

Susceptibilidad a antimonio de meglumina y miltefosina, falla al tratamiento e inmunomodulación en la respuesta terapéutica de la leishmaniasis cutánea

Olga Lucía Fernández Marulanda

Universidad del Valle  
Facultad de Salud  
Escuela de Ciencias Básicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Santiago de Cali  
2015

Susceptibilidad a antimonio de meglumina y Miltefosina, falla al tratamiento e inmunomodulación en la respuesta terapéutica de la leishmaniasis cutánea

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Olga Lucía Fernández Marulanda

Director: Nancy Gore Saravia, Ph.D.

Asesor: Diane McMahon-Pratt, Ph.D.

Universidad del Valle

Facultad de Salud

Escuela de Ciencias Básicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas - 9695

Santiago de Cali

2015

## **Agradecimientos**

A la Universidad del Valle por la formación académica.

A mi directora de tesis, la Doctora Nancy Gore Saravia por su orientación y apoyo en el desarrollo del proyecto y en mi formación integral.

A la Doctora Diane McMahon-Pratt, por su asesoría en el trabajo de investigación.

A Karen Goldsmith-Pestana, por su colaboración en el trabajo de laboratorio desarrollado en la escuela de Salud Publica de la Universidad de Yale en Estados Unidos.

Al Doctor Dr. Tarek Fahmy y la Doctora Alyssa Siefert por el diseño y desarrollo de las formulaciones de HePC en nanopartículas en la Escuela de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Yale en Estados Unidos.

A CIDEIM por el financiamiento del trabajo de investigación.

A todos mis compañeros de CIDEIM del Área de Leishmaniasis y de las áreas de apoyo a la investigación: Biobanco, Unidad de Bioestadística, Comité de Ética Humana, Unidad de Materiales, Área de Formación y Área administrativa.

A Colciencias por la financiación a través del programa de formación de doctorados nacionales. Convocatoria 528.

## Tabla de contenido

|                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Lista de figuras.....                                                                                                                                                                                                  | i   |
| Lista de tablas.....                                                                                                                                                                                                   | iv  |
| Abreviaciones .....                                                                                                                                                                                                    | v   |
| Glosario .....                                                                                                                                                                                                         | vii |
| Resumen .....                                                                                                                                                                                                          | x   |
| Introducción .....                                                                                                                                                                                                     | 1   |
| Marco teórico .....                                                                                                                                                                                                    | 5   |
| Ciclo de vida.....                                                                                                                                                                                                     | 5   |
| Manifestaciones clínicas .....                                                                                                                                                                                         | 7   |
| Epidemiología de la leishmaniasis en Colombia .....                                                                                                                                                                    | 8   |
| Ciclos de transmisión .....                                                                                                                                                                                            | 9   |
| Respuesta inmune en la leishmaniasis cutánea .....                                                                                                                                                                     | 10  |
| Tratamiento .....                                                                                                                                                                                                      | 11  |
| Susceptibilidad de <i>Leishmania</i> , emergencia de resistencia y retos para<br>entenderlos .....                                                                                                                     | 15  |
| Justificación .....                                                                                                                                                                                                    | 20  |
| Objetivos de Investigación .....                                                                                                                                                                                       | 24  |
| Capítulo I. Estandarización del uso de una concentración del fármaco como<br>método eficiente para determinar la susceptibilidad de cepas clínicas de<br><i>Leishmania</i> a antimonio de meglumina y miltefosina..... | 25  |
| Introducción.....                                                                                                                                                                                                      | 25  |
| Materiales y Métodos .....                                                                                                                                                                                             | 26  |
| Resultados .....                                                                                                                                                                                                       | 32  |
| Discusión.....                                                                                                                                                                                                         | 44  |
| Capítulo II. Susceptibilidad y emergencia de resistencia a antimonio de<br>meglumina y miltefosina en las poblaciones de <i>Leishmania</i> spp. que causan la<br>leishmaniasis cutánea en Colombia.....                | 48  |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Introducción.....                                                                                                                   | 48  |
| Materiales y Métodos .....                                                                                                          | 50  |
| Resultados .....                                                                                                                    | 60  |
| Discusión.....                                                                                                                      | 77  |
| Capítulo III. Determinación de la respuesta integrada parásito-hospedero a fármacos, inmunomoduladores y nuevas formulaciones ..... | 85  |
| Introducción.....                                                                                                                   | 85  |
| Materiales y Métodos .....                                                                                                          | 87  |
| Resultados .....                                                                                                                    | 95  |
| Discusión.....                                                                                                                      | 110 |
| Discusión .....                                                                                                                     | 117 |
| Conclusiones y significancia de los hallazgos .....                                                                                 | 120 |
| Perspectivas .....                                                                                                                  | 122 |
| Bibliografía .....                                                                                                                  | 125 |
| Anexos.....                                                                                                                         | 143 |
| Publicaciones derivadas de la investigación: .....                                                                                  | 143 |
| Aporte en la formación de jóvenes investigadores .....                                                                              | 144 |

## Lista de figuras

### Marco teórico

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . ....                                                      | 6  |
| Figura 2. Distribución de casos de leishmaniasis cutánea por departamento de procedencia, año 2014. .... | 9  |
| Figura 3. Mecanismos anti-leishmaniales de HePC.....                                                     | 15 |

### Capítulo I.

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.4 Cinética de la toxicidad de HePC en macrófagos humanos. ....                                                                                                                            | 33 |
| Figura 2.5 Comparación de la susceptibilidad a HePC entre las líneas control sensible y resistente de <i>L. panamensis</i> . ....                                                                  | 34 |
| Figura 3.6 Susceptibilidad de las líneas control sensible y resiste de <i>L. panamensis</i> a Sb(V) y HePC. ....                                                                                   | 36 |
| Figura 4.7 Efecto de la concentración del suero sobre la actividad <i>in vitro</i> de HePC. ....                                                                                                   | 38 |
| Figura 5.8 Correlación de la susceptibilidad determinada con base en la concentración discriminadora y el EC <sub>50</sub> de Sb(V) y HePC en cepas clínicas de <i>Leishmania (Viannia)</i> . .... | 40 |
| Figura 6.9 Comparación de la susceptibilidad a Sb(V) y HePC con base en la carga parasitaria o el porcentaje de células infectadas con cepas clínicas de <i>Leishmania (Viannia)</i> . ....        | 42 |

### Capítulo II.

|                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1.10 Estrategia experimental y tamaño de muestra para la evaluación de la susceptibilidad y emergencia de resistencia en cepas de las especies de <i>Leishmania</i> prevalentes en Colombia. .... | 511 |
| Figura 2.11 Susceptibilidad a Sb(V) y HePC de las especies de <i>Leishmania</i> del subgénero <i>Viannia</i> prevalentes en Colombia. ....                                                               | 62  |

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.12Susceptibilidad a Sb(V) y HePC en las especies de <i>Leishmania Viannia</i> provenientes de las regiones geográficas naturales de Colombia. ....                            | 63 |
| Figura 4.13Susceptibilidad de <i>L. panamensis</i> y <i>L. braziliensis</i> a Sb(V) y HePC por región geográfica. ....                                                                 | 65 |
| Figura 5.14Susceptibilidad a HePC de cepas de <i>L. panamensis</i> aisladas antes y después del uso de HePC y provenientes de las regiones de Amazonas y Orinoquía. ....               | 66 |
| Figura 6.15Susceptibilidad de cepas de <i>L. panamensis</i> a Sb(V) y asociación con el zimodema de las sub-poblaciones circulantes en zonas endémicas de Tumaco. .                    | 68 |
| Figura 7.16Análisis de la diversidad genética de cepas de <i>L. panamensis</i> y <i>L. guyanensis</i> .....                                                                            | 69 |
| Figura 8.17Asociación entre de zimodema, edad y ocupación en el municipio de Tumaco. ....                                                                                              | 71 |
| Figura 9.18Dosis respuesta de la susceptibilidad de cepas aisladas de pacientes antes de tratamiento y en el momento de falla terapéutica a HePC. ....                                 | 73 |
| Figura 10.19Expresión génica de <i>abca3</i> y <i>LbMT</i> y susceptibilidad a HePC en cepas clínicas de <i>L. panamensis</i> y <i>L. braziliensis</i> .....                           | 75 |
| Figura 11.20Análisis de secuencias del gen <i>LbMT</i> .....                                                                                                                           | 76 |
| Figura 12.21Análisis multivariado de componentes principales (CP) de la expresión de genes de transportadores en promastigotes de <i>L. panamensis</i> y <i>L. braziliensis</i> . .... | 77 |

### Capítulo III.

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.22Esquema de la formulación de HePC en las nanopartículas micelares. ....                               | 90 |
| Figura 2.23Cinética de la respuesta inmune y de la infección en ausencia de fármacos. ....                       | 96 |
| Figura 3.24Dosis respuesta de Sb(V) y HePC en la supervivencia del parásito y en la secreción de citoquinas..... | 98 |

|                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 4.25 Cinética de la supervivencia del parásito y la secreción de citoquinas en respuesta a 4 $\mu$ M de HePC y 8 $\mu$ g/mL de Sb(V) usando el modelo <i>ex vivo</i> de células mononucleares. .... | 100 |
| Figura 5.26 Efecto en la viabilidad del parásito frente a fármacos anti- <i>Leishmania</i> , compuestos inmunomoduladores y su combinación.....                                                            | 102 |
| Figura 6.27 Dosis respuesta de la secreción de citoquinas por células mononucleares expuestas a PTX y su combinación con Sb(V) y HePC. ....                                                                | 103 |
| Figura 7.28 Dosis respuesta de la secreción de citoquinas por células mononucleares expuestas a CpG y su combinación con Sb(V) y HePC. ....                                                                | 105 |
| Figura 8.29 Toxicidad de las NPs micelares en células mononucleares no infectadas e infectadas con <i>L. panamensis</i> . ....                                                                             | 107 |
| Figura 9.30 Comparación de la actividad anti-leishmanial de M3, M5 y M6 con el fármaco solo. ....                                                                                                          | 108 |
| Figura 10.31 Respuesta de la secreción de IL-10, TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ en células mononucleares expuestas a HePC formulada en NPs. ....                                                              | 109 |

## Lista de tablas

### Marco teórico

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Distribución geográfica y manifestaciones clínicas de las especies de <i>Leishmania</i> comúnmente asociadas con Leishmaniasis Cutánea Americana. .... | 7  |
| Tabla 2. Espectro de diferencias en los métodos de evaluación de susceptibilidad de cepas clínicas de <i>Leishmania spp.</i> ....                               | 18 |

### Capítulo I.

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1.3 Efecto de la temperatura en la susceptibilidad a Sb(V) de cepas clínicas de <i>L. panamensis</i> . .... | 44 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Capítulo II.

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1.4 Número de cepas clínicas evaluadas de las especies de <i>Leishmania</i> del subgénero <i>Viannia</i> provenientes de diferentes regiones geográficas de Colombia. .... | 53 |
| Tabla 2.5 Características clínicas y susceptibilidad de las cepas de <i>Leishmania</i> aisladas antes de tratamiento y en el momento de falla terapéutica con HePC. ...          | 56 |

### Capítulo III.

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1.6 Características de las nanopartículas micelares. .... | 91 |
|-----------------------------------------------------------------|----|

## Abreviaciones

ABC: sigla de transportadores de membrana derivada del inglés “ATP Binding Cassette”

ATP: Adenosín Trifosfato

C<sub>max</sub>: Concentración Plasmática Máxima

CpG: secuencias de Citosina-fosfodiester-Guanina

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC<sub>50</sub>: Concentración Efectiva media que disminuye la infección en un 50%

G4: Generación 4 del dendrímero.

HePC: Hexadecilfosfocolina, HePC

HSP70: Proteínas de Choque Térmico de 70 KDa

LbMT: Transportador de HePC de *Leishmania braziliensis*

LdMT: Transportador de HePC de *Leishmania donovani*

LC: Leishmaniasis Cutánea

LCA: Leishmaniasis Cutánea Americana

LMC: Leishmaniasis Mucocutánea

LV: Leishmaniasis Visceral

MLMT: Tipificación multilocus de microsatélites del inglés “Multilocus Microsatellite Typing”

NP(s): Nanopartícula(s)

ODN: Oligodeoxinucleótidos

PAMAM: Poliamidoamina

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer Fosfato Salino

PEG: Polietilenglicol

PMA: Forbol-12-Miristato-13-Acetato

PKDL: leishmaniasis Dérmica Post-Kala Azar

PLGA: co-Polímeros de Ácido Láctico y Glicólico

PTX: Pentoxifilina

ROC: Característica Operativa del Receptor de inglés "Receiver Operating Characteristic"

Sb(V): Antimonio Pentavalente, en el presente trabajo hace referencia a antimoniato de meglumina.

Sb(III): Antimonio Trivalente

SFB: Suero Fetal Bovino

SNPs: Polimorfismos genéticos de un solo nucleótido del inglés "Single Nucleotide Polymorphisms"

URL: Unidades Relativas de Luz (unidad de medición de la actividad de la luciferasa)

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## Glosario

**Carga parasitaria:** Número de amastigotes intracelulares determinados por luminometría o microscopia.

**C<sub>max</sub>:** Representa la concentración plasmática máxima alcanzada luego de la administración extravascular de un fármaco.

**Cepa de *Leishmania* Sensible:** Parásitos que presentan un porcentaje de reducción de la infección > 48% en presencia de 32 µg/mL de Sb(V) y > 56% en presencia de 16 µM de HePC.

**Cepa de *Leishmania* Tolerante/Fenotipo resistente/resistente:** Parásitos con un porcentaje de reducción de la infección < 35% en presencia de 32 µg/mL de Sb(V) y < 44% en presencia de 16 µM de HePC.

**Concentración Efectiva 50 (EC<sub>50</sub>):** Concentración efectiva del fármaco que reduce la infección en un 50%. La infección puede estar expresada como el porcentaje de células infectadas o como la carga parasitaria.

**Concentración discriminatoria:** Concentración del fármaco que permite discriminar la susceptibilidad de cepas de *Leishmania*, con base en la reducción proporcional de la infección.

**Dendrímeros:** Polímeros hiper-ramificados con la característica de que cada rama tiene la misma estructura y peso molecular. Son tridimensionales de síntesis química con forma bien definida y tamaño nanoscópico. La estructura dendrímica está caracterizada por «capas» entre cada punto focal llamadas «generaciones».

**Emergencia de resistencia:** resistencia adquirida o debida a la expansión de poblaciones del parásito con tolerancia/fenotipo resistente.

**Falla al tratamiento o Falla terapéutica:** - Ausencia de curación definitiva (re-epitelización) en cualquiera de las lesiones al final del seguimiento (13 semanas para antimoniato de meglumina y 26 semanas para HePC). - Recaída después de cura aparente, o de una disminución inicial del tamaño de la lesión. - Aparición de una nueva lesión positiva para *Leishmania*.

