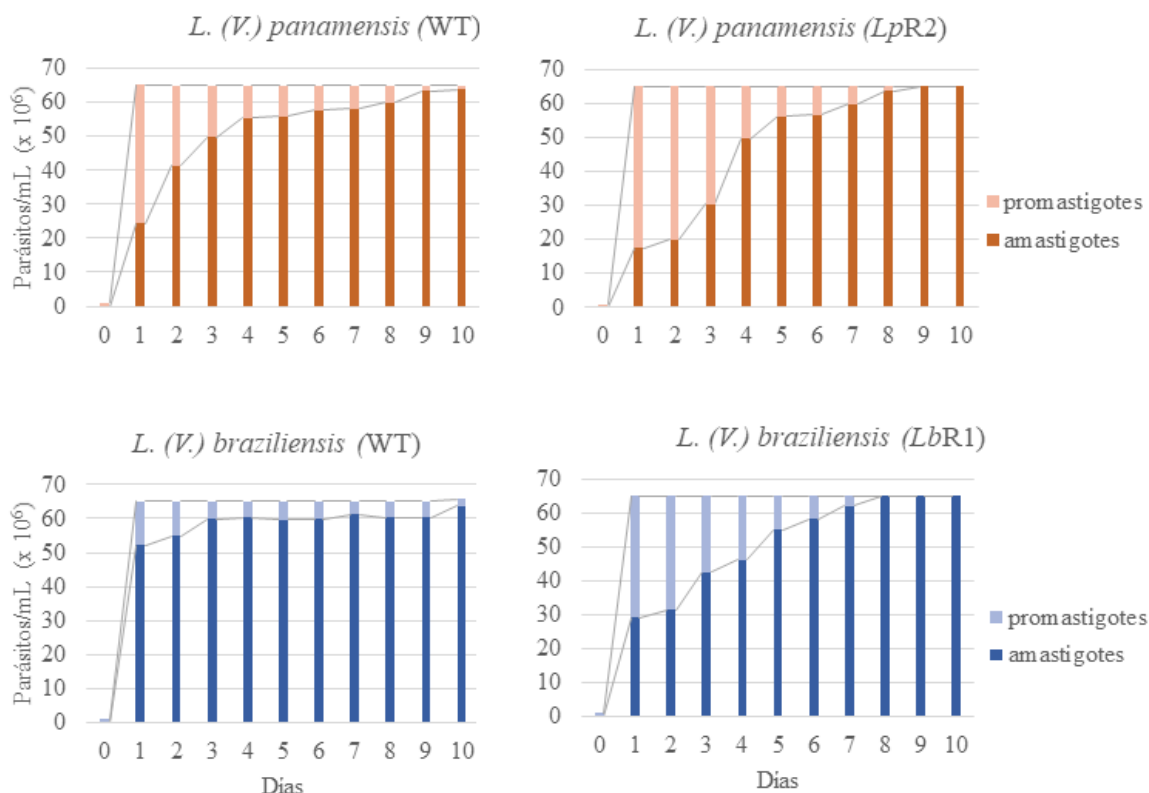


Figura 23. Relación promastigotes/amastigotes axénicos durante 10 días de transformación en las especies de *Leishmania*. WTp: *L. (V.) panamensis*. WTb: *L. (V.) braziliensis*. LpR2: cepa *L.V. panamensis* aislada. LbR1: cepa *L. (V.) braziliensis* aislada.

4.2.3.4 Con respecto a la susceptibilidad de los parásitos a fármacos: Susceptibilidad de promastigotes y amastigotes axénicos a PMD, KTZ, MTF

La actividad de los fármacos en términos de CI_{50} y CI_{90} al tratamiento con PMD, KTZ y MTF, se muestran en la **tabla 15**. Todos los parásitos fueron susceptibles *in vitro* a los fármacos estudiados con actividades de CI_{50} en promastigotes entre 0,17 a 0,89 μM para PMD, CI_{50} entre 4,93 y 11,60 μM para KTZ y CI_{50} entre 8,59 y 15,09 μM para MTF. En amastigotes axénicos con CI_{50} entre 1,70 a 5,63 μM para PMD, CI_{50} entre 2,13 y 18,30 μM para KTZ y CI_{50} entre 7,23 y 20,99 μM para MTF. El efecto de cada uno de estos fármacos en el crecimiento de los parásitos se observa en

la **figura 24**, en donde se relaciona los resultados obtenidos con cada una de las especies tanto WT como reactivadas (Re). Todos los parásitos fueron susceptibles *in vitro* a los fármacos antileishmania de referencia. En general los promastigotes fueron más susceptibles a los fármacos que los amastigotes axénicos.

Relación de la susceptibilidad de fármaco en la respuesta al Sb^V

La no respuesta a los Sb^V no estuvo relacionada con las diferencias encontradas en la susceptibilidad a PMD, KTZ y MTF entre promastigotes a amastigotes axénicos y entre parásitos WT con parásitos recuperados de lesiones que se reactivaron después de un ciclo de tratamiento *in vivo* con Sb^V.

Tabla 15.

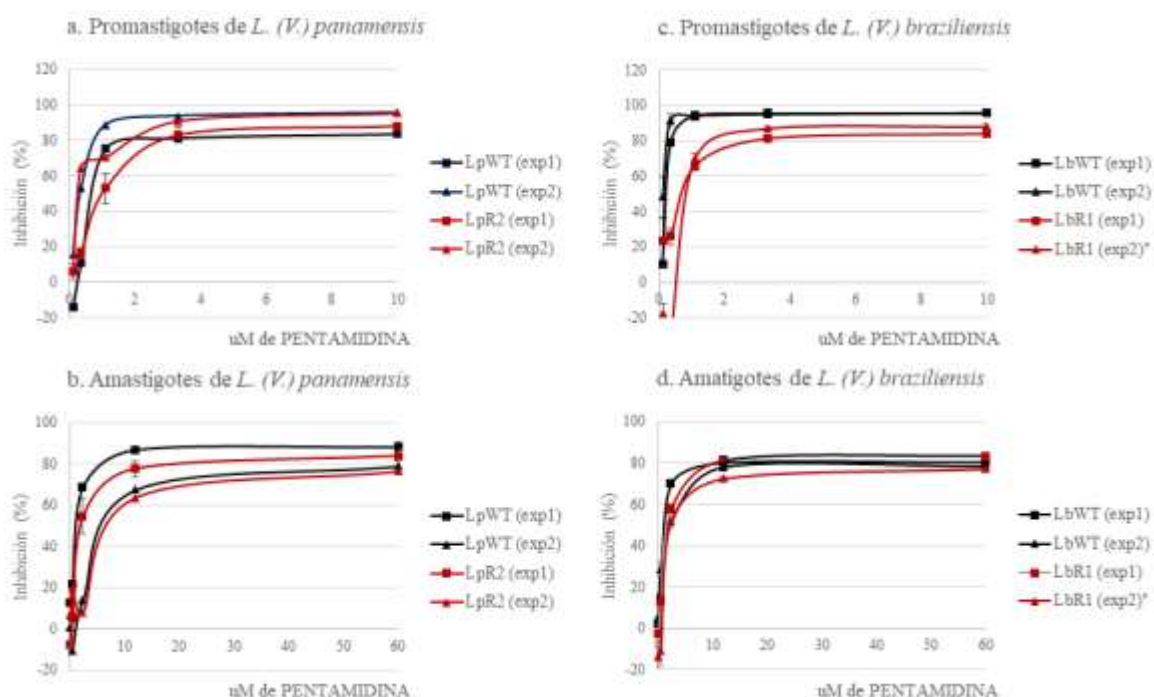
Susceptibilidad de promastigotes y amastigotes axénicos de Leishmania Viannia a fármacos

Parásitos		Actividad en promastigotes (μM ± DE)					
		PMD		KTZ		MTF	
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
<i>L. (V.) panamensis</i>	WT _p	0,31 ± 0,04	0,97 ± 0,49	8,03 ± 3,23	13,46 ± 0,0	8,59 ± 7,64	17,05 ± 11,89
	LpR2	0,67 ± 0,55	2,14 ± 0,0	10,26 ± 3,21	11,56 ± 0,0	15,09 ± 2,96	18,69 ± 7,64
<i>L. (V.) braziliensis</i>	WT _b	0,17 ± 0,06	0,43 ± 0,09	4,93 ± 0,09	11,31 ± 4,21	6,71 ± 0,08	10,55 ± 0,10
	LbR1	0,89 ± 0,22	>30 ± 0,0	11,60 ± 0,55	8,90 ± 1,52	11,40 ± 2,79	13,24 ± 5,54
Parásitos		Actividad en amastigotes axénicos (μM ± DE)					
		PMD		KTZ		MTF	
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
<i>L. (V.) panamensis</i>	WT _p	4,51 ± 4,45	ND	3,95 ± 0,24	ND	5,88 ± 2,54	ND
	LpR2	5,63 ± 4,90	ND	2,13 ± 0,81	ND	7,23 ± 0,57	ND
<i>L. (V.) braziliensis</i>	WT _b	1,70 ± 0,41	ND	6,19 ± 0,55	ND	6,19 ± 1,70	ND

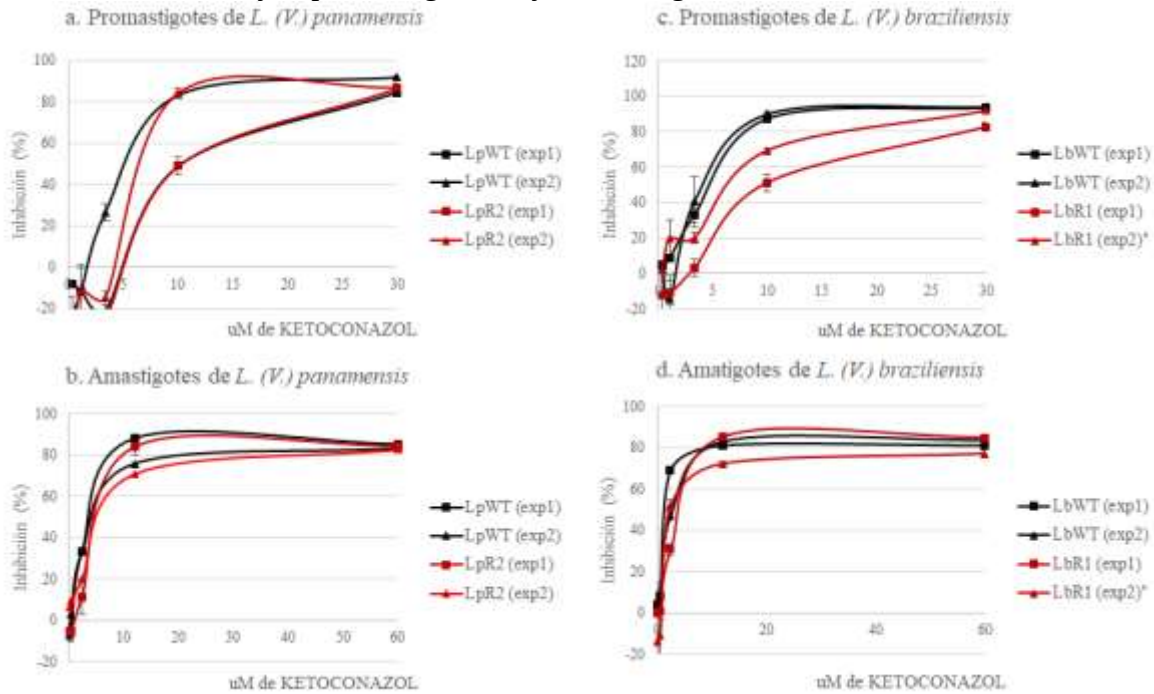
Parásitos	Actividad en promastigotes ($\mu\text{M} \pm \text{DE}$)					
	PMD		KTZ		MTF	
	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
<i>LbR1</i>	7,43 $\pm$ 7,79	ND	18,30 $\pm$ 4,36	ND	20,99 $\pm$ 1,84	ND

Nota: CI: Concentración inhibitoria; PMD: pentamidina; KTZ: ketoconazol; MTF: miltefosina, ND: no determinada. La viabilidad de los parásitos fue determinada por la técnica colorimétrica con resazurina leídos a una longitud de onda de 570 y 600 nm.

24A. Pentamidina: a y c. promastigotes, b y d. amastigotes axénicos



24B. Ketonocazol, a y c. promastigotes, b y d. amastigotes axénicos



24C. Miltefosina, a y c. promastigotes, b y d. amastigotes axénicos

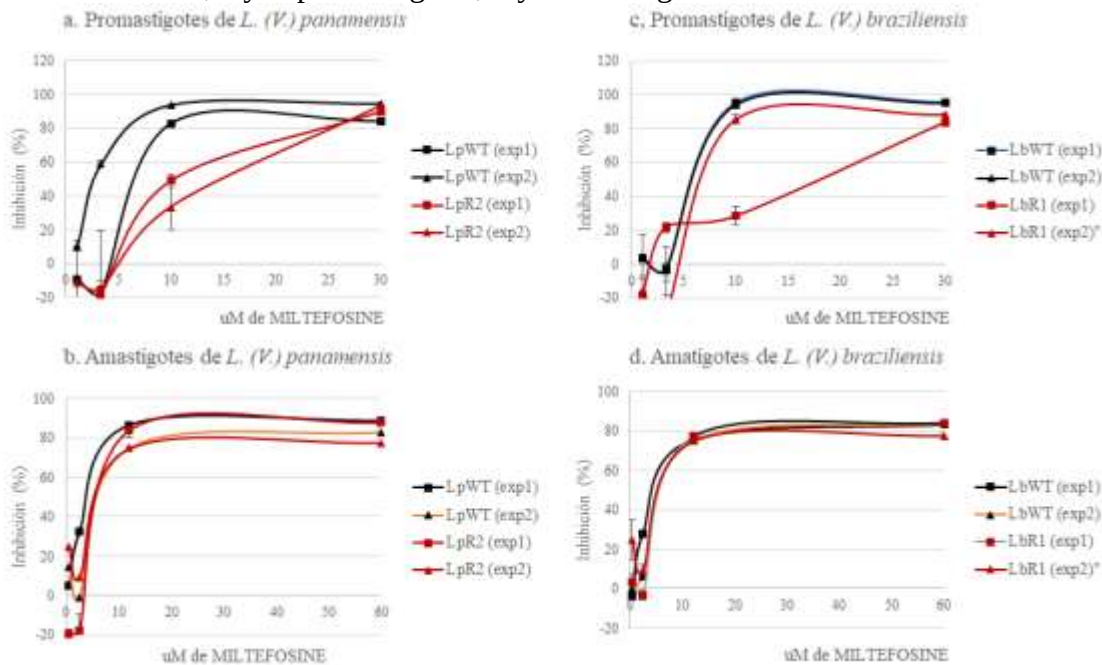


Figura 24. Susceptibilidad de promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania Viannia* a fármacos. Se observan los porcentajes de inhibición del crecimiento de *L. (V.) panamensis* (derecha) y *L. (V.) braziliensis* (izquierda) al tratamiento con las diferentes concentraciones de A. Pentamidina, B. Ketoconazol, C. Miltefosina. Líneas negras cepas WT, rojas parásitos de lesiones que reactivaron. Dos experimentos.

4.2.4 Factores relacionados con la célula hospedera

4.2.4.1 Infectividad de los parásitos en células: La infección con promastigotes de *L. (V). panamensis* y *L. (V). braziliensis* (WT), LpR2 y LbR1 en células THP-1 mostró rangos de porcentajes de infección entre 75 %, 97 % y 100 % después de 24, 48 y 72 horas de la infección (figura 25 graficas de la línea superior). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de infección entre las especies de *Leishmania* ($p < 0,05$). En relación con el número de amastigotes por célula (ver tabla 18), y como se observa en la figura 25 a las 72 horas la mayoría de las células presentaron más de 20 parásitos por células (barras más claras figura 25). En la figura 26 se muestran ejemplos de las células infectadas.