**Regiones geográficas naturales:** Divisiones territoriales realizadas a partir de características heterogéneas en cuanto a relieve, clima, vegetación, y clases de suelo. Debido a la gran diversidad de climas y relieves, en Colombia estas diferencias regionales se definen por una serie de factores muy claros tales como las características del relieve (ya sea montañoso o llano), la distancia al mar, el promedio de lluvias y las condiciones del suelo. Referencia del Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

**Resistencia intrínseca:** Células u organismos con fenotipo resistente que tienen características estructurales heredables relacionadas con la resistencia.

**Resistencia primaria:** Parásitos de *Leishmania* con fenotipo resistente aislados de un paciente que no ha recibido tratamiento.

**Resistencia secundaria o adquirida:** Parásitos de *Leishmania* con fenotipo resistente que previamente fue sensible o menos tolerante.

**Susceptibilidad indeterminada/Rango indeterminado:** Parásitos de *Leishmania* que presentan un porcentaje de reducción de la infección entre 35% y 48% en presencia de 32 µg/mL de Sb(V) y entre 44% y 56% en presencia de 16 µM de HePC.

**Susceptibilidad de *Leishmania*:** espectro de respuesta al efecto del fármaco sobre la viabilidad del parásito expresado en términos  $EC_{50}$  o como % de reducción de la infección.

**Zimodemas:** población de cepas que comparten el mismo perfil isoenzimático.

## Resumen

La falla terapéutica es frecuente en la Leishmaniasis Cutánea Americana. Como ocurre con otras enfermedades infecciosas múltiples factores pueden contribuir en la respuesta al tratamiento incluyendo la susceptibilidad del parásito al fármaco y la respuesta inmune del hospedero. Por tanto la evaluación de la susceptibilidad a nivel poblacional permite monitorear uno de los factores que pueden influir en la respuesta al tratamiento. La determinación de la susceptibilidad por el método convencional de dosis respuesta ( $EC_{50}$ ) es un proceso largo, laborioso, sujeto a diversas fuentes de variación y no toma en cuenta factores del hospedero. Estas limitaciones han impedido un mejor conocimiento de la susceptibilidad de las cepas circulantes de *Leishmania*, los factores asociados y su relación con la respuesta al tratamiento.

Dentro del marco de este proyecto se desarrollaron dos estrategias metodológicas para mejorar el conocimiento de base sobre la susceptibilidad de *Leishmania* en el contexto endémico y la influencia de la respuesta inmune *ex vivo* en la actividad de los fármacos. La determinación de la susceptibilidad se basó en la reducción proporcional de la infección en presencia de una concentración del medicamento con relevancia farmacológica. La eficiencia de esta estrategia hizo factible la evaluación en un total de 402 cepas clínicas de *Leishmania* de diferentes especies, regiones geográficas y espacios de tiempo. Así mismo, se diseñó un modelo de infección usando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LC que permitió evaluar la actividad *ex vivo* de los fármacos sobre la viabilidad del parásito integrando factores del hospedero. Esta estrategia fue usada para evaluar la susceptibilidad y la respuesta de mediadores inmunes a Sb(V), HePC y nuevas opciones terapéuticas, como terapias combinadas y nuevas formulaciones de miltefosina en nanopartículas.

Los análisis de susceptibilidad a antimonio de meglumina [Sb(V)] y miltefosina (HePC) en el contexto endémico de la transmisión (diferentes regiones

geográficas, variables relacionadas con transmisión domiciliaria y selvática), mostraron variación en la susceptibilidad a los dos medicamentos entre especies de *Leishmania*, sub-poblaciones de cada especie y de acuerdo al origen geográfico. Se observaron cambios en la susceptibilidad a Sb(V) en dos focos durante diferentes espacios de tiempo influenciados por la prevalencia de infecciones causadas por dos poblaciones de *L. panamensis* distinguibles tanto por los zimodemas como por el fenotipo de susceptibilidad a Sb(V). El análisis de susceptibilidad por regiones reveló una mayor tolerancia a los fármacos en las poblaciones de *Leishmania* provenientes de las regiones ubicadas al oriente de la Cordillera de los Andes, independiente de la especie. Los resultados de susceptibilidad a HePC evidenciaron tolerancia primaria en una proporción de las poblaciones de parásitos de las especies *L. braziliensis* y *L. panamensis* y el análisis de pares de cepas aisladas antes y en el momento de falla terapéutica con HePC mostró que un ciclo de tratamiento puede conducir a la selección de parásitos con tolerancia secundaria o adquirida y contribuir a la falla al tratamiento.

El modelo *ex vivo* de células mononucleares infectadas permitió la exploración de la respuesta inmune y del parásito al tratamiento con Sb(V) y HePC solos y combinados con inmunomoduladores de interés (pentoxifilina y CpG) para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, y nuevas formulaciones de HePC en nanopartículas. De acuerdo al tratamiento evaluado se observó un efecto diferencial en la sobrevivencia del parásito y en la secreción de citoquinas pro y anti-inflamatorias. Adicionalmente, se demostró que un prototipo de la nanopartícula incrementa la potencia de HePC sin afectar la secreción de citoquinas.

Esta investigación y las metodologías innovadoras desarrolladas aportaron información de base sobre el perfil de susceptibilidad de las especies y sub-poblaciones de *Leishmania Viannia* (con base en zimodemas) prevalentes en diferentes regiones de Colombia, revelaron marcadores bioquímicos intrínsecos en las poblaciones con fenotipos divergentes de susceptibilidad a Sb(V), demostraron

la adquisición de tolerancia a HePC a través del tratamiento y establecieron la base experimental para la investigación integrada de la respuesta inmune y del parásito frente a los tratamientos estándar y nuevas opciones terapéuticas. El conjunto de los resultados y hallazgos de este trabajo aportan y direccionan nuevas herramientas metodológicas y oportunidades para el entendimiento de la relación entre susceptibilidad y respuesta al tratamiento.

**Palabras clave:** *Leishmania (Viannia)*, antimonio de meglumina, miltefosina, susceptibilidad a fármacos, inmunoterapia y sistemas de liberación.

## Introducción

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades ocasionadas por el parásito del género *Leishmania*, un protozoo intracelular que afecta al humano y otros mamíferos. Los cuadros clínicos producidos son diversos y dependen de la especie infectante y de factores relacionados con el hospedero [1,2]. La enfermedad puede manifestarse en tres formas clínicas: cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV). Se estima que cada año aparecen aproximadamente 300.000 nuevos casos de leishmaniasis visceral y 1 millón de casos de leishmaniasis cutánea alrededor del mundo [3]. Colombia es el segundo país en Latinoamérica con mayor reporte de casos de LC después de Brasil [3]. Las especies predominantes que causan la LC en Colombia son *L. panamensis*, *L. braziliensis*, y *L. guyanensis* [4,5,6].

En ausencia de medidas preventivas como vacunas y de estrategias sostenibles para el control de vectores, el tratamiento de la leishmaniasis constituye la principal medida de control de la enfermedad. Los antimoniales [estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina - Sb(V)] han sido usados como monoterapia y tratamiento de primera línea para la LC y LMC en América Central y del Sur por más de cinco décadas. La administración parenteral, los potenciales efectos adversos y los retos logísticos que implican la administración del tratamiento, contribuyen a la interrupción y al abandono de los esquemas terapéuticos y en consecuencia a la falla clínica [7,8,9].

El tratamiento de segunda línea en Colombia de mayor uso es miltefosina (HePC), un medicamento de administración oral aprobado en el 2005 por el INVIMA para el tratamiento de la LC en adultos y niños, indicado en pacientes que tienen contraindicaciones o han fallado al tratamiento con fármacos antimoniales. HePC ha demostrado eficacia comparable a Sb(V) contra la infección causada por *L. panamensis* en Colombia en ensayos clínicos controlados [10,11,12]. Sin

embargo, este fármaco presenta una vida media larga en plasma [13], lo que puede contribuir a la selección de poblaciones resistentes del parásito. En Latinoamérica, incluyendo países donde predominan especies como *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, se reportan fallas al tratamiento que oscilan entre el 24 y 50% para Sb(V) [12,14,15,16] y 17 a 47% para HePC [10,11,12,17,18].

Múltiples factores contribuyen en la respuesta al tratamiento, incluyendo factores relacionados con el hospedero (respuesta inmune, determinantes genéticos, farmacocinética y co-morbilidades) [19,20,21], el fármaco (variaciones entre lotes y formulaciones) [22], y el parásito (susceptibilidad y diferencias entre cepas y especies) [10,23]. Algunas especies del parásito han sido relacionadas con mayor falla al tratamiento con Sb(V) y HePC [10,15]. Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta al tratamiento en infecciones ocasionadas por una misma especie cambia de acuerdo a la región geográfica. Mientras que la infección por *L. braziliensis* tiene una respuesta al tratamiento con HePC en Brasil y Bolivia del 75% [17] y 88% [18], respectivamente, la respuesta al tratamiento con la misma especie en Guatemala fue apenas del 33% [10]. Resultados similares han sido observados con Sb(V) en la infección ocasionada con *L. guyanensis* en Brasil y Perú, donde se reporta una respuesta al tratamiento de 26% [15] y 92% [23], respectivamente.

La susceptibilidad *in vitro* de *Leishmania* a Sb(V) y HePC ha sido evaluada en un número limitado de cepas de distintas especies y de diferentes países [24,25,26]. Estos estudios sugirieron una variación inter especie y también según su origen geográfico. Por tanto, como sucede con la respuesta al tratamiento, la susceptibilidad *in vitro* de *Leishmania* a los fármacos anti-leishmaniales podría estar influenciada por las especies y/o poblaciones de parásitos presentes en las diferentes regiones.

No obstante, la evidencia de cepas de *Leishmania* tolerantes a Sb(V) y HePC, su relevancia en la respuesta clínica al tratamiento es controvertida. Las limitaciones técnicas para la evaluación de la susceptibilidad a medicamentos *in vitro* (lectura de la infección, tiempo de proceso, costos etc.) han impedido la evaluación de un número representativo de cepas de diferentes especies y orígenes geográficos, y los inconvenientes logísticos y económicos para el seguimiento de pacientes por 6 meses o un año después del tratamiento, cuando ocurren la mayoría de las recaídas [27], han contribuido al desconocimiento sobre la relación entre susceptibilidad y respuesta clínica. Sin embargo, la resistencia adquirida del parásito a los anti-leishmaniales después de tratamiento y su contribución en la falla terapéutica ha sido reportada en algunos casos de leishmaniasis causadas por las especies del subgénero *Viannia* y *L. infantum* para Sb(V) [28,29,30] y en *L. donovani* para HePC [31].

Dada la variabilidad en la respuesta terapéutica a los anti-leishmaniales en los diferentes países y la influencia de las especies y sub-poblaciones de parásitos circulantes en cada región, la determinación de la susceptibilidad en un número representativo de cepas clínicas por región puede arrojar luz sobre la relación entre susceptibilidad y respuesta al tratamiento desde el punto de vista epidemiológico. Asuntos como la resistencia intrínseca o adquirida pueden ser explorados en forma más precisa si se cuenta con la información de susceptibilidad de un amplio número de cepas de cada especie. En Colombia diferentes sub-poblaciones de las especies más prevalentes de *Leishmania* fueron identificadas de acuerdo al polimorfismo de 13 isoenzimas [32], encontrando que la prevalencia de distintas sub-poblaciones (zimodemas) es diferente de acuerdo a la región del país. Se desconoce si la susceptibilidad a los anti-leishmaniales o la respuesta al tratamiento difieren entre estas sub-poblaciones.

La respuesta inmune del hospedero es un factor importante para el entendimiento de la relación entre la susceptibilidad del parásito y la respuesta clínica al tratamiento. Los antibióticos, incluyendo los anti-leishmaniales, obran en conjunto

con la respuesta inmune. En la leishmaniasis este principio es ilustrado por las recaídas observadas en los casos de co-infección con VIH después del tratamiento con cualquiera de los fármacos anti-leishmania [33,34], incluyendo la anfotericina B y HePC, cuya eficacia había sido considerada independiente de la respuesta inmune [35]. Esta relación interdependiente entre la quimioterapia y la respuesta inmune, en adición a otros factores como: la farmacocinética de cada medicamento en tejidos específicos y plasma y la unión del fármaco a proteínas, influyen en la relación entre la susceptibilidad *in vitro* a fármacos y la respuesta terapéutica.

Con el fin de entender los factores que contribuyen a la tasa de falla terapéutica, esta investigación determinó la susceptibilidad a Sb(V) y HePC en un total de 402 cepas de las especies de *Leishmania* que causan la LC en Colombia. Se examinaron factores epidemiológicos, geográficos y fenotípicos de los parásitos potencialmente influyentes en la susceptibilidad a estos medicamentos y la participación de la respuesta inmune en la susceptibilidad a los anti-leishmaniales y nuevas opciones terapéuticas *in vitro*.

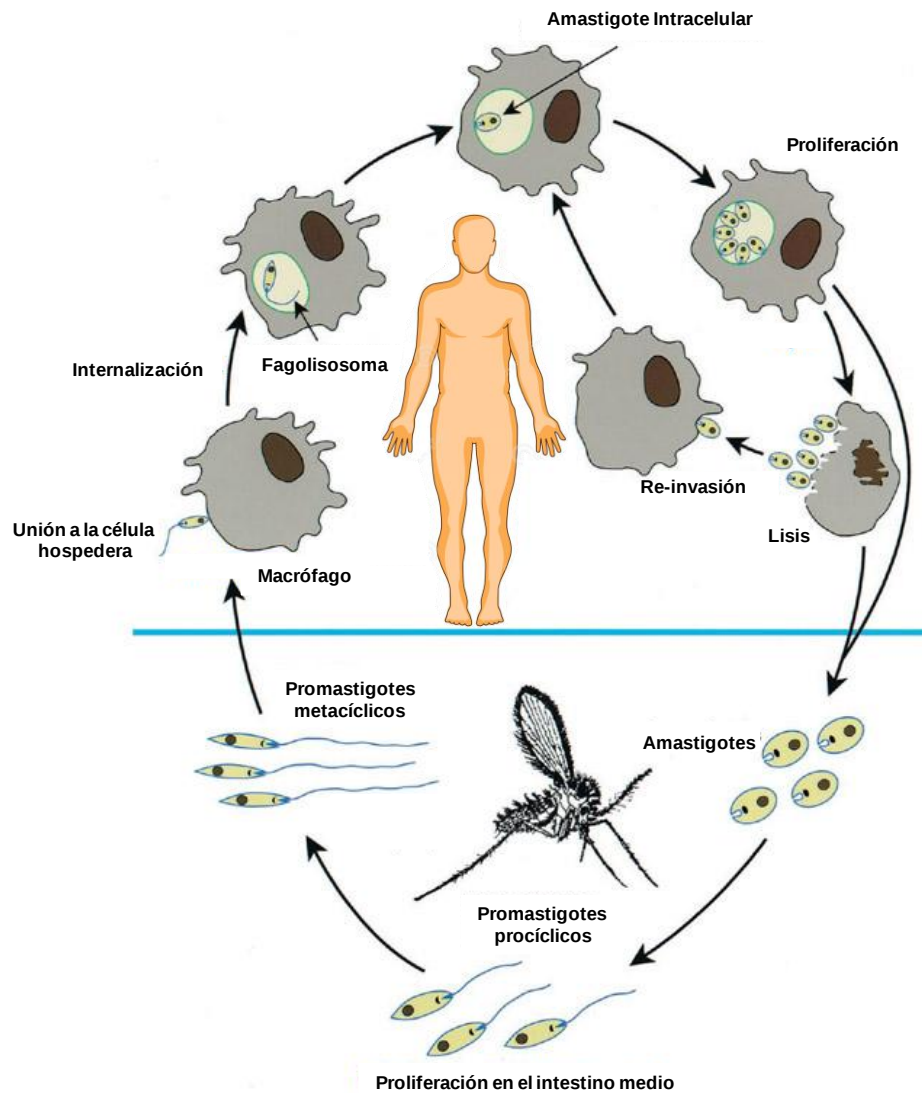
## **Marco teórico**

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo intracelular obligatorio del género *Leishmania* que afecta la población de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Su transmisión se da por la picadura de diferentes especies de flebótomos pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomia*, presentes en el viejo o nuevo mundo, respectivamente. La infección ocasionada por este parásito es endémica en 98 países y presenta un complejo de enfermedades con diversidad clínica y epidemiológica [3,36]. Se desconoce la incidencia y prevalencia real de la enfermedad porque solo en 52 de los países endémicos la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria. Se calcula una prevalencia mundial de 20 millones de casos y una incidencia anual de aproximadamente 1.3 millones, de los cuales 300.000 son leishmaniasis visceral (90% de los cuales ocurren en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal y Sudan) y 1 millón son LC (principalmente en Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, La Republica Islámica de Irán, y Tunisia) [36]. A pesar del gran impacto que tiene a nivel mundial, la leishmaniasis es considerada como una enfermedad olvidada, afectando en gran medida a la población más pobre de los países en desarrollo.