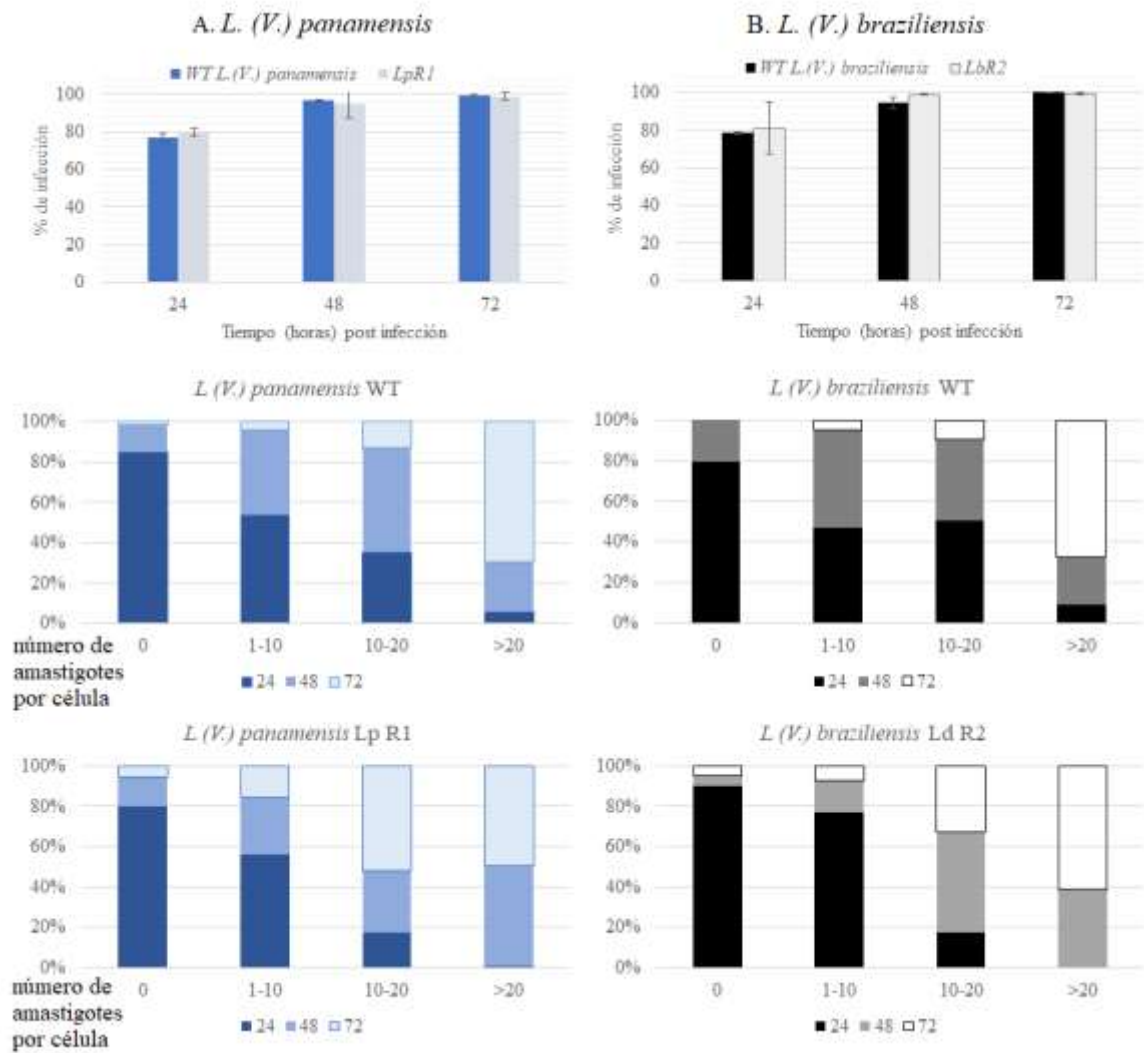


Figura 25. Porcentajes de infección y número de amastigotes por célula después de la infección de amastigotes axénicos en células THP-1 en diferentes tiempos post-infección *in vitro*.

Tabla 16.

Número de amastigotes por célula después de la infección de amastigotes axénicos en células THP-1 en diferentes tiempos post-infección in vitro.

Especie de parásito	Número de amastigotes por célula											
	24 horas				48 horas				72 hora			
	0	1-10	10-20	>20	0	1-10	10-20	>20	0	1-10	10-20	>20
WTP	22	55	16	7	3	33	32	32	1	3	8	88
LpR2	20	65	15	1	4	32	26	37	1	18	43	37
WTb	22	41	25	12	6	42	20	32	0	4	5	91
LbR1	19	65	16	1	1	13	47	39	1	6	31	63

Nota: WTP: *L. (V.) panamensis*; WTb: *L. (V.) braziliensis*; LpR2: cepa *L.V. panamensis* aislada; LbR1: cepa *L. (V.) braziliensis* aislada.

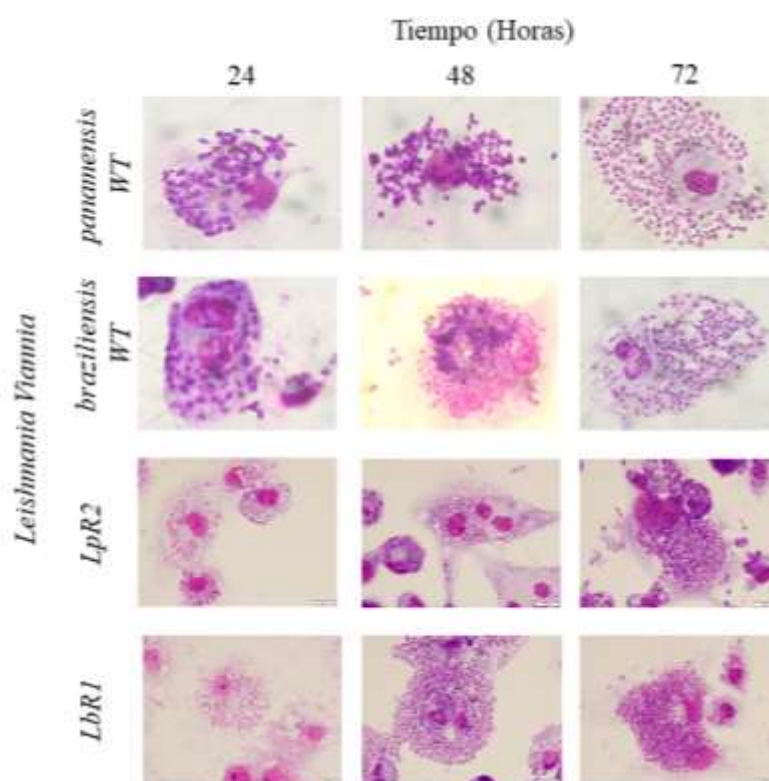


Figura 26. Infección de parásitos de *Leishmania* en células THP-1 diferenciadas a diferentes tiempos (horas). Coloreadas con Giemsa observadas en un aumento de 1000X.

4.2.4.2 Relación de la respuesta al Sb^V con la infectividad: La no respuesta a los Sb^V no estuvo relacionada con la infectividad de los parásitos a la célula hospedera utilizada (células THP-1)

4.2.5 Factores relacionados con el fármaco. Con respecto al fármaco paralelamente con el Sb^V (Glucantime), se evaluó la forma reducida del fármaco (Sb^{III}), comercialmente adquirido. El Sb^V no mostró actividad en las diferentes concentraciones evaluadas. La actividad del Sb^{III} en amastigotes axénicos, dependió de la especie de parásito donde se encontró una actividad en términos de CI₅₀ de 33,7 y 57,3 µM de Sb^{III} para *L. (V.) braziliensis* y una CI₅₀ de 237,6 y 248,8 µM en *L. (V.) panamensis*.

En promastigotes no se encontraron diferencias significativas en la actividad del Sb^{III} entre las dos especies de parásitos ver **tabla 19**.

Tabla 17.

Actividad del Sb^{III} y Sb^V en promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania Viannia*

Parásitos		Promastigotes (µM ± DE)			Amastigotes axénicos (µM ± DE)		
		Sb ^{III}		Sb ^V	Sb ^{III}		Sb ^V
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀
<i>L. (V.) panamensis</i>	WTp	33,46 ± 0,0	36,80 ± 0,0	>900	237,64 ± 0,0	ND	>900
	LpR2	52,78 ± 33,16	74,62 ± 50,8	>900	248,76 ± 0,0	ND	>900
<i>L. (V.) braziliensis</i>	WTb	48,18 ± 9,46	82,77 ± 0,0	>900	33,72± 0,0	ND	>900
	LbR1	50,99 ± 9,48	80,2 ± 0,0	>900	57,26 ± 2,07	ND	>900

Nota: CI: Concentración inhibitoria; ND: no determinada. La viabilidad de los parásitos fue determinada por la técnica colorimétrica con resazurina leídos a una longitud de onda de 570 y 600 nm.

El Sb^{III} fue activo al tercer día de exposición con el compuesto en las células THP-1 infectadas con *L. (V). panamensis* y *L. (V). braziliensis* WT teniendo una CI_{50} menor de 66,6 y de 92,33 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (ver tabla 20). Los porcentajes de inhibición al tercer día de exposición con el compuesto fue de 88% en *L. (V). panamensis* y de 86% en *L. (V.) braziliensis*, al quinto día el porcentaje de inhibición fue del 96 % para ambas especies de *Leishmania Viannia* (ver figura 24). Como control positivo se utilizó MTF en *L. (V). panamensis* y *L. (V). braziliensis* se obtuvo una CI_{50} de 3,73 y de 4,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El Sb^{V} no fue efectivo para ninguna de las especies y en ninguno de los días de tratamiento en la concentración de 900 $\mu\text{g/mL}$ ver tabla 20.

Tabla 18.

Actividad in vitro del antimonio en amastigotes intracelulares

Amastigotes intracelulares infectando células THP-1					
Compuesto	Días*	WTp		WTb	
		µg/mL			
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
Sb ^{III}	3	<66,6	>200	92,33	>200
	5	<66,6	133,22	86,04	150,75
Sb ^V	3	>900	>900	>900	>900
	5	>900	>900	>900	>900

Nota: Las células THP-1 infectadas con promastigotes de *Leishmania* fueron tratadas con los compuestos por 3 y 5 días*. WTp: *L.V. panamensis*; WTb: *L.V. braziliensis*; Sb^{III} : antimonio trivalente, Sb^{V} : antimonio pentavalente.

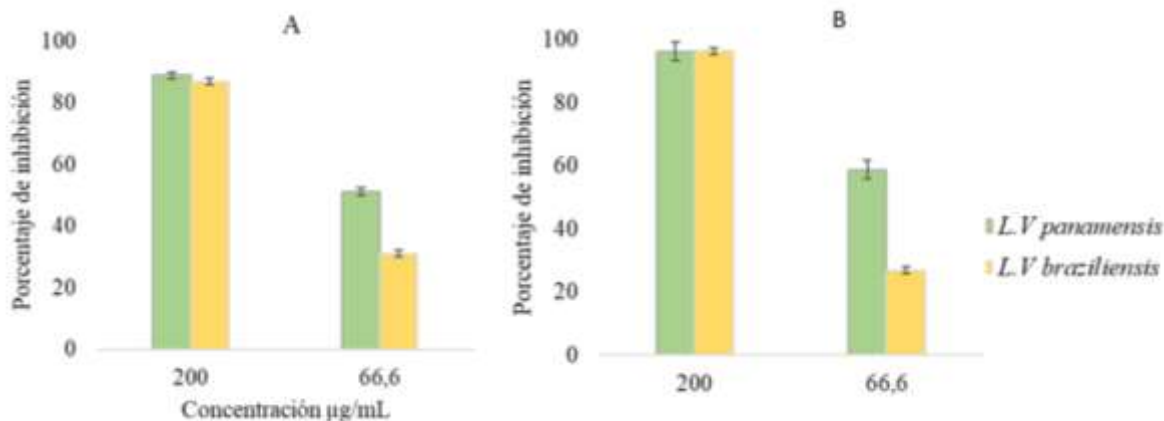


Figura 27. Porcentajes de inhibición del Sb^{III} en células THP-1 infectadas con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*

A. células con 3 días exposición. B. células con 5 días de exposición al compuesto.

5. Discusión

El tratamiento con los Sb^V, siguen siendo el tratamiento de primera línea para la LC, el cual es administrado generalmente de manera IV e IM. En el presente trabajo se empleó el modelo murino en conjunto con dos cepas de *Leishmania* (*L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*) prevalentes en Colombia. Este trabajo tuvo como objetivo determinar los factores relacionados con la eficacia al tratamiento con Sb^V en ratones BALB/c infectados con estas dos cepas. Nuestros resultados muestran la efectividad de Sb^V en una concentración de 150 mg Sb^V/Kg/29días administrado intralesionalmente (IL) fue de 66,6% en *L. (V.) panamensis* y 33,3% en *L. (V.) braziliensis* a los 60 post tratamiento (PT). Resultados similares se han visto reflejado en humanos que han recibido una terapia con Sb^V, Oliveira-Neto et al., 1997 obtuvieron una eficacia del 80% en pacientes con

LC por *L.(V.) braziliensis* después de recibir tratamiento IL con AM a una concentración de 425 mg/kg, un resultado semejante obtuvo Yesilova et al., 2016 en el que trato IL pacientes con 100mg AM /kg observo que un mes después de terminar el tratamiento los pacientes presentaban una cura clínica completa, teniendo una eficacia del 82%, Soto et al., 2013 administraron IL 243mg/kg de AM obtuvieron una tasa de curación del 70%, el tratamiento con AM administrado IL fue exitoso el 83.3% pacientes presentaron una cura total de las lesiones (Vasconcello et al., 2012).

Los efectos adversos como mialgia, cefaleas, artralgia, nausea, fiebre, hiporexia, vómito y un aumento de las enzimas AST, ALT y la amilasa, presentados por los pacientes que reciben una terapia con Sb^V aplicado intravenosa (IV) o intramuscular (IM) (López-Jaramillo et al., 2010). Estos efectos adversos se han visto disminuidos con la administración IL, en Ecuador Calvopiña et al., 2017 trato con cuatro sesiones de AM aplicado IL a 21 pacientes con LC, se logró una tasa de curación del 90.5%, estos autores demostraron la eficacia y baja toxicidad de la AM en la terapia IL, no se observó ninguna reacción adversa sistémica en ningún paciente. En otro estudio realizado en la misma región, pero con el esquema de tratamiento IM tuvieron una eficacia del 80,6% estos pacientes presentaron fiebre, debilidad, palpitaciones y dolores de cabeza (Armijos et al., 2004). Sin embargo, es necesario que se realicen más estudios sobre las comparaciones de la aplicación de un tratamiento IM e IL con respecto al fracaso y efectos adversos que se puedan generar (Silva et al., 2016).

También se ha demostrado la actividad de los antimoniales en diferentes modelos experimentales como por ejemplo en los hámster dorados donde han obtenido resultados similares al nuestro, Hanson et al., 1991 trataron intramuscularmente (IM) a hámster infectados con *L.(V.) panamensis* con una dosis total de antimoniato de meglumina (AM) 832 mg/kg, obtuvieron una reducción de la lesión del 76%, en un estudio con el mismo modelo anteriormente mencionado

Travi et al., 1993 inyectó IL AM en una dosis total de 20mg/Kg lograron ver la reducción del tamaño de las lesiones, deMoraes-Teixeira et al., 2015 trató con 4000 mg/kg dosis total del tratamiento IM a hámster infectados con *L. (V.) braziliensis* logró la reducción de la carga del parásito y del tamaño de la lesión después del tratamiento.

Nosotros tratamos los ratones con dosis menores a la expuesta anteriormente 50 y 16,6mg/kg/29días, en la concentración de 50mg/kg (equivale a 1450mg de Sb total en el tratamiento) en general tuvimos una disminución en el tamaño de las lesiones pero no una cura eficaz a los 60 PT tanto en los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* como *L. (V.) braziliensis*, estos resultados son similares a los encontrados por Sarkari et al., 2017 el tratamiento con 400mg/kg AM, logro una reducción en el tamaño más no, una cura total de las lesiones, Gonçalves-Oliveira y colaboradores en el año 2019 infectaron los ratones con *L. (L.) amazonensis* tratados con 454 mg/kg de AM lograron reducir la carga parasitaria en un 84,5% y Ayres et al., 2011 trataron intraperitonealmente (IP) con 540 mg AM /kg a los ratones infectados con *L. (L.) amazonensis* las lesiones no aumentaron de tamaño, de hecho, eran más pequeñas después del final del tratamiento y la ulceración se desarrolló lentamente, pero no se obtuvo una cura total. Estos resultados difieren de los encontrados por Bemani et al., 2019 ratones BALB/c fueron infectados con *L. major* tratados IP con 1680 mg/kg Glucantime observaron que el tamaño de las lesiones cutáneas aumentó, definiendo el tratamiento como ineficaz.

60 días PT los ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* tratados con 150mgSbV/kg/29 días presentaron una reactivación de la lesión, aunque Travi et al., 1993 observaron una reducción en el tamaño de las lesiones en la concentración anteriormente mencionada, varias semanas después del tratamiento aun había presencia de parásitos en los hámster, Henao et al., 2004 en el que se administró IM 2400 mg/kg de Glucantime y Pentostam,

al final del tratamiento detectaron parásitos en la piel de los animales, el 57% (4/7) hámsteres tratados con Glucantime® 71,4% (5/7) con Pentostam®. Nosotros observamos presencia de parásitos en la biopsia de piel de un ratón infectado con *L. (V.) braziliensis* tratado con 150mgSb^V/kg/día que presento una cura estética que mantuvo hasta el día del sacrificio. Este hecho hace que el huésped albergar parásitos en las lesiones curadas y reepitalizadas pueda ser propenso a recaídas, tal como nosotros lo observamos. Estos resultados muestran que la resolución clínica de las lesiones no está estrictamente relacionada con la eliminación del parásito (Travi et al., 1993).

En este trabajo se encontró que la efectividad a 150 mg Sb^V/kg/día por 29 días fue mayor en *L. (V.) panamensis* que *L. (V.) braziliensis*. Existe una variación en la respuesta a los Sb^V en la diferencia intrínseca en la sensibilidad de las especies de *Leishmania* (Croft, S. L., Sundar, S., y Fairlamb, A. H, 2006). La evidencia *in vitro* de diferencias entre las especies en la susceptibilidad a los Sb se ha informado en cepas de diversas especies aisladas de pacientes con LC, Berman et al., 1982 utilizando un modelo de amastigotes intracelulares, demostró una amplia variación en la sensibilidad de los aislados de casos con LC a los antimoniales pentavalentes. En un ensayo clínico controlado en Guatemala se comparó la eficacia del tratamiento con estibogluconato de sodio (SSG) en pacientes con LC producida por *L. (V.) braziliensis* y *L. mexicana*, la eficacia estuvo influenciado por las especies, esta fue de 96 y 57% respectivamente (Navin et al., 1992). En pacientes con LC en Perú se identificaron 3 especies causantes de la enfermedad, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) guyanensis*, la eficacia del tratamiento con Sb^V fue de 69,6 75,5 y 91,7% respectivamente (Arevalo et al.,2007), estos resultados difieren de los encontrados por Romero et al., 2001, estos autores observaron que la eficacia del tratamiento con AM había sido menor en pacientes infectados con *L.(V.) guyanensis* que con *L.(V.) braziliensis* el porcentaje de eficacia fue del 26,7% y del 50,8% respectivamente. Como se comprobado la susceptibilidad

al Sb entre las especies de *Leishmania* es variable, sin embargo, no se sabe si existe una variación intrínseca en la sensibilidad antimonial entre las diferentes especies de *Leishmania* y, por lo tanto, se desconocen los mecanismos de sensibilidad antimonial específica de la especie (Mandal et al., 2015).