## **Ciclo de vida**

El ciclo de vida en el vector inicia cuando el parásito es ingerido por el flebótomo en forma de amastigote en el momento de la alimentación con sangre de un hospedero vertebrado infectado, que puede ser humano o cualquier otro mamífero susceptible. Dentro del vector los parásitos son rodeados por la matriz peritrófica en el intestino medio abdominal, en donde se dividen y transforman en promastigotes, ocurriendo posteriormente un proceso de desarrollo a la forma infectiva de promastigotes metacíclicos. La forma infectiva es inoculada en el humano durante un nuevo proceso de alimentación. En el humano los parásitos son fagocitados por los macrófagos de la dermis y otras células del sistema

mononuclear fagocítico dentro de los cuales se transforman en amastigotes. Los amastigotes se replican activamente dentro del fagosoma, adaptándose al pH ácido, la temperatura y la limitación de nutrientes. (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*.**

Fuente: Handman, E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev. 14(2):229-43.

## Manifestaciones clínicas

La leishmaniasis se presenta bajo un espectro de formas clínicas que van desde lesiones cutáneas que curan espontáneamente, hasta diversas manifestaciones clínicas como la LC caracterizada por la presencia de ulceraciones profundas en la piel, generalmente indoloras, ubicadas principalmente en las partes expuestas del cuerpo. La LMC caracterizada por la presencia de lesiones que comprometen las mucosas de la boca, nariz, ó garganta, y cartílago del tabique, ocasionando en los pacientes desfiguración facial y la LV que afecta el bazo, el hígado y la médula ósea; esta forma puede llegar a ser fatal si no hay un tratamiento oportuno. La leishmaniasis cutánea americana es una enfermedad de piel y mucosas, producida por un grupo de especies genéticamente relacionadas, cada una de las cuales se caracteriza por sus manifestaciones y área de endemidad (Tabla 1). La presentación clínica está relacionada tanto con la especie del parásito como con factores del hospedero [1,2]. Las especies predominantes que causan la LC en Colombia son *L. panamensis* (54-80%), *L. braziliensis* (10-30%), y *L. guyanensis* (1-4%) [4,5,6].

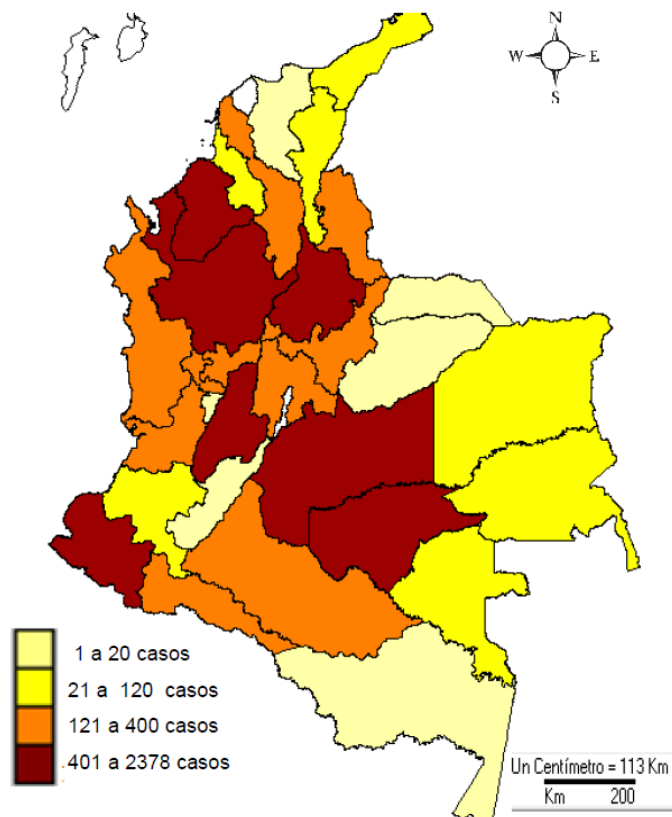
**Tabla 1. Distribución geográfica y manifestaciones clínicas de las especies de *Leishmania* comúnmente asociadas con Leishmaniasis Cutánea Americana.**

| Parásito                   | Manifestaciones Clínicas                 | País                                                                                                                                                                     |
|----------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>L. V. braziliensis</i>  | Cutánea<br>Mucocutánea                   | Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, <b>Colombia</b> , Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Guayana francesa, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú y Venezuela. |
| <i>L. V. panamensis</i>    | Cutánea<br>Mucocutánea                   | <b>Colombia</b> , Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá.                                                                                          |
| <i>L. V. guyanensis</i>    | Cutánea<br>Mucocutánea                   | Argentina, Bolivia, Brasil, <b>Colombia</b> , Ecuador, Guayana francesa, Guyana, Perú, Suriname y Venezuela.                                                             |
| <i>L. V. peruviana</i>     | Cutánea                                  | Perú.                                                                                                                                                                    |
| <i>L. L. mexicana</i>      | Cutánea<br>Cutánea Difusa<br>Mucocutánea | Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, <b>Colombia</b> , Costa Rica, Ecuador, EE.UU., Guatemala, Guayana francesa, México, Perú, Suriname y Venezuela.                      |
| <i>L. L. amazonensis</i>   | Cutánea<br>Cutánea Difusa                | Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana francesa, Perú, Suriname y Venezuela.                                                                             |
| <i>L. L. venezuelensis</i> | Cutánea<br>Cutánea Difusa                | Venezuela.                                                                                                                                                               |

Datos tomados del Informe del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, 2010.

### **Epidemiología de la leishmaniasis en Colombia**

La leishmaniasis es una patología endémica en casi todo el territorio nacional. Los focos se encuentran en una gran diversidad de regiones naturales que incluyen zonas selváticas de la Región Pacífica [37] y del Amazonas, áreas de bosque seco tropical como la Costa Caribe [38], la región Andina donde se cultiva el café y áreas de llanos y desiertos localizadas en la región Interandina, oriente del país y península de la Guajira. Se estima que en el país existen alrededor de 11 millones de personas en riesgo, con transmisión principalmente en el área rural [39]. En Colombia se encuentran las tres formas clínicas de la enfermedad, siendo la más frecuente y la de mayor distribución geográfica, la LC (entre 95% y 98% de los casos), seguido por la LMC (1% a 4%) y la leishmaniasis visceral (entre el 0,1 y 1,5 %) [39]. Durante la década de los 90 se notificaron en promedio 6.500 casos nuevos de leishmaniasis por año, cifra que aumentó progresivamente a cerca de 20.000 casos anuales en los años 2005 y 2006. En el año 2014 se notificaron al SIVIGILA 10358 casos de leishmaniasis (Figura 2). De acuerdo a este reporte se presentó un aumento de 1078 casos respecto al mismo periodo del año 2013, lo que representa un 11,6 % de incremento de casos notificados.



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud. Colombia

**Figura 2. Distribución de casos de leishmaniasis cutánea por departamento de procedencia, año 2014.**

Fuente: INS, 2014 [40].

## **Ciclos de transmisión**

### **La leishmaniasis zoonótica de transmisión selvática**

Este tipo de transmisión se da por la interacción del humano con el vector infectado, cuando el hombre penetra en focos endémicos que son mantenidos por reservorios de hábitat selvático. Estos casos se presentan de manera predominante entre personas de edad adulta, preferiblemente en el sexo

masculino por sus actividades laborales en áreas selváticas. El porcentaje de casos debido a este tipo de transmisión no se conoce con precisión.

### **La leishmaniasis zoonótica y/o antroponótica de transmisión peridoméstica**

Se presenta a nivel rural por la adaptación de los vectores a los ambientes domiciliarios y peridomiciliarios [41,42,43]. El vector habita y se reproduce en cultivos [44] y criaderos de animales [45] cerca a las casas, facilitando su interacción con cualquier miembro del núcleo familiar lo que produce mayor frecuencia de casos de LC en mujeres y niños. Así mismo la domiciliación del vector con hábitos de picadura intradomiciliaria [41], incrementa el riesgo para todos los grupos etáreos.

### **Respuesta inmune en la leishmaniasis cutánea**

La leishmaniasis causada por las especies del subgénero *Viannia* en el humano se caracterizan por una respuesta mixta de citoquinas Th1/Th2 [46,47,48], por una hiper-reactividad inmunológica [49,50] y sobreproducción de citoquinas pro inflamatorias que han sido asociadas con la LMC [51,52] y con la LC crónica [47]. La secreción de IL-13, IL-10, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  se ha encontrado elevada en la LC crónica y recurrente ocasionada por *L. panamensis*, mientras que en individuos con infección asintomática los niveles de estas citoquinas son bajos. Los análisis de la expresión de los factores de transcripción Tbet y GATA3 que regulan la diferenciación de células Th1/Th2 han revelado una llamativa correlación inversa entre el factor GATA3 y la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en individuos con infección asintomática, sugiriendo que la regulación negativa de la respuesta pro-inflamatoria limita el desarrollo de la enfermedad [53].

Los linfocitos T CD4 son la mayor fuente de IFN $\gamma$  [20,54]; esta citoquina al igual que el TNF $\alpha$  controla la multiplicación del parásito en fases tempranas de la infección; sin embargo, también median el daño tisular [48,55]. En la LC el TNF $\alpha$  es producido por diferentes tipos de células, incluyendo linfocitos y macrófagos

[56]. Recientemente, se observó una correlación positiva entre el tamaño de la ulcera y los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  sustentando el uso de inhibidores de esta citoquina junto a la terapia estándar con el fin de mejorar el tiempo de recuperación en pacientes con lesiones graves [55].

La IL-10 es también producida en pacientes con leishmaniasis cutánea y regula la respuesta inmune pro-inflamatoria [57,58]. La IL-10 es producida por una variedad de células que incluyen, macrófagos, células T reguladoras (Treg), células Th1, y CD8. Se ha descrito la presencia de células Treg en la lesión de pacientes con leishmaniasis cutánea como también de IL-10 y  $\text{TGF}\beta$ . Estas citoquinas participan en el control de la respuesta inmune en la leishmaniasis cutánea, pero también desactivan los mecanismos microbicidas del macrófago, permitiendo la persistencia del parásito [59,60]. La disminución de receptores de la IL-10 fue demostrado en lesiones de pacientes con LMC, lo que puede explicar en parte la ausencia de regulación del proceso inflamatorio [51].

### **Tratamiento**

En la actualidad el tratamiento de la leishmaniasis en Colombia es sistémico. Los tratamientos de primera elección para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis son las sales de antimonio pentavalente –  $\text{Sb(V)}$ , como el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®) [61]. El fármaco que se usa con mayor frecuencia en Colombia es el antimoniato de meglumina. Los medicamentos de segunda línea son HePC, pentamidina y anfotericina B convencional y están indicados en el manejo de pacientes con falla terapéutica o en los casos en que el antimonio pentavalente está contraindicado. HePC es el medicamento de segunda línea mejor tolerado y de mayor uso en Colombia. La pentamidina y la anfotericina B deoxicolato son costosas y se han descrito reacciones adversas graves asociadas a su administración, por lo tanto requieren manejo intrahospitalario [61,62]. A

continuación se describen en detalle los dos fármacos de mayor uso en Colombia, Sb(V) y HePC.

### **Antimonio pentavalente**

En Colombia el Sb(V) ha sido usado por más de tres décadas. El esquema terapéutico óptimo para el tratamiento de la LC es una dosis única diaria de Sb(V) de 20 mg/Kg de peso/día durante 20 días y 28 días para las formas mucocutánea y visceral [61]. El Sb(V) se presenta en ampollas de 5 mL con una concentración de Sb(V) de 81 mg/mL.

El 65% de los pacientes presentan eventos adversos, siendo la mayoría leves o moderados, entre ellos dolor en el sitio de aplicación intramuscular, vomito, nauseas, mialgias, artralgias y cefalea. Además, pueden haber efectos tóxicos sobre riñón, hígado, corazón y páncreas [63]. Los efectos adversos cardiacos se relacionan con trastornos en la repolarización ventricular y se presentan en el 8% de los pacientes a quienes se les administra dosis correctas. En menor frecuencia pueden existir reacciones de hipersensibilidad. Las sales antimoniales están contraindicadas en el embarazo y se deben usar en pacientes con problemas cardíacos, hepáticos, renales o pancreáticos. La respuesta al tratamiento varía considerablemente dependiendo de la especie del parásito, el estado inmunológico del paciente y la presentación clínica de la enfermedad.