Aunque la OMS especifica una dosis de Sb^V de 20mg/kg/día esta concentración no puede ser la misma para pacientes con LV que con LC debido a que las cepas que producen LC son más sensibles que las que provocan LV, por lo tanto, no existe un tratamiento efectivo único para todas las especies de *Leishmania*. La elección de la estrategia de tratamiento se basa en la ubicación geográfica y las especies infectantes (Croft SL, Yardley V, Kendrick H, 2002). Debido a la variabilidad regional y de especies en el tratamiento, las dosis de antimoniales no se pueden estandarizar, y los médicos locales determinan las dosis apropiadas en función de la experiencia (Tuon et al., 2008). Fernández et al., 2014 realizaron un estudio en el que determinaron la susceptibilidad de tres diferentes cepas de *Leishmania* endémicas de Colombia, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*, los resultados mostraron que la susceptibilidad variaba entre las especies y entre cepas de la misma especie geográficamente entre las regiones al este y al oeste de la cordillera de los Andes. Otra diferencia que hace variable la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* a los Sb son la expresión de las proteínas AQP1, aunque las secuencias de esta proteína son más del 80% homologas entre las especies de *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. tropica*, *L. donovani* y *L. infantum*, las 3'-UTR de los ARNm de AQP1 difieren significativamente entre las especies, Mandal et al., 2015 demostraron que la sensibilidad antimonial específica de la especie en *Leishmania* está impulsada de manera única por AQP1, y que está mediada por la regulación postranscripcional a través del respectivo 3'-UTR del ARNm de AQP1 específico de cada especie.

Las evaluaciones biológicas se basan en modelos *in vitro* para determinar la susceptibilidad de los parásitos en sus diferentes formas promastigote, amastigote axénico [(una alternativa debido a la similitud morfológica y metabólica con los amastigotes intracelulares (Gupta et al., 2001)] y en su etapa amastigote intracelular. Sin embargo, no se recomienda realizar ensayos de sensibilidad en promastigotes pues existen varios parámetros (densidad celular, tasas de crecimiento, el fármaco a evaluar y el hecho de que el estadio de promastigote se encuentre en el vector) que pueden influir en los resultados. De hecho nuestros resultados *in vitro* con Sb^V no fue eficaz en las diferentes formas de *Leishmania* (promastigotes y amastigotes axénicos) como tampoco en amastigotes intracelulares en los parásitos WT como en los aislados de lesiones reactivadas de ratones tratados con 150mg Sb^V/Kg/día (*LpR2* y *LbR1*), estos resultados se correlacionan con los encontrados por Vermeersch et al., 2009 en los que el Pentostam no fue activo contra promastigotes, ni amastigotes axénicos tuvieron una IC₅₀ (> 64 µg Sb^V/ml), fue la misma para ambas formas del parásito, a diferencia de nuestros resultados que no obtuvimos la IC₅₀ ya que esta era >900µg/mL, el Pentostam tampoco fue efectivo en promastigotes de *L. donovani* Shaked-Mishan et al., 2001. Vermeersch encontraron que el Pentostam produjo un IC₅₀ de 22 a 28 µg Sb^V/ml en amastigotes intracelulares. Como no obtuvimos resultados satisfactorios con Sb^V en las diferentes formas de *Leishmania*, probamos Sb^{III}, su actividad anti-*Leishmania* en promastigotes *L. (V.) panamensis* WT, *L.(V.) braziliensis* WT como en *LpR2* y *LbR1* fue de IC₅₀ 33,46; 48,18; 52,78 y 50,99 µM respectivamente, el Sb^{III} fue más tóxico en promastigotes que en AmA de *L.(V.) panamensis* WT y *LpR2*, con respecto a las dos cepas de *L.(V.) braziliensis*, no hubo diferencias significativas en la IC₅₀ entre las especies. Sereno y Lemesre, 1997 trataron cepas de *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* con Sb^{III} las cuales fueron susceptibles en su forma de promastigote y AmA. El modelo de amastigote intracelular se ha recomendado a lo largo del tiempo ya que

simulan el entorno de la etapa de amastigote intracelular dentro del huésped, este modelo ha utilizado macrófagos primarios y diferentes líneas celulares como células huésped, algunos ejemplos son macrófagos peritoneales de ratón, monocitos derivados de sangre periférica y células THP-1, U937, J774. Varios factores pueden sesgar la respuesta a los fármacos incluyendo el tipo de macrófago utilizado como lo pudieron evidenciar Seifert K, Escobar P y Croft SL, 2010, tomaron varios tipos de células y las infectaron con *L. donovani*, las trataron con estibogluconato de sodio (20 mg Sb^V/ml por 5 días), mostrando mayor actividad en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana (IC₅₀ 1.38–1.89 µg Sb^V/ mL), seguido de los macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de médula ósea de ratón (IC₅₀ 21.75–27.79 µg Sb^V/ mL) y por último las células THP-1 (IC₅₀ 28.96–112.77 µg Sb^V/ mL). Otros factores que sesgan la respuesta son el porcentaje de infección de macrófagos, la infectividad de macrófagos dependiendo de la especie *Leishmania*. En un estudio comparativo de la susceptibilidad al antimonio de meglumina en cepas de *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* encontraron una IC₅₀ de 18.5 ± 4.2 a 59.8 ± 3.2 µg/ml, y de 112.2±3.6 a 146.0±5.0 µg /ml respectivamente, siendo *L. (V.) braziliensis* más sensible a los Sb^V que *L. (L.) amazonensis* (Zauli et al., 2010). Nosotros comparamos dos cepas de *Leishmania Viannia (panamensis y braziliensis)* encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a los porcentajes de infección en las células THP-1 estos fueron del 75% a las 24 y del 100% a las 48 y 72 horas (ver figura 21), a diferencia de los encontrados por Zauli et al., 2010 en el que a las 48 horas el porcentaje de infección fue del 10% en las células THP-1. En nuestros resultados observamos amastigotes intracelulares expuestos con Sb^V por 3 y 5 días no efectivo, Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG, 1999 determinaron que la dosis efectiva del 50% a Sb^V estaba inversamente relacionado con el tiempo de exposición al fármaco. La potencia de la formulación sin aditivos de Glucantime fue

significativamente mayor que la de la formulación farmacéutica, independientemente de la forma del parásito y el efecto del tiempo de exposición al Sb^V demuestran la importancia de las condiciones del ensayo sobre el resultado y la interpretación de la evaluación *in vitro* de la sensibilidad al fármaco.

6. Conclusiones

La efectividad del tratamiento intralesional con 150 mgSb^V/Kg/día Glucantime en ratones infectados con *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* no se encuentra afectada por la especie infectante.

Ni el tamaño, ni el tipo de lesión estuvieron involucrados en la respuesta al tratamiento. Se requieren más muestras para este estudio

La cura estética en individuos tratados con antimoniales pentavalentes no es garantía de cura parasitológica, pues estas lesiones pueden albergar parásitos que posteriormente podrían reactivar la lesión y presentar fenotipos de resistencia farmacológica.

En los parásitos estudiados (WTL_p, WTL_b, LpR2 y LbR1), se observó que la no respuesta a los Sb^V no estuvo relacionada con la forma de vida.