### *Mecanismos de acción*

El Sb(V) es una prodroga que es convertida en antimonio trivalente - Sb(III), la forma activa del fármaco [64]. La reducción del compuesto pentavalente al trivalente se da en el macrófago y en el parásito [65,66,67]. Los mecanismos relacionados con la actividad leishmanicida incluyen: i) La inhibición de procesos como el metabolismo de la glucosa, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la formación de ATP [68]. ii) La inhibición de enzimas como la topoisomerasa I y la tripanotión reductasa [69,70]. iii) La competencia del Sb(III) con el Zn(II) por la unión a los

grupos CCHC que constituyen los dominios de los dedos de zinc en las proteínas [71]. iv) La disminución de la capacidad del buffer redox intracelular de *Leishmania* por promover la pérdida de tripanotión y por la inhibición de la tripanotión reductasa, lo que hace que el parásito quede expuesto a los agentes oxidantes. v) La inducción de moléculas con acción microbicida como óxido nítrico y peróxido de hidrógeno por el hospedero [72,73,74].

#### *Mecanismos de resistencia del parásito al antimonio*

Se han encontrado diferentes mecanismos asociados a la resistencia del parásito a los antimoniales: i) limitación de la entrada del fármaco al parásito por modificaciones en el transportador acuaporina 1 [75], ii) incremento de la expresión de blancos como la tripanotión reductasa [76,77], iii) incremento de la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de nuevas moléculas de tripanotión [78] y iv) secuestro de las moléculas de tripanotión conjugadas al Sb(III) en vacuolas mediante el transportador intracelular ABC [79]. Adicionalmente, se han caracterizado diversos genes que confieren resistencia a antimonio, entre ellos, genes que codifican proteínas que contienen secuencias repetidas ricas en leucina [80], histona 2A [81], un polipéptido largo [82] y la proteína de choque térmico HSP70 [83].

#### **Miltefosina**

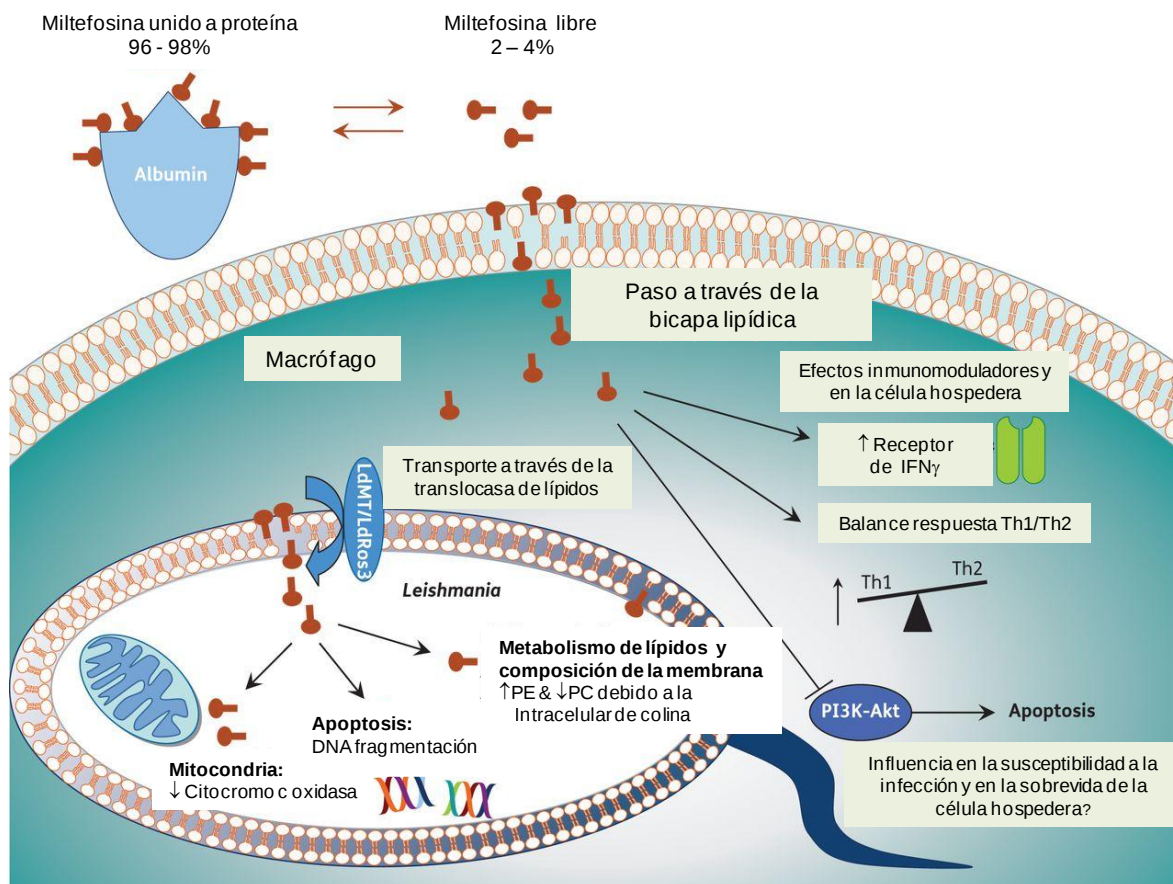
La HePC fue el primer fármaco de administración oral usado para el tratamiento de la LV y fue considerado el mayor progreso en la quimioterapia anti-leishmanial [84,85]. En Colombia fue aprobada en el 2005 para el tratamiento de la LC en adultos y niños mayores de 2 años [10]. Se administra por vía oral a una dosis de 1,5 a 2,5 mg/kg/día, durante 28 días. Los eventos adversos que predominan son gastrointestinales leves como náuseas, vómito y diarrea. Del 17 al 25% de los pacientes tratados presentan elevación de las transaminasas o creatinina. Se han encontrado reportes de reacciones alérgicas tipos Steven- Johnson [86].

### *Mecanismos de acción*

Los mecanismos de acción de HePC son parcialmente conocidos (Figura 3), entre ellos están: i) Inhibición del metabolismo de la membrana lipídica. Se han descrito mecanismos como: inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina [87], inhibición de la acyl-CoA-acyltransferasa-alquil específica de *Leishmania* (enzima clave en la remodelación eter-lipídica) e inhibición de la biosíntesis del glicofosfatidilinositol GPI (molécula de superficie implicada en la virulencia de *Leishmania*) [88]. ii). Inducción de apoptosis, probablemente debido a la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina; sin embargo, el mecanismo que induce la apoptosis no está claramente establecido [89]. iii) Inhibición de la citocromo c oxidasa [90]. iv) Efecto inmunomodulador sobre  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12 e  $\text{IFN}\gamma$  que pueden contribuir en la actividad anti-leishmanial [91,92] e incremento de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico [93].

### *Mecanismos de resistencia del parásito a miltefosina*

La resistencia de *L. donovani* a HePC ha sido inducida *in vitro*, aunque no ha sido caracterizada *in vivo* [94]. Tanto defectos en la internalización como en el eflujo del fármaco han sido relacionados con la resistencia. La acumulación intracelular de HePC en *L. donovani* es regulada por dos transportadores, LdMT y su subunidad LdRos3, una ATPasa tipo P perteneciente a la familia traslocasa de aminofosfolípidos (Figura 3). Se ha demostrado que la disminución de LdMT y/o la proteína LdRos3 confiere la resistencia a HePC tanto en *L. donovani* como en *L. braziliensis* [95,96]. El eflujo incrementado del fármaco ha sido implicado en la resistencia a HePC mediada a través de la sobre-expresión del transportador ABCB1 o LtrMDR1 [97]. Existen otros transportadores específicos de *Leishmania* tipo ABC subfamilia G (LiABCG6 y LiABCG4) relacionados con resistencia a HePC [98,99]



**Figura 3. Mecanismos anti-leishmaniales de miltefosina.**

Diferentes mecanismos de acción propuestos para HePC en el amastigote intracelular durante la infección con *Leishmania* en el macrófago. PC: Fosfatidilcolina. PE: Fosfatidiletanolamina. Fuente: Dorlo, T. et al. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis J Antimicrob Chemother. 67(11): 2576-2597.

### **Susceptibilidad de *Leishmania*, emergencia de resistencia y retos para entenderlos**

La evaluación de la susceptibilidad de *Leishmania* a los diferentes fármacos permite evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia que pueden ser intrínsecos o adquiridos. Poco se conoce acerca de los factores que favorecen el desarrollo de resistencia en *Leishmania*. Se asume que la exposición al fármaco

durante el tratamiento es la principal razón que conduce a la selección de resistencia. La emergencia de resistencia y resistencia primaria ha sido reportada para las especies del subgénero *Viannia* y *L. infantum* en cepas aisladas en el momento de falla terapéutica con Sb(V) [28,30]. Estos resultados muestran que la selección de resistencia puede ocurrir con el tratamiento estándar de Sb(V) pero también sugieren la existencia de mecanismos intrínsecos de resistencia en el caso de las cepas aisladas antes de tratamiento.

HePC es particularmente susceptible a la emergencia de resistencia debido a su estrecho índice terapéutico y a la larga vida media de eliminación de aproximadamente 7 días, con dosis sub-terapéuticas que pueden persistir hasta por 6 meses [100]. Esta condición combinada con la fácil selección de resistencia observada *in vitro* en *L. donovani* [94] indican el alto riesgo de emergencia de resistencia en el campo. Adicionalmente, se ha observado que las especies de *Leishmania* del nuevo mundo, incluyendo *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. mexicana* son menos sensibles a HePC que las especies del viejo mundo [24].

El conocimiento de los mecanismos de resistencia a los anti-leishmaniales se ha obtenido en su mayoría con cepas seleccionadas experimentalmente en el laboratorio [77,101,102]. No obstante estos mecanismos no necesariamente reflejan lo que ocurre *in vivo*. Poco se conoce sobre los mecanismos de resistencia desarrollados naturalmente. Mecanismos naturales de resistencia a Sb(V) se han identificado en cepas de *L. braziliensis* y se asocian a la resistencia *in vitro* al óxido nítrico, encontrándose correlación con la falla al tratamiento [103]. De otra parte, un estudio hecho con 24 cepas de *L. infantum* aisladas de perros infectados en Algeria mostró relación entre la resistencia *in vitro* a Sb(V) y el fenotipo isoenzimático (zimodema MON-281), lo que podría sugerir resistencia natural o intrínseca [104] o alternatively la diseminación de una población que adquirió resistencia.

### *Retos para la evaluación de susceptibilidad y su relación con la respuesta clínica*

La susceptibilidad a *Leishmania* ha sido evaluada en diferentes estudios y modelos utilizando promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares. Aunque los ensayos en promastigotes o amastigotes axénicos son más fáciles de realizar (comparado con los amastigotes intracelulares) y tienen menor costo, los ensayos en amastigotes intracelulares son el estándar aceptado ya que son las formas parasitarias que permanecen en la infección en el humano. Además, la susceptibilidad de los promastigotes y los amastigotes a diferentes fármacos frecuentemente es divergente. Se han realizado estudios de susceptibilidad en amastigotes intracelulares con cepas clínicas de *Leishmania*, sin embargo, la información disponible está limitada a números pequeños de cepas de diferentes especies aisladas de pacientes con diversas presentaciones clínicas en varios países donde se han tratado con diferentes fármacos y regímenes sin documentación de adherencia (Tabla 2).

En contraste a lo que sucede con los ensayos de susceptibilidad en bacterias, enmarcados por estándares compartidos y consensuados, los datos de susceptibilidad en *Leishmania* obtenidos en distintos laboratorios no son comparables debido a la variación de las condiciones experimentales (Tabla 2) y a la falta de puntos de corte establecidos con base en parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos como el  $C_{max}$ :CIM (concentración inhibitoria mínima), Área bajo la curva - ABC:CIM y tiempo del fármaco por encima del CIM [105]. Como se observa en la tabla 2, diferentes grupos de investigadores han estandarizado los ensayos usando diferentes células hospederas, tiempos de exposición al fármaco y formas de lectura de la infección, entre otras variables que pueden afectar el resultado de susceptibilidad [106,107]. Por tanto, la generalización de los resultados y con base en tan pocos organismos de tan diversas circunstancias no es factible.

**Tabla 2. Espectro de diferencias en los métodos de evaluación de susceptibilidad de cepas clínicas de *Leishmania spp.***

| Especie                | No. de cepas evaluadas | Fármaco    | Célula hospedera                        | Tiempo de exposición al fármaco | Lectura de la infección | País                                                                                                                              | Referencia                         |
|------------------------|------------------------|------------|-----------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>L. infantum</i>     | 6                      | HePC Sb(V) | Línea celular U-937                     | 1 día                           | Número de amastigotes   | Portugal                                                                                                                          | Maia C. et al. (2013)              |
| <i>L. aethiopica</i>   | 24                     | HePC Sb(V) | Macrófago peritoneal de ratón - CD1     | 5 días                          | Número de amastigotes   | Etiopía                                                                                                                           | Utaile M. et al. (2013)            |
| <i>L. donovani</i>     | 28                     | HePC Sb(V) | Macrófago peritoneal de ratón - J774A.1 | 3 días                          | Número de amastigotes   | India: 12 cepas de una region de baja transmisión y 16 cepas de una region de alta transmisión                                    | Prajapati VK. et al. (2012)        |
| <i>L. infantum</i>     | 24                     | Sb(V)      | Línea celular THP-1                     | 5 días                          | Número de amastigotes   | Algeria. Cepas aisladas de diferentes areas endémicas de Algeria.                                                                 | Ait-Oudhia K. et al. (2012)        |
| <i>L. braziliensis</i> | 10                     | Sb(V)      | Línea celular THP-1                     | 6 días                          | Número de amastigotes   | Brasil                                                                                                                            | Zauli-Nascimento RC. Et al. (2010) |
| <i>L. amazonensis</i>  | 3                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. donovani</i>     | 11                     | HePC Sb(V) | Macrófago peritoneal de ratón           | 5 días                          | Número de amastigotes   | Nepal y Perú                                                                                                                      | da Luz RI. et al. (2009)           |
| <i>L. braziliensis</i> | 2                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. guyanensis</i>   | 5                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. panamensis</i>   | 16                     | Sb(V)      | Línea celular U-937                     | 3 días                          | % de células infectadas | Colombia                                                                                                                          | Rojas R. el al. (2006)             |
| <i>L. braziliensis</i> | 3                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. guyanensis</i>   | 1                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. braziliensis</i> | 26                     | Sb(V)      | Macrófago peritoneal de ratón           | 5 días                          | % de células infectadas | Nepal para <i>L. donovani</i> y Perú para las demás. <i>L. braziliensis</i> fue aislada de diferentes regiones endémicas en Perú. | Yardley V. et al. (2006)           |
| <i>L. guyanensis</i>   | 5                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. lainsoni</i>     | 4                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. peruviana</i>    | 1                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. mexicana</i>     | 1                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. donovani</i>     | 24                     | HePC       | Macrófago peritoneal de ratón           | 5 días                          | % de células infectadas | Nepal para <i>L. donovani</i> y Perú para las demás                                                                               | Yardley V. et al. (2005)           |
| <i>L. braziliensis</i> | 8                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. guyanensis</i>   | 2                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. mexicana</i>     | 1                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. lainsoni</i>     | 4                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. donovani</i>     | 10                     | Sb(V)      | Macrófago peritoneal de ratón           | 2 días                          | % de células infectadas | España                                                                                                                            | Carrio J. et al. (2001)            |
| <i>L. panamensis</i>   | 20                     | Sb(V)      | Línea celular U-937                     | 3 días                          | % de células infectadas | Colombia                                                                                                                          | Robledo SM. et al (1999)           |
| <i>L. braziliensis</i> | 8                      |            |                                         |                                 |                         |                                                                                                                                   |                                    |
| <i>L. donovani</i>     | 24                     | Sb(V)      | Macrófago peritoneal de ratón BALB/c    | 3 días                          | Número de amastigotes   | India: 9 de los pacientes de los que se aislaron la cepa respondieron al tratamiento y 15 tuvieron falla terapéutica              | Lira, R. et al. (1999)             |

La metodología con base en la determinación del EC<sub>50</sub> no permite evaluar rutinariamente la susceptibilidad debido a la poca eficiencia en la lectura de la infección, el tiempo requerido para el proceso y el costo. Además de lo anterior se requiere del aislamiento y propagación de los parásitos y esto se realiza

principalmente en los centros de referencia de leishmaniasis. El entendimiento de la relación entre la susceptibilidad de *Leishmania* y la respuesta al tratamiento ha sido impedido por la carencia de datos sobre el resultado de tratamiento [108] y las limitaciones metodológicas en la evaluación de susceptibilidad. Adicionalmente, factores como la respuesta inmune del hospedero frente al fármaco, no son tenidos en cuenta en la evaluación de medicamentos o la susceptibilidad, lo que contribuye a aumentar la brecha en el conocimiento de esta relación.