La no respuesta al Sb^V no se puede relacionar ni con la especie del parásito ni con el hecho que los parásitos hubieran sido sometidos a un ciclo de tratamiento *in vivo* con Sb^V. (LpR2 y LbR2)

La no respuesta a los Sb^V no estuvo relacionada con falta de susceptibilidad de los parásitos a otros fármacos

Rerefencias Bibliograficas

- Al Jaser, M., el-Yazigi, A., Kojan, M., & Croft, S. (1995). Skin uptake, distribution, and elimination of antimony following administration of sodium stibogluconate to patients with cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 39(2), 516-519. doi: 10.1128/aac.39.2.516
- Akbari, M., Oryan, A., & Hatam, G. (2017). Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica*, 172, 86-90. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.04.029
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., & Dedet, J. et al. (2008). The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 334-359. doi: 10.1128/cmr.00061-07
- Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., & Cano, J. et al. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos ONE*, 7(5), e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Arevalo, I., Tulliano, G., Quispe, A., Spaeth, G., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., & Pollack, H. (2007). Role of Imiquimod and Parenteral Meglumine Antimoniate in the Initial Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), 1549-1554. doi: 10.1086/518172
- Arana, B., Navin, T., Arana, F., Berman, J., & Rosenkaimer, F. (1994). Efficacy of a Short Course (10 Days) of High-Dose Meglumine Antimonate With or Without Interferon- in Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *Clinical Infectious Diseases*, 18(3), 381-384. doi: 10.1093/clinids/18.3.381
- Arana, B., Rizzo, N., Mendoza, C., & 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. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.466

- Basselin, M., Lawrence, F., & Robert-Gero, M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochemical Journal*, 315(2), 631-634. doi: 10.1042/bj3150631
- Beheshti, N., Soflaei, S., Shakibaie, M., Yazdi, M., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., & Shahverdi, A. (2012). Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: In vitro and in vivo studies. *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*, 27(3), 203-207. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.11.002
- BioMed Central, 2014. *Parasites & Vectors* vol 7. United Kingdom
- Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pratlong F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C. (2016). Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. *J Infect Dis*. Jan 1;213(1):105-11. doi: 10.1093/infdis/jiv355. Epub 2015 Jun 29. PubMed PMID: 26123564
- Burza, S., Croft, S., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951-970. doi: 10.1016/s0140-6736(18)31204-2
- Brochu, C., Wang, J., Roy, G., Messier, N., Wang, X., Saravia, N., & 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. doi: 10.1128/aac.47.10.3073-3079.2003
- Carrió, J., de Colmenares, M., Riera, C., Gállego, M., Arboix, M., & Portús, M. (2000). *Leishmania infantum*: Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony Related with the Assay Conditions. *Experimental Parasitology*, 95(3), 209-214. doi: 10.1006/expr.2000.4537
- Castanys-Munoz, E., Perez-Victoria, J., Gamarro, F., & Castanys, S. (2008). Characterization of an ABCG-Like Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* with a Role in Drug Resistance and Transbilayer Lipid Movement. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52(10), 3573-3579. doi: 10.1128/aac.00587-08
- Coelho, A., Beverley, S., & Cotrim, P. (2003). Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Molecular And Biochemical Parasitology*, 130(2), 83-90. doi: 10.1016/s0166-6851(03)00162-2

- Chakraborty, A., & Majumder, H. (1988). Mode of action of pentavalent antimonials: Specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmaniadonovani*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 152(2), 605-611. doi: 10.1016/s0006-291x(88)80081-0
- Chakravarty, J., & Sundar, S. (2010). Drug resistance in leishmaniasis. *Journal Of Global Infectious Diseases*, 2(2), 167. doi: 10.4103/0974-777x.62887
- Chrusciak-Talhari, A., Dietze, R., Talhari, S., Chrusciak Talhari, C., da Silva, R., & Gadelha Yamashita, E. et al. (2011). Randomized Controlled Clinical Trial to Access Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 84(2), 255-260. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0155
- Croft, S., Sundar, S., & Fairlamb, A. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 111-126. doi: 10.1128/cmr.19.1.111-126.2006
- Croft, S., & Oliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clinical Microbiology And Infection*, 17(10), 1478-1483. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
- Cruz, A., Rainey, P., Herwaldt, B., Stagni, G., Palacios, R., Trujillo, R., & Saravia, N. (2007). Pharmacokinetics of Antimony in Children Treated for Leishmaniasis with Meglumine Antimoniate. *The Journal Of Infectious Diseases*, 195(4), 602-608. doi: 10.1086/510860
- Date, A., Joshi, M., & Patravale, V. (2007). Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 505-521. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.009
- de Carvalho, R., Ribeiro, I., Miranda-Vilela, A., de Souza Filho, J., Martins, O., & de Oliveira Cintra e Silva, D. et al. (2013). Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology*, 135(2), 217-222. doi: 10.1016/j.exppara.2013.07.008
- de Souza, A., Marins, D., Mathias, S., Monteiro, L., Yukuyama, M., & Scarim, C. et al. (2018). Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. *International Journal Of Pharmaceutics*, 547(1-2), 421-431. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.018

- Demicheli, C., Frézard, F., Lecouvey, M., & Garnier-Suillerot, A. (2002). Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1570(3), 192-198. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00198-8
- Denton, H., McGregor, J., & Coombs, G. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemical Journal*, 381(2), 405-412. doi: 10.1042/bj20040283
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases*, 27(5), 305-318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004
- Diro, E., Lynen, L., Mohammed, R., Boelaert, M., Hailu, A., & van Griensven, J. (2014). High Parasitological Failure Rate of Visceral Leishmaniasis to Sodium Stibogluconate among HIV Co-infected Adults in Ethiopia. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2875. doi: 10.1371/journal.pntd.0002875
- Diken, A., Diken, O., Hanedan, O., Yilmaz, S., Ecevit, A., Erol, E., & Yalçinkaya, A. (2016). Pentamidine in Pneumocystis jirovecii prophylaxis in heart transplant recipients. *World Journal Of Transplantation*, 6(1), 193. doi: 10.5500/wjt.v6.i1.193
- Donnelly, K., Lima, H., & Titus, R. (1998). Histologic Characterization of Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice Infected with *Leishmania braziliensis* in the Presence or Absence of Sand Fly Vector Salivary Gland Lysate. *The Journal Of Parasitology*, 84(1), 97. doi: 10.2307/3284537
- Dorlo, T., Balasegaram, M., Beijnen, J., & de Vries, P. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576-2597. doi: 10.1093/jac/dks275
- Duque, M., Vasconcellos, É., Pimentel, M., Lyra, M., Pacheco, S., & Marzochi, M. et al. (2016). Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 49(6), 774-776. doi: 10.1590/0037-8682-0213-2016

- Dumetz, F., Cuypers, B., Imamura, H., Zander, D., D'Haenens, E., & Maes, I. et al. (2018). Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in *Leishmania donovani* the Indian Subcontinent. *Msphere*, 3(2), e00548-17. doi: 10.1128/msphere.00548-17
- El-On, J., Livshin, R., Even-Paz, Z., Hamburger, D., & Weinrauch, L. (1986). Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal Of Investigative Dermatology*, 87(2), 284-288. doi: 10.1111/1523-1747.ep12696697
- Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology*. Jun 29;3:6. PubMed PMID: 15987516; PubMed Central PMCID: PMC1190212.
- Escobar, P., Yardley, V., & Croft, S. (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. doi: 10.1128/aac.45.6.1872-1875.2001
- Fairlamb, A., & Cerami, A. (1992). Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review Of Microbiology*, 46(1), 695-729. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.003403
- Franke, E. (1990). Efficacy and Toxicity of Sodium Stibogluconate for Mucosal Leishmaniasis. *Annals Of Internal Medicine*, 113(12), 934. doi: 10.7326/0003-4819-113-12-934
- Frézard, F., Demicheli, C., Ferreira, C., & Costa, M. (2001). Glutathione-Induced Conversion of Pentavalent Antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimoniate. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45(3), 913-916. doi: 10.1128/aac.45.3.913-916.2001
- Frézard, F., Martins, P., Barbosa, M., Pimenta, A., Ferreira, W., & de Melo, J. et al. (2008). New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 102(4), 656-665. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.10.010
- Frézard, F., Demicheli, C., & Ribeiro, R. (2009). Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 14(7), 2317-2336. doi: 10.3390/molecules14072317

- Frézard, F., Monte-Neto, R., & Reis, P. (2014). Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. *Biophysical Reviews*, 6(1), 119-132. doi: 10.1007/s12551-013-0134-y
- Friedrich, K., Vieira, F., Porrozzi, R., Marchevsky, R., Miekeley, N., Grimaldi, G., & Paumgarten, F. (2012). Disposition of Antimony in Rhesus Monkeys Infected with *Leishmania braziliensis* and Treated with Meglumine Antimoniate. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A*, 75(2), 63-75. doi: 10.1080/15287394.2012.624826
- Gasser, R., Magill, A., Oster, C., Franke, E., Groggl, M., & Berman, J. (1994). Pancreatitis Induced by Pentavalent Antimonial Agents During Treatment of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 18(1), 83-90. doi: 10.1093/clinids/18.1.83
- Gobernación de Santander. Secretaria de salud departamental. (2019). [online] Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica 31 del <http://www.santander.gov.co/index.php/gobernacion/documentacion/send/2139-2019/17894-boletin-epidemiologico-semanal-no-31-de-2019> [Accessed 15 Oct. 2019].
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., & Ouellette, M. et al. (2004). Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(30), 31010-31017. doi: 10.1074/jbc.m403959200
- Haimeur, A., Brochu, C., Genest, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2000). Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Molecular And Biochemical Parasitology*, 108(1), 131-135. doi: 10.1016/s0166-6851(00)00187-0
- Headley, J., Yong, M., Brooks, P., & Phillips, A. (1995). Fast-Atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimonate. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 9(5), 372-376. doi: 10.1002/rcm.1290090503
- Ins.gov.co. (2019). [online] Available at: <https://www.ins.gov.co/buscador/eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2031.pdf> [Accessed 21 Oct. 2019].
- Kalangi, S., Dayakar, A., Gangappa, D., Sathyavathi, R., Maurya, R., & Narayana Rao, D. (2016). Biocompatible silver nanoparticles reduced from *Anethum graveolens* leaf extract augments

the antileishmanial efficacy of miltefosine. *Experimental Parasitology*, 170, 184-192. doi: 10.1016/j.exppara.2016.09.002