Dado que el control de la enfermedad recae en el tratamiento, la medida a tomar consiste en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas más efectivas. Sin embargo, el alto costo y tiempo requerido para el desarrollo de nuevos medicamentos ha conducido a nuevos usos de fármacos ya existentes y al estudio de terapias combinadas de acuerdo a lo recomendado por el comité de expertos en leishmaniasis de la OMS [109]. El objetivo de las terapias combinadas es conservar la vida útil de los anti-leishmaniales en uso, mediante la administración en combinación con otros compuestos que mejoren su eficacia, disminuyan los efectos adversos y la emergencia de sub-poblaciones de parásitos resistentes.

## Justificación

Los tratamientos anti-leishmaniales de primera y segunda línea en Colombia presentan fallas terapéuticas que oscilan entre 28% y 31% para Sb(V) y entre 17% y 41% para HePC de acuerdo a ensayos clínicos controlados [10,11,12]. La respuesta al tratamiento por fuera de ensayos clínicos, es decir la efectividad, es totalmente desconocida en Colombia y en la mayoría de países de la región [108] y es de esperar que sea inferior a la respuesta obtenida en ensayos clínicos controlados. Existen diversos factores que pueden contribuir a la falla terapéutica entre los cuales están la inadecuada respuesta inmune, determinantes genéticos del hospedero, la farmacocinética del medicamento, tratamientos incompletos que conllevan a concentraciones sub-terapéuticas y factores relacionados con el parásito. La susceptibilidad de la cepa de *Leishmania* al fármaco específico, es uno de los factores relacionados con el parásito que, como ocurre en otras enfermedades infecciosas, contribuye al incremento de casos de falla terapéutica [110,111].

Estudios previos sugieren que la susceptibilidad del parásito a Sb(V) y HePC puede estar influenciada por la especie de *Leishmania* [24,25]. En Colombia al menos 4 especies de *Leishmania* causan la enfermedad cutánea y se ha mostrado que su prevalencia varía dependiendo de la región geográfica [4,32]. Considerando la limitada información y la variabilidad en la respuesta terapéutica reportada para las diferentes especies [15,112], la investigación de la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* prevalentes en las regiones de alta transmisión en Colombia a los anti-leishmaniales de mayor uso, es fundamental y relevante para entender la respuesta al tratamiento y monitorear la emergencia de resistencia. El estudio de la susceptibilidad a Sb(V) en el contexto endémico en un número sin precedente de cepas de los biobancos de dos centros nacionales de referencia permite conocer ampliamente en el tiempo [a través de 3 décadas de

uso de Sb(V)] y el espacio geográfico (4 regiones geográficas naturales de Colombia) el estado de susceptibilidad al fármaco.

La resistencia de *Leishmania* a Sb(V) ha sido documentada en cepas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* procedentes de la zona del Pacífico en Colombia [30]. La resistencia primaria y la adquisición de resistencia durante el tratamiento (resistencia secundaria) fueron demostradas en algunos casos de leishmaniasis cutánea de una cohorte de 20 pacientes colombianos que presentaron falla terapéutica. La evaluación de cepas aisladas pre tratamiento y en el momento de falla al tratamiento demostró que la pérdida de susceptibilidad puede contribuir a la falla clínica [30]. Otros autores también han reportado el desarrollo de resistencia secundaria del parásito a antimonio en pacientes [28] y perros [29] infectados con *Leishmania infantum*. En el caso de HePC se desconoce si la susceptibilidad de la cepa influye en la falla al tratamiento en la leishmaniasis cutánea. Evidencia de emergencia de resistencia ha sido documentada en cepas de *L. donovani* aisladas de pacientes con LV y pacientes con leishmaniasis dérmica post-kala azar (PKDL) que recayeron después del tratamiento con HePC [31]. El potencial de HePC para seleccionar cepas resistentes durante el tratamiento fue también demostrado por un incremento en la tolerancia a HePC de *L. infantum* secuencialmente aislada de un paciente co-infectado con VIH que recibió terapia de mantenimiento con HePC durante varios años [113].

La vulnerabilidad de los medicamentos nuevos, especialmente donde la transmisión es antroponótica, es ilustrada por el incremento de la tasa de falla clínica a HePC de 3 al 7%, 10 años después de su introducción en la India [85,114]. La creciente importancia de la "urbanización" y domesticación de la transmisión de LC en Colombia, así como la documentación de resistencia primaria a Sb(V) entre casos de falla terapéutica y la persistencia de infección

después de tratamiento [115] apuntan a la factibilidad de transmisión antroponótica de la LC en algunas circunstancias.

Desafortunadamente, no hay herramientas eficientes para el monitoreo de la susceptibilidad a medicamentos en las poblaciones de parásitos circulantes. La evaluación de la susceptibilidad en amastigotes intracelulares es un proceso ineficiente en el que diversas variables (tipo de célula hospedera, dosis infectiva, forma de lectura de la infección y medios de cultivo) influyen en el resultado. El método convencional para determinar la susceptibilidad de cepas clínicas con base en el  $EC_{50}$  consiste en el análisis de curvas de dosis respuesta de la viabilidad del parásito, determinada microscópicamente, frente a diferentes concentraciones del fármaco, lo que implica un proceso largo y dispendioso que requiere de experticia para su desarrollo. Estas condiciones hacen que el monitoreo de la susceptibilidad para *Leishmania* este fuera del alcance de programas de prevención y control. Adicionalmente, dependiendo de los intervalos de concentraciones del fármaco evaluados y la susceptibilidad de la cepa, frecuentemente no se obtienen resultados que permiten generar las curvas requeridas para los análisis que estiman el  $EC_{50}$ . Esto conlleva a re-procesos haciendo ajustes en las concentraciones del medicamento y reduciendo todavía más la factibilidad del método para propósitos de vigilancia.

Por otro lado, los datos de susceptibilidad obtenidos en distintos laboratorios no son comparables o extrapolables debido a la variabilidad de las condiciones utilizadas (Tabla 2). En algunos estudios la susceptibilidad del parásito es evaluada en términos del porcentaje de células infectadas y en otros casos con base en el recuento de amastigotes intracelulares, lo que podría dar lugar a diferentes interpretaciones de la potencia del fármaco o susceptibilidad de los parásitos evaluados. Por tanto, se requiere de la optimización de las condiciones y la estandarización de una metodología y modelo eficiente para la evaluación de cepas clínicas y monitoreo de la susceptibilidad a los medicamentos en uso.

La disponibilidad de marcadores de resistencia a los anti-leishmaniales facilitaría la vigilancia de la susceptibilidad de las cepas a nivel poblacional. Sin embargo, hasta el momento no existen marcadores moleculares de resistencia para los medicamentos en uso, quedando como único método fiable para la vigilancia de la resistencia el modelo *in vitro* de susceptibilidad de amastigotes intracelulares. El desarrollo de marcadores y herramientas aplicables para su uso en el campo es una prioridad.

Además de la susceptibilidad del parásito, otro factor importante en la eficacia terapéutica de los anti-leishmaniales es la respuesta del hospedero. Dado que la patogénesis de la leishmaniasis es mediada por la respuesta inmune e inflamatoria, el control de la infección y la eficacia del tratamiento están íntimamente ligados a la respuesta del hospedero. En consecuencia los fármacos solos, son con frecuencia insuficientes para la resolución clínica de la enfermedad, incluso en individuos inmunocompetentes y además no eliminan la infección. A nivel experimental usando modelos murinos, un amplio rango de intervenciones de la respuesta inmune invierten la susceptibilidad y resistencia al tratamiento [116,117]. Debido a que el parásito y los anti-leishmaniales pueden ellos mismos modular factores del hospedero como el transporte de fármacos, el metabolismo y la respuesta inmune, la evaluación integrada de la respuesta del parásito y del hospedero permiten entender mejor la respuesta al tratamiento. La determinación de la supervivencia del parásito en presencia de células de la respuesta inmune ofrece una herramienta valiosa para determinar el efecto de los anti-leishmaniales, nuevas formulaciones y su combinación con inmunomoduladores considerando factores del hospedero que influyen en la susceptibilidad del parásito al medicamento y en la respuesta al tratamiento.

## Objetivos de Investigación

### Objetivo General

Motivado por la frecuencia de fallas al tratamiento, el objetivo general de este estudio fue definir la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* que causan la LC en Colombia a los medicamentos de mayor uso, e identificar factores influyentes en la susceptibilidad a estos medicamentos.

### Objetivos específicos:

1. Establecer una metodología eficiente para determinar la susceptibilidad de cepas clínicas de *Leishmania* a fármacos anti-leishmaniales.
2. Conocer la susceptibilidad y evidencia para la emergencia de resistencia a los medicamentos en uso entre las sub-poblaciones de *Leishmania* que causan la LC en el país.
3. Determinar integradamente la respuesta parásito-hospedero a fármacos, inmunomoduladores y nuevas formulaciones.

# **Capítulo I. Estandarización del uso de una concentración del fármaco como método eficiente para determinar la susceptibilidad de cepas clínicas de *Leishmania* a antimonio de meglumina y miltefosina**

## **Introducción**

El conocimiento sobre la susceptibilidad de cepas clínicas de *Leishmania* spp. a los fármacos en uso ha sido limitado por la ausencia de un método eficiente (menor: tiempo de proceso, número de condiciones, re-procesos y costo) para su evaluación. Los amastigotes intracelulares son el modelo de elección para los ensayos de susceptibilidad por ser el blanco del tratamiento en el humano. Son significativamente más sensibles a los antimoniales que los promastigotes [118,119], incluso a la concentración plasmática en humanos. Sin embargo, la evaluación de la susceptibilidad de cepas clínicas en amastigotes intracelulares usando el ensayo convencional de dosis respuesta, es un proceso lento, laborioso e influenciado por numerosas variables. Comúnmente estos ensayos son realizados usando diferentes líneas celulares de macrófagos provenientes de ratón o de humanos [106,107], bajo diversas condiciones de infección y con diferentes intervalos de concentración y periodos de exposición a los fármacos. Todas estas variables influyen en los resultados y la determinación de susceptibilidad, afectando su consistencia y generalización.

Convencionalmente, se determina de la concentración efectiva del fármaco que disminuye un 50% de la carga parasitaria ( $EC_{50}$ ) con base en los ensayos de dosis respuesta. No obstante, debido a la heterogeneidad en la susceptibilidad de las cepas clínicas, aun cepas con bajos valores de  $EC_{50}$  tienen con frecuencia sub-poblaciones que son resistentes [30], lo cual no es apreciado cuando se interpretan estos resultados. Adicionalmente, el  $EC_{50}$  es determinado mediante un análisis de regresión lineal que requiere una curva de dosis respuesta de al menos 5 concentraciones. Cepas con susceptibilidad hacia el extremo de sensibilidad o resistencia requieren rangos ampliados de las concentraciones del fármaco para

obtener curvas que permitan hacer los análisis. Esto implica la repetición del ensayo acorde con la evaluación inicial y/o la inclusión de numerosas concentraciones del medicamento de tal forma que cubran el potencial espectro de susceptibilidad de las cepas clínicas con intervalos que permitan un análisis de regresión confiable. La evaluación de tan amplio rango de concentraciones limita la factibilidad de determinar la susceptibilidad en cepas clínicas, especialmente a una escala que permita evaluar el comportamiento poblacional.

Los parásitos transfectados con genes reporteros como el gen de la luciferasa han mostrado ser útiles en la evaluación de fármacos porque tienen una alta sensibilidad en la detección de parásitos viables [120,121]. Sin embargo, el proceso de selección y mantenimiento de poblaciones transfectadas puede alterar la composición original de las cepas clínicas y consecuentemente el fenotipo de susceptibilidad. Por tanto, líneas de parásitos transfectados son usualmente útiles en la tamización de compuestos para la búsqueda de nuevos fármacos y no para la evaluación de susceptibilidad en cepas clínicas.

Este estudio tuvo el propósito de establecer una estrategia eficiente y confiable para determinar la susceptibilidad a medicamentos de cepas clínicas de *Leishmania* empezando con los fármacos de mayor uso en Colombia. Para este fin se definió una concentración de Sb(V) y HePC que permitiera determinar la susceptibilidad y discriminar cepas clínicas sensibles y tolerantes a estos medicamentos.

## **Materiales y Métodos**

### **Diseño de estudio**

Se realizó un estudio experimental analítico para el desarrollo de una metodología que permitiera la evaluación de la susceptibilidad a una mayor escala de número de cepas clínicas de *Leishmania* a Sb(V) y HePC usando el EC<sub>50</sub> como estándar de referencia. Con este propósito y con base en el raciocinio de que la reducción proporcional de la infección en la presencia de una concentración moderada del

fármaco permite discernir la susceptibilidad relativa, se seleccionó una concentración de Sb(V) y HePC para ser utilizada como concentración discriminatoria de la susceptibilidad. La concentración discriminatoria para Sb(V) fue 32 µg Sb(V)/mL y se basó en la máxima concentración del fármaco alcanzada en plasma ( $C_{max}$ ) [122]. En el caso de HePC la concentración discriminatoria fue 16 µM y se seleccionó por ser la menor concentración del fármaco, no toxica para los macrófagos, que permitió distinguir la susceptibilidad entre las líneas control de *L. panamensis* “sensible” y “resistente”, desarrollada experimentalmente durante este estudio. Los resultados de susceptibilidad obtenidos con el método de la concentración discriminatoria fueron evaluados y comparados con la susceptibilidad determinada como  $EC_{50}$  en 28 cepas clínicas para Sb(V) y 20 cepas clínicas para HePC.

Durante el establecimiento del método se examinó la influencia en la susceptibilidad de la dosis infectiva, temperatura de incubación durante la infección y la lectura microscópica con base en el porcentaje de infección versus la carga parasitaria. Esta última variable fue evaluada en 130 cepas clínicas y en las líneas control, tomando como referencia la concordancia con la lectura por luminometría.

### **Cepas clínicas y líneas control sensible y resistente de *Leishmania***

Un total de 130 cepas de *Leishmania* aisladas del mismo número de pacientes fueron obtenidas del Biobanco de CIDEIM para este estudio. El uso de este material fue aprobado por el Comité de Ética Humana Institucional y todos los pacientes firmaron consentimiento informado sobre el uso de muestras. Como control interno en las pruebas de susceptibilidad se incluyeron líneas de *L. panamensis* sensibles a los dos fármacos [Sb(V) y HePC] y transfectadas con el gen reportero de la luciferasa (MHOM/COL/86/1166LUC y MHOM/COL/03/3594/LUC001[120]). Las líneas resistentes a Sb(V) (MHOM/COL/86/1166-1000.1) [123] y a HePC [124] fueron derivadas de la línea

sensible MHOM/COL/86/1166LUC. La línea control resistente a HePC fue seleccionada en forma de promastigote por exposición a un incremento gradual de las concentraciones del fármaco. Inicialmente fue expuesta a 20  $\mu$ M de HePC y después de al menos tres pases con la misma concentración, se incrementó en 5  $\mu$ M la concentración del fármaco hasta alcanzar la resistencia a 60  $\mu$ M de HePC.

Las líneas control fueron incluidas en cada experimento para confirmar la capacidad discriminatoria del fármaco en cada ensayo. Las líneas resistentes a Sb(V) y HePC fueron propagadas en forma de promastigotes en medio RPMI 1640 (SIGMA, Ref: R6504, USA) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Ref: 10082, USA) y en presencia de 1000  $\mu$ moles Sb(III)/L y 60  $\mu$ moles HePC/L, respectivamente. La expresión del gen de la luciferasa en las líneas control sensible y resistentes se mantuvo por cultivo de los promastigotes en presencia de 80  $\mu$ g/mL (línea 3594/LUC) y 120  $\mu$ g/mL (1166/LUC sensible y resistentes) de geneticina G418 (Sigma).

### **Fármacos**

El Sb(V) fue donado por el Centro Médico Militar Walter Reed de los Estados Unidos (lote No. 214975AK; BLO918690-278-1A1W601; análisis de antimonio, 25% – 26.5% del peso) y la HePC fue comprada a Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI. Basado en las características de solubilidad de HePC y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial el fármaco fue disuelto en DMSO a una concentración de 1.96 mM y almacenado a -20°C. El antimonio trivalente como Sb(III) (Potasio antimonio (III) tartrato trihidratado) fue obtenido de Sigma–Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO.

### **Infección de macrófagos**

Los ensayos de susceptibilidad fueron desarrollados con amastigotes intracelulares usando el modelo de infección de macrófagos humanos derivados de la línea celular promielocítica U937 (ATCC CRL-159.3) [30]. Para la

diferenciación a macrófagos,  $1.2 \times 10^5$  células/mL fueron estimuladas con 100 ng/mL de PMA (Sigma-Aldrich, Ref: 1585) y cultivadas en placas de 24 pozos con laminillas de vidrio de 12 mm (Fisher Scientific). Las células fueron incubadas durante 5 días para su diferenciación a macrófagos y adecuada adhesión a la laminilla de vidrio en RPMI 1640 (SIGMA, Ref: R6504, USA) con 10% de SFB (GIBCO, Ref: 10082, USA), a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. [125]. La infección de los macrófagos se realizó con promastigotes de 6 días de cultivo en medio bifásico de agar sangre (Senekjie [126]) y PBS para desarrollar la forma infectiva del parásito. Los promastigotes usados correspondieron a cepas aisladas de pacientes de las tres especies de mayor prevalencia en Colombia: *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. Previo a la infección, los promastigotes fueron expuestos a opsonización durante 1 h con suero AB humano inactivado por calor a 56°C.

La infección para todas las cepas clínicas se realizó a una dosis infectiva de 5:1 (parásito:macrófago) durante 2 h a 34°C y 5% CO<sub>2</sub>, después de este tiempo los parásitos extracelulares fueron removidos por dos lavados con PBS y las células infectadas fueron incubadas con RPMI completo (RPMI mas 10% de SFB) durante 24 h a 34°C y 5% CO<sub>2</sub>. La concentración de 5 parásitos por macrófago fue definida a partir de ensayos de evaluación de la susceptibilidad a diferentes dosis infectivas de cepas clínicas (5:1, 10:1 y 20:1 -parásitos:macrófago). Para asegurar tener niveles de infectividad apropiados con la dosis de 5 parásitos, se tuvo como criterio de análisis que las cepas de *Leishmania* que presentaran una carga de parásitos menor a 200 amastigotes en 100 células no se tendrían en cuenta para los análisis.

### **Concentración discriminadora de miltefosina**

Con el fin de definir la concentración discriminadora de HePC se realizaron inicialmente ensayos de toxicidad usando diferentes concentraciones del fármaco (2, 4, 8, 16 y 32 µM HePC) a diferentes tiempos (48, 72, 96 y 120 h) en cultivos de macrófagos humanos - U937 diferenciados durante 5 días con 100 ng/mL de PMA.

La viabilidad de los macrófagos fue determinada por la medición de la actividad de la fosfatasa ácida [127]. Una vez definida la concentración más alta no tóxica de HePC (% de viabilidad  $\geq 90\%$ ), se realizaron ensayos de dosis respuesta con 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  HePC para determinar la menor concentración del medicamento que permitiera distinguir entre la línea control sensible y resistente. Para este fin, macrófagos –U937 infectados durante 24 h con las líneas control sensible y resistente a HePC fueron expuestas a las concentraciones del fármaco por 48 h y la lectura de la infección se realizó por luminometría.

### **Efecto del suero en la toxicidad y potencia de Miltefosina**

La máxima concentración de HePC no tóxica evaluada en ensayos de susceptibilidad ha variado entre 5 y 40  $\mu\text{M}$  dependiendo del tiempo de exposición al fármaco y de las concentraciones de suero en el cultivo [128,129]. Sin embargo, el  $C_{\text{max}}$  en plasma de pacientes adultos que reciben el tratamiento estándar con HePC para la leishmaniasis se ha reportado entre 75 y 170  $\mu\text{M}$  [13,130] y Gómez, MA., en preparación. Teniendo en cuenta que HePC se une a proteínas presentes en suero aproximadamente en un 97% con un 3% de unión a lipoproteínas [131], se planteó evaluar el efecto de variar la concentración del SFB en el medio de cultivo sobre la toxicidad y actividad anti-leishmanial de HePC y así determinar si la mayor actividad del fármaco observada *in vitro* se relaciona con la concentración de suero. La toxicidad de HePC fue evaluada a las concentraciones de 16, 32, 64 y 128  $\mu\text{M}$  de HePC en cultivos de macrófagos humanos derivados de la línea celular U937 con diferentes concentraciones de SFB (10%, 30%, 50% y 80%). Después de 48 h de exposición al fármaco, la viabilidad de los macrófagos fue determinada mediante el método de fosfatasa ácida [127]. Adicionalmente, la actividad anti-leishmanial de la concentración discriminadora de HePC (16  $\mu\text{M}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de SFB fue evaluada en macrófagos –U937 infectados con las líneas control sensible y resistente de *L. panamensis*. La viabilidad de los parásitos intracelulares fue determinada a las 48 h de exposición al fármaco por luminometría.

### **Exposición a fármacos y lectura de la susceptibilidad**

Los macrófagos infectados durante 24 h fueron expuestos a 32  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V) o a 16  $\mu\text{M}$  de HePC. Los ensayos para determinar el  $\text{EC}_{50}$  se desarrollaron con 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V)/mL y 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 de  $\mu\text{M}$  HePC. El medio con la concentración discriminadora o las concentraciones seriadas de Sb(V) fue reemplazado a las 48 h por nuevo medio con fármaco e incubado por 24 h más, de acuerdo a la metodología previamente estandarizada [132]. En el caso de HePC la incubación con el fármaco fue por 48 h sin reemplazo del medio. Como control se cultivaron macrófagos infectados sin fármaco.

Después del tiempo de exposición a los medicamentos, el medio fue retirado, las laminillas fueron lavadas con PBS, fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa (Sigma-Aldrich). La infección de las células fue determinada para cada condición a través de la lectura del porcentaje de células infectadas y de la carga parasitaria (número de parásitos intracelulares) en 100 células por cuadruplicado para la concentración discriminadora y en triplicado para los ensayos de dosis respuesta. El número de replicas por condición es mayor cuando se usa una sola concentración del fármaco dado que solo hay dos condiciones a evaluar (concentración discriminadora y control sin fármaco) y esto permite optimizar en la lectura de la infección. Para evaluar la infección microscópicamente, se tuvo en cuenta que los amastigotes estuvieran morfológicamente intactos (membrana celular, núcleo y kinetoplasto bien definidos). La lectura de la infectividad por microscopía fue hecha en ciego por no más de dos personas con experiencia en la identificación del parásito y la lectura de la infección intracelular. Para la concentración discriminadora la susceptibilidad fue expresada como el porcentaje de reducción de la carga parasitaria a la concentración definida del fármaco comparado con el control sin tratamiento y para los ensayos de dosis respuesta la susceptibilidad se expreso como el valor de  $\text{EC}_{50}$ . Los ensayos por luminometría

fueron expresados como unidades relativas de luz (URL) usando el luminometro Lucy 1, (Anthos-Labtec Instruments, Lagerhausstrasse, Austria).

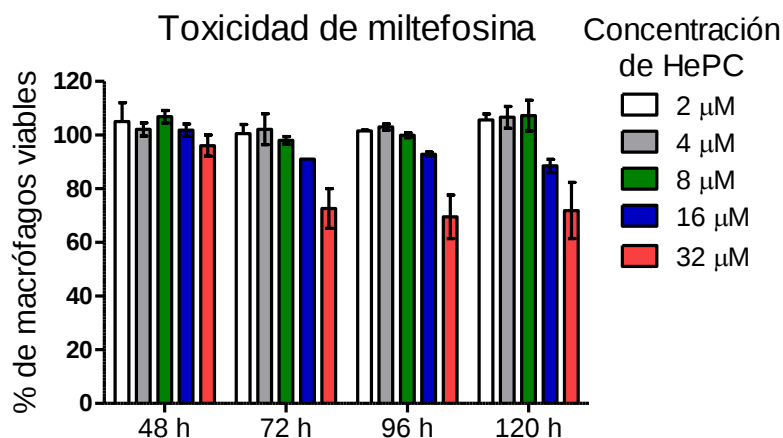
### **Métodos estadísticos**

Los valores de  $EC_{50}$  fueron determinados por el método probit en el programa SPSS (versión 7.5 para Windows 1996; SPSS). La comparación del nivel de susceptibilidad entre el  $EC_{50}$  y el porcentaje de reducción de la infección fue realizada usando el coeficiente de correlación de Spearman. Para definir el punto de corte que clasifica las cepas como sensibles y tolerantes se usó el análisis de curvas ROC. La variable dicótoma para los análisis de curvas ROC fue definida clasificando cualitativamente el nivel de susceptibilidad determinado por el  $EC_{50}$  en las líneas control sensible y resistente para cada fármaco. Los valores de  $EC_{50} \leq 32 \mu\text{g/mL}$  de Sb(V) y  $\leq 16 \mu\text{M}$  de HePC fueron adoptados para este análisis como un estándar de referencia para definir las cepas sensibles, mientras que valores  $EC_{50} > 32 \mu\text{g Sb}^V/\text{mL}$  y  $EC_{50} > 16 \mu\text{M}$  de HePC, fueron adoptados para definir las cepas tolerantes. Los análisis de concordancia entre el  $EC_{50}$  usando las dos medidas de lectura (porcentaje de células infectadas y la carga parasitaria) fueron hechos con el coeficiente de correlación interclase. Las pruebas U de Mann-Whitney, Kruskal Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn fueron aplicadas para determinar diferencias entre dos o más grupos. El valor  $P < 0.05$  fue considerado significativo para todas las pruebas. Los datos fueron analizados usando el software estadístico Prism 5 (GraphPad, Inc).

### **Resultados**

***Definición de la concentración sub-citotóxica de miltefosina.*** La toxicidad de HePC en macrófagos humanos varió de acuerdo al tiempo y a la concentración del fármaco. A las 48 h de exposición a HePC un 96% de las células fueron viables con  $32 \mu\text{M}$  de HePC (Figura 1), mientras que entre las 72 y 120 h la viabilidad con  $32 \mu\text{M}$  disminuyó en aproximadamente un 25% (de 96% a 71%). Con base en

estos resultados la máxima concentración a evaluar en los ensayos de dosis respuesta fue 32  $\mu\text{M}$  y el tiempo de exposición al fármaco fue 48 h.

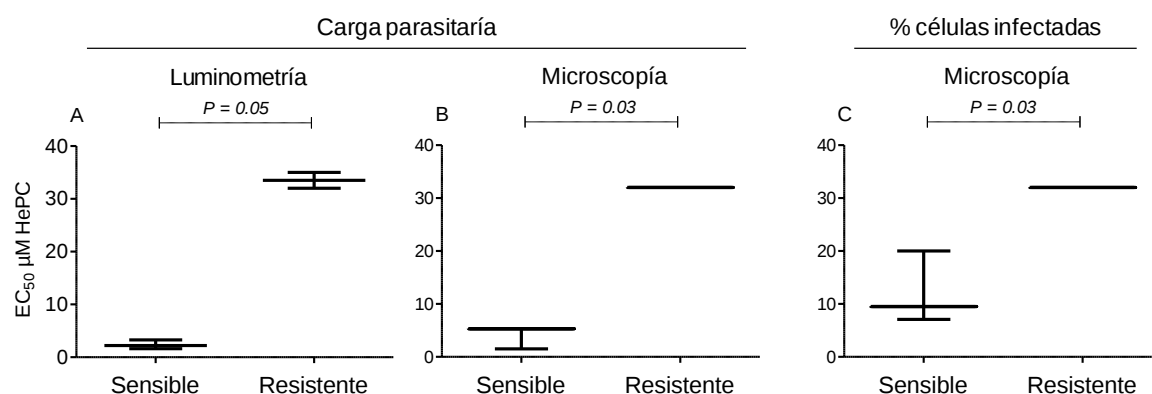


**Figura 1.4 Cinética de la toxicidad de HePC en macrófagos humanos.**

Macrófagos derivados de la línea celular U937 fueron expuestos a 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  de HePC y la viabilidad de las células fue evaluada en diferentes tiempos hasta 120 h. Los resultados son expresados como el porcentaje de células viables comparado con las células sin tratamiento y corresponden a la mediana y el rango de dos experimentos independientes.