Kashani, M., Sadr, B., Nilforoushzadeh, M., Arasteh, M., Babakoochi, S., & Firooz, A. (2010). Tropical medicine rounds: Treatment of acute cutaneous leishmaniasis with intralesional injection of meglumine antimoniate: comparison of conventional technique with mesotherapy gun. *International Journal Of Dermatology*, 49(9), 1034-1037. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04523.x

Kaur, G., & Rajput, B. (2014). Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania. *Journal Of Parasitology Research*, 2014, 1-11. doi: 10.1155/2014/726328

Kelly, C., Jefferies, C., & Cryan, S. (2010). Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. *Journal Of Drug Delivery*, 2011, 1-11. doi: 10.1155/2011/727241

Kip, A., Schellens, J., Beijnen, J., & Dorlo, T. (2017). Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(2), 151-176. doi: 10.1007/s40262-017-0570-0

Kumar, R., Sahoo, G., Pandey, K., Das, V., & Das, P. (2014). Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against Leishmania donovani. *Drug Delivery*, 22(3), 383-388. doi: 10.3109/10717544.2014.891271

Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y., Rosen, B., & Haimeur, A. et al. (2001). The Leishmania ATP-binding Cassette Protein PGPA Is an Intracellular Metal-Thiol Transporter ATPase. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(28), 26301-26307. doi: 10.1074/jbc.m102351200

Lobo, I., Soares, M., Correia, T., de Freitas, L., Oliveira, M., & Nakatani, M. et al. (2006). Heat therapy for cutaneous leishmaniasis elicits a systemic cytokine response similar to that of antimonial (Glucantime) therapy. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 100(7), 642-649. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.08.011

López-Jaramillo, P., Rincón, M., García, R., Vélez, I., Smith, D., & Kampeerapappun, P. et al. (2010). A Controlled, Randomized-Blinded Clinical Trial to Assess the Efficacy of a Nitric Oxide Releasing Patch in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by Leishmania (V.)

- panamensis. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 83(1), 97-101. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0287
- López, L., Cruz, C., Godoy, G., M. Robledo, S., & D. Vélez, I. (2013). Thermoterapy effective and safer than miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 55(3), 197-204. doi: 10.1590/s0036-46652013000300011
- Lucumi, A., Robledo, S., Gama, V., & Saravia, N. (1998). Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to Pentavalent Antimony Is Correlated with the Formation of Cleavable DNA-Protein Complexes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 42(8), 1990-1995. doi: 10.1128/aac.42.8.1990
- Maarouf, M., Lawrence, F., Croft, S., & Robert-Gero, M. (1995). Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitology Research*, 81(5), 421-425. doi: 10.1007/bf00931504
- Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P., & Robert-Gero, M. (1997). In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, 232(2), 339-348. doi: 10.1006/excr.1997.3500
- Machado, P., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L., Bang, H., Ho, J., & Carvalho, E. (2007). Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 44(6), 788-793. doi: 10.1086/511643
- Manzano, J., García-Hernández, R., Castanys, S., & Gamarro, F. (2013). A New ABC Half-Transporter in *Leishmania major* Is Involved in Resistance to Antimony. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 57(8), 3719-3730. doi: 10.1128/aac.00211-13
- McGwire, B., & Satoskar, A. (2013). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, 107(1), 7-14. doi: 10.1093/qjmed/hct116
- Marquis, N., Gourbal, B., Rosen, B., Mukhopadhyay, R., & Ouellette, M. (2005). Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Molecular Microbiology*, 57(6), 1690-1699. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04782.x

- Martínez, S., & Marr, J. (1992). Allopurinol in the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *New England Journal Of Medicine*, 326(11), 741-744. doi: 10.1056/nejm199203123261105
- Martínez-Valencia, A., Daza-Rivera, C., Rosales-Chilama, M., Cossio, A., Casadiego Rincón, E., & Desai, M. et al. (2017). Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005713. doi: 10.1371/journal.pntd.0005713
- Mendonça, M., de Brito, M., Rodrigues, E., Bandeira, V., Jardim, M., & Abath, F. (2004). Persistence of Leishmania Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure?. *The Journal Of Infectious Diseases*, 189(6), 1018-1023. doi: 10.1086/382135
- Miekeley, N., Mortari, S., & Schubach, A. (2001). Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 372(3), 495-502. doi: 10.1007/s00216-001-1213-7
- Miranda-Verastegui, C., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, I., Ward, B., & Matlashewski, G. (2005). Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Topical Imiquimod 5% with Parenteral Meglumine Antimoniate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 40(10), 1395-1403. doi: 10.1086/429238
- Mitropoulos, P., Konidas, P., & Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*, 63(2), 309-322. doi: 10.1016/j.jaad.2009.06.088
- Monge-Maillo B, López-Vélez R (2016). Treatment Options for Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection. *AIDS Rev.* Jan-Mar;18(1):32-43. Review. PubMed PMID: 26936761.
- Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., & Omollo, R. et al. (2012). Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1674. doi: 10.1371/journal.pntd.0001674

- Mukherjee, B., Mukhopadhyay, R., Bannerjee, B., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Naskar, K. et al. (2013). Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(7), E575-E582. doi: 10.1073/pnas.1213839110
- Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., Gage, D., Lightbody, J., Ouellette, M., & Rosen, B. (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(19), 10383-10387. doi: 10.1073/pnas.93.19.10383
- Müller, R., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00118-6
- Navin, T., Arana, B., Arana, F., Berman, J., & Chajon, J. (1992). Placebo-Controlled Clinical Trial of Sodium Stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *Journal Of Infectious Diseases*, 165(3), 528-534. doi: 10.1093/infdis/165.3.528
- Neira, L., Mantilla, J., & 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. doi: 10.1093/jac/dkz049
- Oliveira, L., Schubach, A., Martins, M., Passos, S., Oliveira, R., Marzochi, M., & Andrade, C. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118(2), 87-96. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.02.007
- Oliveira-Neto, M., Schubach, A., Mattos, M., Goncalves da Costa, S., & Pirmez, C. (1997). Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - an area of *Leishmania* (V.) *braziliensis* transmission. *International Journal Of Dermatology*, 36(6), 463-468. doi: 10.1046/j.1365-4362.1997.00188.x
- OMS. (2010). Control de las leishmaniasis. Recuperado el 14 de octubre de 2019, a partir de https://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_2010_leishmaniasis_2/en/

- OMS. (2016). OMS Leishmaniasis. Recuperado el 14 de octubre de 2019, a partir de [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/file:///D:/Descargas/9789275117521_eng%20\(1\).pdf](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/file:///D:/Descargas/9789275117521_eng%20(1).pdf)
- Ouellette, M., Drummelsmith, J., & Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7(4-5), 257-266. doi: 10.1016/j.drug.2004.07.002
- Palacios, R., Grajalew, L., Ochoa, M., & Osorio, L. (2001). Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 64(3), 187-193. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.187
- Perea, A., Manzano, J., Castanys, S., & Gamarro, F. (2016). The LABC2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* Is Involved in Antimony Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 60(6), 3489-3496. doi: 10.1128/aac.02813-15
- Perez-Franco, J., Cruz-Barrera, M., Robayo, M., Lopez, M., Daza, C., & Bedoya, A. et al. (2016). Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimonate. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(5), e0004739. doi: 10.1371/journal.pntd.0004739
- Perez-Victoria, J., Perez-Victoria, F., Parodi-Talice, A., Jimenez, I., Ravelo, A., Castanys, S., & Gamarro, F. (2001). Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45(9), 2468-2474. doi: 10.1128/aac.45.9.2468-2474.2001
- Perry, M., Wyllie, S., Prajapati, V., Feldmann, J., Sundar, S., Boelaert, M., & Fairlamb, A. (2011). Visceral Leishmaniasis and Arsenic: An Ancient Poison Contributing to Antimonial Treatment Failure in the Indian Subcontinent?. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 5(9), e1227. doi: 10.1371/journal.pntd.0001227
- Pintado, V., Martín-Rabadán, P., Rivera, M., Moreno, S., & Bouza, E. (2001). Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients. *Medicine*, 80(1), 54-73. doi: 10.1097/00005792-200101000-00006