**Confirmación de la resistencia a miltefosina en amastigotes intracelulares de la línea control.** Los amastigotes intracelulares de la línea de *L. panamensis* seleccionada como resistente a HePC toleraron la máxima concentración no tóxica del medicamento bajo las condiciones estandarizadas (mediana del porcentaje de supervivencia  $\geq$  a 85% en la lectura por luminometría,  $n = 3$  ensayos independientes). Los valores de  $\text{EC}_{50}$  para la línea resistente fueron significativamente mayores comparados con su control sensible (Figura 2). La evaluación de la carga parasitaria por microscopía claramente distinguió la línea resistente seleccionada experimentalmente de la línea sensible (Figura 2B), con una resolución comparable a la de la carga parasitaria determinada por

luminometría (Figura 2A). Aunque esta diferencia se conservó cuando el  $EC_{50}$  se determinó con base en el porcentaje de células infectadas (Figura 2C), la concordancia del  $EC_{50}$  determinado por la lectura de la carga parasitaria por microscopía fue de 99.2% comparado con luminometría, mientras que la concordancia entre el  $EC_{50}$  con base en el porcentaje de células infectadas con el  $EC_{50}$  de luminometría fue de 81%.

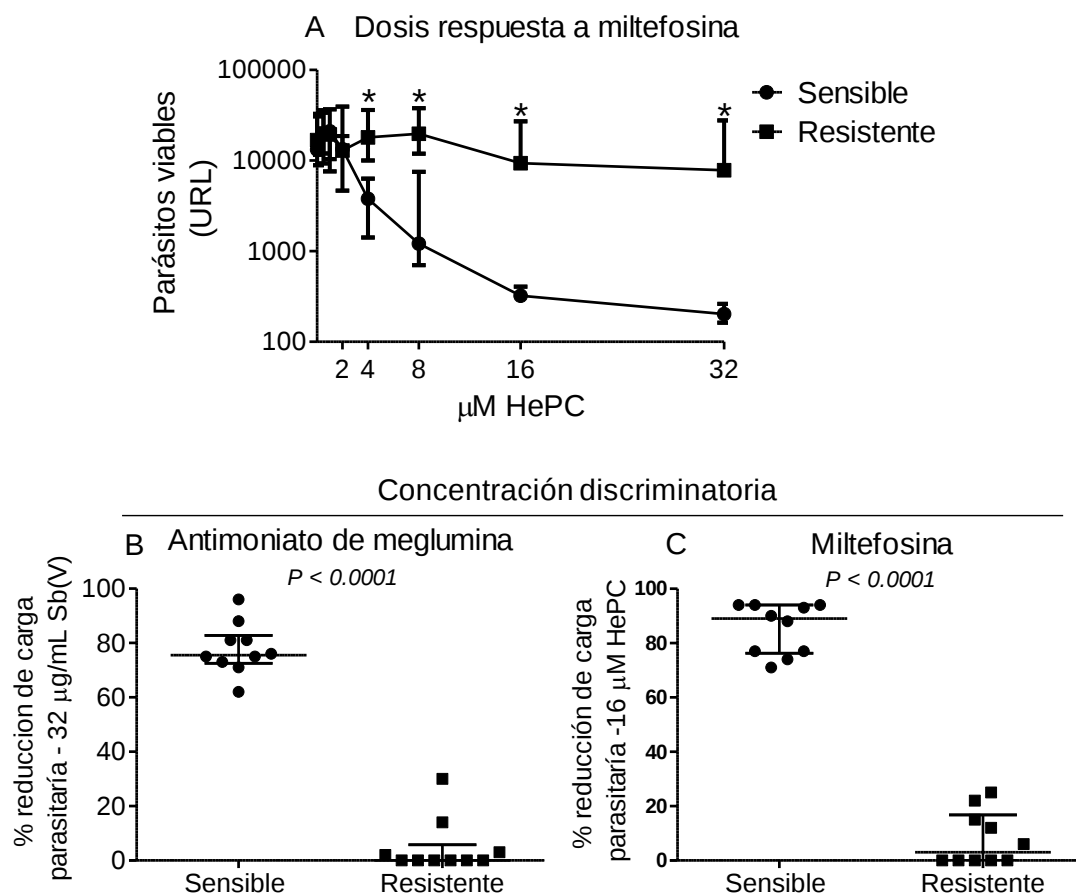


**Figura 2.5 Comparación de la susceptibilidad a HePC entre las líneas control sensible y resistente de *L. panamensis*.**

Valores de  $EC_{50}$  determinados con base en la carga parasitaria por la actividad de la luciferasa (A), la carga parasitaria mediante microscopía (B) o el porcentaje de células infectadas por microscopía (C). La susceptibilidad fue determinada en amastigotes intracelulares de las líneas control sensible y resistente a HePC de *L. panamensis*. Los valores de  $EC_{50}$  son presentados como la mediana y el rango intercuartílico, con base en tres ensayos independientes. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas con la prueba U de Mann Whitney.

**Las concentraciones definidas para Sb(V) y HePC distinguen la susceptibilidad de las líneas control de *L. panamensis*.** Con base en la comparación de la susceptibilidad entre las líneas control sensible y resistente de *L. panamensis* y la concentración máxima de Sb(V) en plasma durante el tratamiento [122], se definió la concentración discriminatoria para Sb(V) y HePC.

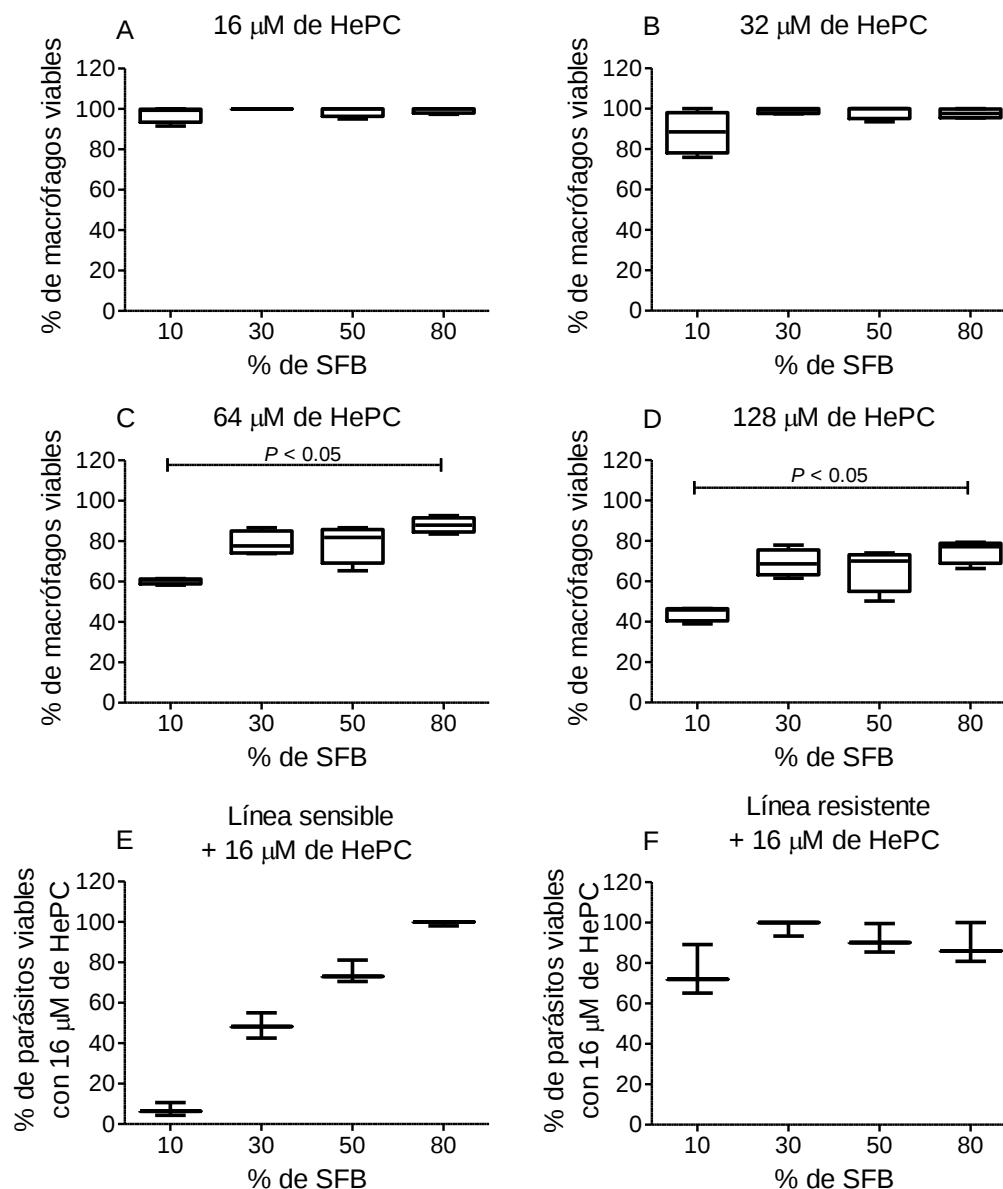
La susceptibilidad de la línea resistente a HePC fue significativamente mayor que la línea sensible a partir de la concentración de 4  $\mu$ M de HePC (Figura 3A) y la concentración del fármaco que distingue el fenotipo de susceptibilidad entre la línea sensible y la resistente, con una diferencia de más del 90% en la carga parasitaria, fue 16  $\mu$ M (URL con 16  $\mu$ M: línea sensible = 323 versus línea resistente = 16847, mediana de 3 replicas). La capacidad de la concentración discriminadora para distinguir entre las líneas sensible y resistente fue adicionalmente confirmada mediante la lectura microscópica de la carga parasitaria para Sb(V) y HePC (Figura 3B y C). Para ambos fármacos la susceptibilidad con base en la concentración discriminadora es significativamente diferente en las en las líneas control. La mediana de la supervivencia de las líneas sensible y resistente con 32  $\mu$ g/mL de Sb(V) fue 75% y 0, respectivamente. Para 16  $\mu$ M de HePC la mediana de la supervivencia de las líneas control sensible y resistente fue 89% y 3%, respectivamente.



**Figura 3.6 Susceptibilidad de las líneas control sensible y resiste de *L. panamensis* a Sb(V) y HePC.**

Ensayo de dosis respuesta para definir la concentración discriminatoria que permite distinguir las líneas sensible y resistente a HePC (A). Confirmación de la capacidad discriminatoria de 32 μg/mL de Sb(V) (B) y 16 μM de HePC para diferenciar la susceptibilidad de las líneas control sensible y resistente de cada fármaco mediante la lectura de la carga parasitaria por microscopía. Los datos de la curva son expresados como la mediana ± el rango de las URL de tres experimentos independientes y los datos de reducción de carga parasitaria son expresados como la mediana y el rango intercuartílico de 10 ensayos independientes. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas con la prueba U de Mann Whitney. \* $P < 0.05$ , diferencias entre la línea sensible y la línea resistente a HePC, panel A.

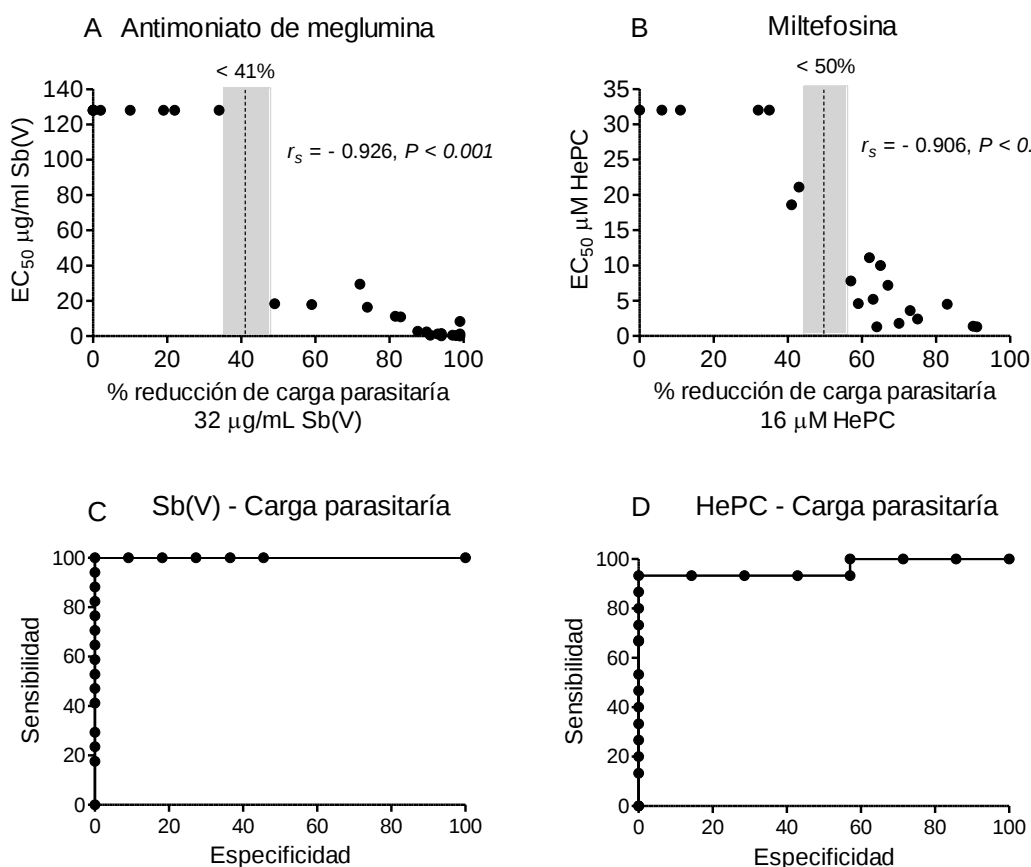
***La actividad in vitro de miltefosina está relacionada con la proporción de suero en el medio de cultivo.*** El incremento de la concentración de suero fetal bovino (SFB) en los cultivos de células expuestas a HePC disminuyó la toxicidad del fármaco (Figura 4A a D). El cultivo de células con 10% de SFB (concentración usada de rutina en las pruebas de susceptibilidad de *Leishmania*), mostró una significativa mayor toxicidad de HePC a las concentraciones de 64 y 128  $\mu\text{M}$  comparado con lo observado en cultivos con 80% de SFB (Figura 4C y D). A pesar de las diferencias en la concentración de suero, la toxicidad del fármaco a las concentraciones de 64 y 128  $\mu\text{M}$  no muestra diferencias significativas entre 30 y 80% de SFB. La actividad anti-leishmanial de HePC sobre amastigotes intracelulares de la línea sensible de *L. panamensis* disminuyó proporcionalmente con el incremento del porcentaje del SFB en el cultivo (Figura 4E), lo que demuestra la influencia del suero en la reducción de la actividad antimicrobiana de HePC. La susceptibilidad de la línea resistente no se ve significativamente afectada por el incremento del SFB en el cultivo (Figura 4F), probablemente debido a la disminución del fármaco libre.