- Pham, T., Loiseau, P., & Barratt, G. (2013). Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *International Journal Of Pharmaceutics*, 454(1), 539-552. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.035
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J., Barrett, M., López-Vélez, R., & García-Hernández, R. et al. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006052. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052
- Pourshafie, M., Morand, S., Virion, A., Rakotomanga, M., Dupuy, C., & Loiseau, P. (2004). Cloning of S-Adenosyl-L-Methionine:C-24- -Sterol-Methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and Characterization of mRNAs in Wild-Type and Amphotericin B-Resistant Promastigotes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 48(7), 2409-2414. doi: 10.1128/aac.48.7.2409-2414.2004
- Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581-596. doi: 10.1016/s1473-3099(07)70209-8
- Ribeiro AL, Drummond JB, Volpini AC, Andrade AC, Passos VM. (1999). Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. *Braz J Med Biol Res*. Mar;32(3):297-301. PubMed PMID: 10347787.
- Ritmeijer, K., Veeken, H., Melaku, Y., Leal, G., Amsalu, R., Seaman, J., & Davidson, R. (2001). Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 95(6), 668-672. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90110-5
- Salaün, P., & Frézard, F. (2013). Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 405(15), 5201-5214. doi: 10.1007/s00216-013-6947-5
- Saenz, R., Berman, J., de Rodriguez, C., & Johnson, C. (1991). Efficacy and Toxicity of Pentostam against Panamanian Mucosal Leishmaniasis. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 44(4), 394-398. doi: 10.4269/ajtmh.1991.44.394

- Sands M, Kron MA, Brown RB. (1985) Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis.* Sep-Oct;7(5):625-34. Review. PubMed PMID: 3903942
- Schubach, A., Haddad, F., Neto, M., Degrave, W., Pirmez, C., Grimaldi, Jr., G., & Fernandes, O. (1998). Detection of Leishmania DNA by Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. *The Journal Of Infectious Diseases*, 178(3), 911-914. doi: 10.1086/515355
- Sereno, D., & Lemesre, J. (1997). Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 41(5), 972-976. doi: 10.1128/aac.41.5.972
- Sereno, D., Holzmüller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaisi, A., & Lemesre, J. (2001). Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania infantum Amastigotes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45(7), 2064-2069. doi: 10.1128/aac.45.7.2064-2069.2001
- Sharquie, K., AL-Talib, K., & Chu, A. (1988). Intralesional therapy of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. *British Journal Of Dermatology*, 119(1), 53-57. doi: 10.1111/j.1365-2133.1988.tb07100.x
- Silva, R., Toledo Júnior, A., Senna, M., Rabello, A., & Cota, G. (2016). Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(8), 512-516. doi: 10.1590/0074-02760160183
- Singh, N., Chatterjee, M., & Sundar, S. (2014). The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. *Parasites & Vectors*, 7(1). doi: 10.1186/s13071-014-0596-1
- Soto, J., Hernandez, N., Mejia, H., Groggl, M., & Berman, J. (1995). Successful Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis with a Combination of Topical Paromomycin/Methylbenzethonium Chloride and Injectable Meglumine Antimonate. *Clinical Infectious Diseases*, 20(1), 47-51. doi: 10.1093/clinids/20.1.47
- 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. doi: 10.1086/516267

- Soto, J., Padilla, J., Gutierrez, P., Grogl, M., Berman, J., & Arboleda, M. et al. (2002). Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 66(2), 147-151. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.147
- Soto, J., Arana, B., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J., & Diaz, A. et al. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266-1272. doi: 10.1086/383321
- Soto, J., & Soto, P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*, 26(Sup1), 207-17. doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1514
- Soto, J., Soto, P., Ajata, A., Luque, C., Tintaya, C., & Paz, D. et al. (2018). Topical 15% Paromomycin-Aquaphilic for Bolivian Leishmania braziliensis Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized, Placebo-controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 68(5), 844-849. doi: 10.1093/cid/ciy619
- Sosa, N., Pascale, J., Jiménez, A., Norwood, J., Kreishman-Detrick, M., & Weina, P. et al. (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007253. doi: 10.1371/journal.pntd.0007253
- Sun, H., Yan, S., & Cheng, W. (2000). Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione. *European Journal Of Biochemistry*, 267(17), 5450-5457. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01605.x
- Sundar, S., More, D., Singh, M., Singh, V., Sharma, S., & Makharia, A. et al. (2000). Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 1104-1107. doi: 10.1086/318121
- Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine And International Health*, 6(11), 849-854. doi: 10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x
- Sundar, S., Rai, M., Chakravarty, J., Agarwal, D., Agrawal, N., & Vaillant, M. et al. (2008). New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single- Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short- Course Oral Miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, 47(8), 1000-1006. doi: 10.1086/591972

- Sundar, S., & Jaya, J. (2010). Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: Dose and response. *Journal Of Global Infectious Diseases*, 2(2), 159. doi: 10.4103/0974-777x.62886
- Sundar, S., Sinha, P., Rai, M., Verma, D., Nawin, K., & Alam, S. et al. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*, 377(9764), 477-486. doi: 10.1016/s0140-6736(10)62050-8
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2014). An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opinion On Pharmacotherapy*, 16(2), 237-252. doi: 10.1517/14656566.2015.973850
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165. doi: 10.1098/rsob.170165
- Tallab, T., Bahamdani, K., Mirdad, S., Johargi, H., Mourad, M., & Ibrahim, K. et al. (1996). Cutaneous leishmaniasis: schedules for intralesional treatment with sodium stibogluconate. *International Journal Of Dermatology*, 35(8), 594-597. doi: 10.1111/j.1365-4362.1996.tb03669.x
- Tapscott, R., Belford, R., & Paul, I. (1969). Stereochemistry of tartrato(4-)-bridged binuclear complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 4(3), 323-359. doi: 10.1016/s0010-8545(00)80209-x
- Travi, B., Martinez, J., & Zea, A. (1993). Antimonial treatment of hamsters infected with Leishmania (Viannia) panamensis: assessment of parasitological cure with different therapeutic schedules. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 87(5), 567-569. doi: 10.1016/0035-9203(93)90093-6
- Trinconi, C., Reimao, J., Yokoyama-Yasunaka, J., Miguel, D., & Uliana, S. (2014). Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 58(5), 2608-2613. doi: 10.1128/aac.01315-13
- Van de Ven, H., Paulussen, C., Feijens, P., Matheeußen, A., Rombaut, P., & Kayaert, P. et al. (2012). PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in

- vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *Journal Of Controlled Release*, 161(3), 795-803. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.037
- Varela-M, R., Ochoa, R., Muskus, C., Muro, A., & Mollinedo, F. (2017). Identification of a RAC/AKT-like gene in *Leishmania* parasites as a putative therapeutic target in leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi: 10.1186/s13071-017-2379-y
- Vasconcellos, É., Madeira, M., de Oliveira, R., Schubach, A., Pimentel, M., & Moreira, J. et al. (2012). Intralesional Meglumine Antimoniate for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Patients with Contraindication to Systemic Therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 87(2), 257-260. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0612
- Vega, J., Sanchez, B., Montero, L., Montaña, R., del Pilar Mahecha, M., & Dueñas, B. et al. (2009). The efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparative observational study in an operational setting. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 103(7), 703-706. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.10.039
- Verrest, L., & Dorlo, T. (2017). Lack of Clinical Pharmacokinetic Studies to Optimize the Treatment of Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. *Clinical Pharmacokinetics*, 56(6), 583-606. doi: 10.1007/s40262-016-0467-3
- Vianna G. (1912). Tratamento da Leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético en: 7 Congresso Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brasil, pp 426–428
- Vincent, I., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T., & 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. doi: 10.1016/j.ijpddr.2013.11.002
- Vyas, S., & Gupta, S. (2006). Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *International Journal Of Nanomedicine*, 1(4), 417-432. doi: 10.2147/nano.2006.1.4.417
- Walters, L., Irons, K., Chaplin, G., & Tesh, R. (1993). Life Cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*

- (Diptera: Psychodidae). *Journal Of Medical Entomology*, 30(4), 699-718. doi: 10.1093/jmedent/30.4.699
- Weingärtner, A., Drobot, B., Herrmann, A., Sánchez-Cañete, M., Gamarro, F., Castanys, S., & Günther Pomorski, T. (2010). Disruption of the Lipid-Transporting LdMT-LdRos3 Complex in *Leishmania donovani* Affects Membrane Lipid Asymmetry but Not Host Cell Invasion. *Plos ONE*, 5(8), e12443. doi: 10.1371/journal.pone.0012443
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization. (2010). [online] Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>
- Wortmann, G., Miller, R., 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. doi: 10.1086/341406
- Wijnant, G., Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., & Croft, S. (2017). Efficacy of Paromomycin-Chloroquine Combination Therapy in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 61(8). doi: 10.1128/aac.00358-17
- Yan, S., Li, F., Ding, K., & Sun, H. (2003). Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *JBIC Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, 8(6), 689-697. doi: 10.1007/s00775-003-0468-1
- Zaghloul, I., Radwan, M., Al Jaser, M., & Al Issa, R. (2010). Clinical Efficacy and Pharmacokinetics of Antimony in Cutaneous Leishmaniasis Patients Treated With Sodium Stibogluconate. *The Journal Of Clinical Pharmacology*, 50(11), 1230-1237. doi: 10.1177/0091270009347674
- Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B., & 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. doi: 10.1074/jbc.m404383200