**Figura 4.7 Efecto de la concentración del suero sobre la actividad *in vitro* de HePC.**

Dosis respuesta de la concentración del suero fetal bovino (SFB) sobre la toxicidad de HePC en macrófagos –U937 expuestos a 16  $\mu$ M (A), 32  $\mu$ M (B), 64  $\mu$ M (C) y 128  $\mu$ M (D) del fármaco. Actividad anti-leishmanial de 16  $\mu$ M de HePC sobre amastigotes intracelulares de la línea control sensible (E) y resistente a HePC (F) de *L. panamensis* en presencia de diferentes concentraciones de SFB. El porcentaje de macrófagos y parásitos viables está representado por la mediana  $\pm$  el valor mínimo y máximo de 4 y 3 experimentos independientes, respectivamente.

***La susceptibilidad determinada con base en la supervivencia del parásito en presencia de la concentración discriminadora se correlaciona con los valores de  $EC_{50}$ .*** La comparación entre la susceptibilidad de cepas clínicas de *Leishmania* determinada por el ensayo de dosis respuesta y la proporción de supervivencia frente a la concentración discriminadora mostró una alta y significativa correlación para los dos fármacos (Figura 5A y B). Las cepas con valores altos de  $EC_{50}$  presentaron una baja proporción de reducción de la carga parasitaria a la concentración discriminadora de cada fármaco. Por el contrario las cepas con bajos valores de  $EC_{50}$  mostraron una alta proporción de reducción de la carga parasitaria. De acuerdo a los análisis de curvas ROC, la tolerancia usando la concentración discriminadora se puede predecir con un porcentaje de reducción de la infección < 41% para Sb(V) (100% de sensibilidad y 100% de especificidad, Figura 5C) y < 50% para HePC (93% de sensibilidad y 100% de especificidad, Figura 5D). No obstante, debido a la ausencia de datos cercanos al punto de corte se definió como susceptibilidad indeterminada un rango de porcentaje de reducción de la infección entre 35% y 48% para Sb(V) y entre 44% y 56% para HePC. Por tanto, la tolerancia se define con un porcentaje de reducción de la infección < 35% para Sb(V) y < 44% para HePC, mientras que la sensibilidad está dada por un % de reducción de la infección > 48% para Sb(V) y > 56% para HePC.

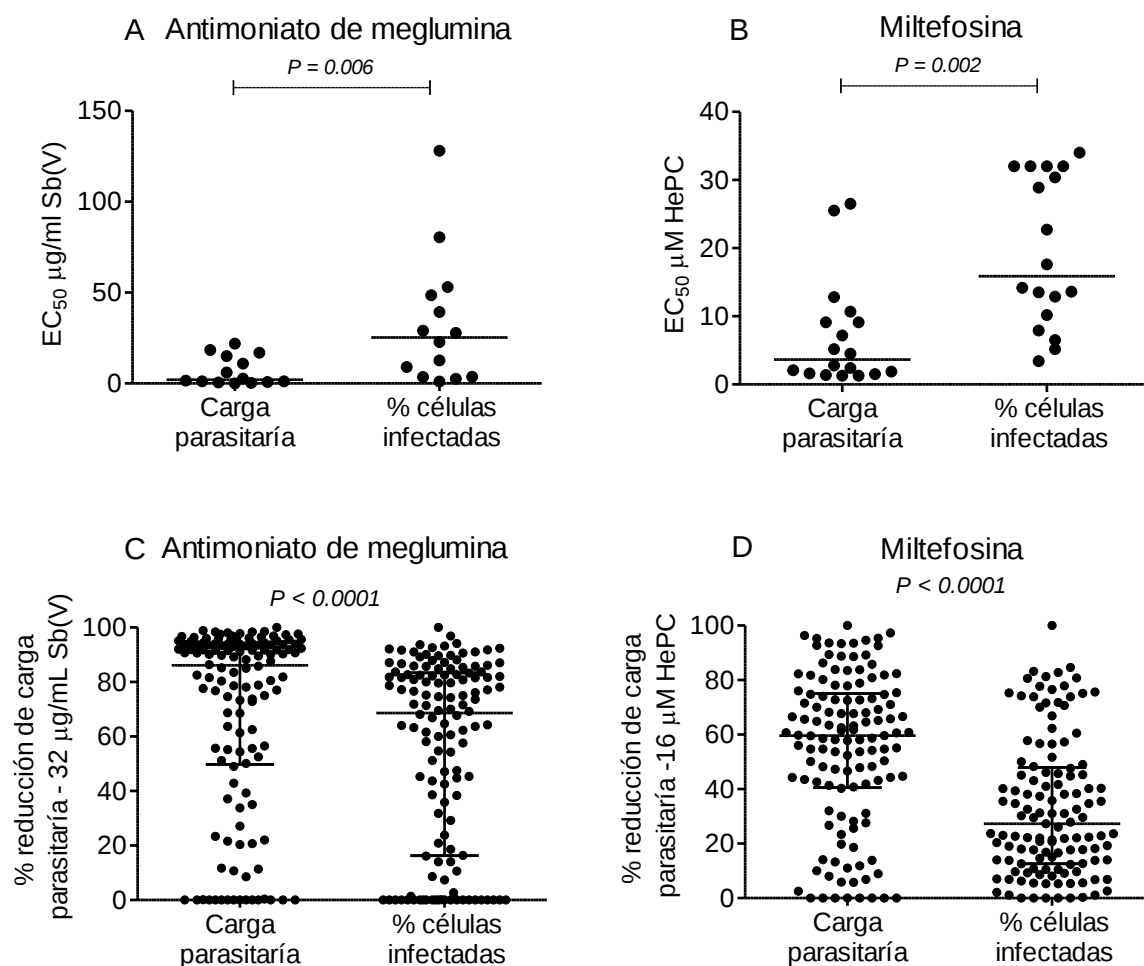


**Figura 5.8 Correlación de la susceptibilidad determinada con base en la concentración discriminadora y el EC<sub>50</sub> de Sb(V) y HePC en cepas clínicas de *Leishmania (Viannia)*.**

Análisis de correlación del porcentaje de reducción de la infección con el EC<sub>50</sub> para Sb(V) (A) y HePC (B); coeficiente de correlación de Spearman. La lectura de la infección se basó en la cuantificación de la carga parasitaria por microscopía. El punto de corte para la clasificación de tolerancia (línea punteada) se definió por curvas ROC y correspondió a una reducción de la infección < 41% para Sb(V),  $n = 28$  (C) y < 50% para HePC,  $n = 20$  (D).

**Influencia de otras variables experimentales en la determinación de susceptibilidad.** Dada la heterogeneidad de la carga de parásitos intracelulares observada entre cepas clínicas de *Leishmania*, y teniendo en cuenta que la infección expresada en términos de porcentaje de células infectadas no diferencia entre uno o varios parásitos intracelulares, se evaluó la influencia de la lectura por

microscopía mediante el porcentaje de células infectadas y la carga parasitaria (recuento de parásitos intracelulares). El  $EC_{50}$  para cepas clínicas fue significativamente mayor cuando se tuvo en cuenta el porcentaje de células infectadas versus la carga parasitaria tanto para Sb(V) (Figura 6A) como para HePC (Figura 6B). Por otro lado, la susceptibilidad expresada como la reducción de la infección por exposición a la concentración discriminatoria para Sb(V) ( $n = 130$ ) y HePC ( $n = 125$ ) fue significativamente más baja para la lectura como porcentaje de células infectadas (mediana del porcentaje de reducción, Sb(V) = 69%; HePC = 27%) comparado con el recuento de parásitos (mediana del porcentaje reducción, Sb(V) = 86%; HePC = 60%) (Figura 5C y D). Estos resultados corroboran la sobre-estimación de la tolerancia cuando la lectura de la infección se basa en el porcentaje de infección debido a que no se diferencia entre células con pocos y abundantes parásitos.



**Figura 6.9 Comparación de la susceptibilidad a Sb(V) y HePC con base en la carga parasitaria o el porcentaje de células infectadas con cepas clínicas de *Leishmania (Viannia)*.**

$EC_{50}$  de Sb(V)  $n = 14$  (A) y HePC  $n = 18$  (B) en cepas clínicas de *Leishmania* determinado con base en la carga parasitaria y el porcentaje de células infectadas. Susceptibilidad determinada por la supervivencia frente a la concentración discriminatoria para Sb(V)  $n = 130$  (C) y HePC  $n = 125$  (D) con base en la carga parasitaria y el porcentaje de células infectadas. Para todos los grupos los datos son expresados como la mediana y el rango intercuartílico y las diferencias determinadas con la prueba U de Mann Whitney.

El proceso de estandarización del método incluyó la evaluación del efecto de la dosis infectiva parásito:macrófago y de la temperatura de incubación en la susceptibilidad del parásito. La dosis infectiva de los parásitos y la subsecuente carga de parásitos en los macrófagos no alteró significativamente el resultado de susceptibilidad basado en la carga parasitaria definida por microscopía. La infección con 5, 10 o 20 parásitos:macrófago, usando la línea sensible de *L. panamensis* transfectada con el gen de la luciferasa, demostró un incremento proporcional de la carga de parásitos expresados como URL y evaluada en un total de 400.000 células por pozo en tres replicas (mediana de las URL = 5869, 10497 y 30144, respectivamente). Sin embargo, los valores de  $EC_{50}$  de HePC fueron similares y sustentaron el fenotipo sensible para las tres dosis infectivas (mediana del  $EC_{50}$  = 1.7, 4.2 y 3.3  $\mu$ M,  $n$  = 3 experimentos independientes). El análisis de la reducción de la infección a la concentración discriminadora de HePC tampoco mostró diferencias en el perfil de susceptibilidad (mediana = 96, 89 y 91%;  $n$  = 3). Estos datos fueron reproducibles cuando se hizo la lectura de la carga parasitaria por microscopía, por lo tanto, la dosis de 5 parásitos por célula fue elegida teniendo en cuenta que la menor carga de parásitos facilita el recuento y reconocimiento de las estructuras morfológicas del parásito.

El análisis del efecto de la temperatura en la susceptibilidad, mostró que la incubación de las células infectadas con *L. panamensis* a 37°C alteró la morfología de los amastigotes intracelulares, dificultando la evaluación microscópica. La incubación a 34°C no afectó la morfología de los parásitos y permitió ver el efecto anti-leishmanial de Sb(V). La disminución de la carga parasitaria a 32  $\mu$ g/mL de Sb(V) fue mayor cuando los cultivos se incubaron a 37°C comparado con los cultivos incubados a 34°C (Tabla 1). Incluso hubo una significativa disminución de la carga parasitaria solo por efecto de la temperatura.

**Tabla 1.3 Efecto de la temperatura en la susceptibilidad a Sb(V) de cepas clínicas de *L. panamensis*.**

| Condiciones experimentales                                           | Temperatura de incubación durante la infección con <i>L. panamensis</i> |            | % de reducción de la carga parasitaria por efecto de la temperatura | Valor <i>P</i> <sup>a</sup> |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                                                      | 34°C                                                                    | 37°C       |                                                                     |                             |
| Carga parasitaria sin fármaco                                        | 371                                                                     | 83         | <b>91%</b>                                                          | <i>P</i> = 0.016            |
| Carga parasitaria con 32 µg/mL de Sb(V)                              | 264                                                                     | 3          | <b>98%</b>                                                          | <i>P</i> = 0.008            |
| <b>% de reducción de la carga parasitaria por efecto del fármaco</b> | <b>21%</b>                                                              | <b>91%</b> | -                                                                   | <i>P</i> = 0.021            |

Los datos corresponden a la mediana de datos de 5 cepas clínicas de *L. panamensis*

<sup>a</sup> Prueba U de Mann-Whitney

## Discusión

La evaluación de la susceptibilidad a Sb(V) y HePC en cepas clínicas de *Leishmania* fue factible con base en la supervivencia del parásito en presencia de las concentraciones discriminatorias de estos medicamentos. La significativa correlación de la susceptibilidad determinada con el método convencional de dosis respuesta (EC<sub>50</sub>) y el porcentaje de reducción de la infección a la concentración discriminatoria, confirma la sensibilidad del método tanto para Sb(V) como para HePC. El amplio espectro de susceptibilidad observado en las cepas clínicas con la concentración discriminatoria para los dos fármacos (Figura 6C y D), demostró la capacidad de resolución del método en diferenciar poblaciones de parásitos con diversos niveles de susceptibilidad.

La definición del punto de corte basado en los análisis de curvas ROC provee además un umbral de referencia para la emergencia de tolerancia/resistencia, bien sea adquirida o debida a la expansión de poblaciones del parásito con tolerancia. Las cepas clínicas clasificadas como tolerantes a Sb(V) en este estudio presentan valores de EC<sub>50</sub> por encima del C<sub>max</sub> en plasma reportado para Sb(V) (32 µM)

[122] (Figura 5A), lo que podría ser una señal de riesgo para la ocurrencia de falla terapéutica.

El  $C_{\max}$  reportado para HePC en plasma varía entre 75  $\mu\text{M}$  y 170  $\mu\text{M}$  [13,130] dependiendo del esquema de tratamiento y corresponde a la suma de la concentración libre del fármaco y la concentración unida a proteína. Es importante destacar que el porcentaje de unión a proteína es de aproximadamente un 97% [131]. La concentración sub-citotóxica de HePC observada en este (32  $\mu\text{M}$ ) y otros estudios *in vitro* (40 y 25  $\mu\text{M}$ ) [128,129] comparada con el  $C_{\max}$  en plasma probablemente se debe a que la concentración libre del fármaco y que ejerce el efecto citotóxico es mayor en cultivos con 10% de suero que en plasma [133]. Esto se corrobora en el presente estudio por la mayor toxicidad de HePC observada en el cultivo que contiene 10% de SFB comparado con los cultivos que tienen concentraciones más altas de SFB, y por la mayor actividad anti-leishmanial de HePC a medida que se disminuye la concentración de SFB. No obstante, las diferencias de la concentración del fármaco unido a proteína o libre *in vivo* e *in vitro*, la capacidad de la concentración de 16  $\mu\text{M}$  de HePC para discriminar entre las líneas control sensible y resistente, la correlación entre el  $\text{EC}_{50}$  y la proporción de supervivencia de parásitos a esta concentración y el amplio espectro de susceptibilidad observado en las cepas clínicas (Figura 6D) apoya la relevancia biológica de los resultados de susceptibilidad y su uso en la vigilancia de la tolerancia primaria, intrínseca o la emergencia de tolerancia a HePC.

Los resultados de este estudio demuestran que la evaluación de la susceptibilidad con base en el porcentaje de células infectadas es vulnerable a sobre-estimar el  $\text{EC}_{50}$  debido a que no permite evidenciar el efecto del fármaco en la reducción del número de parásitos. Por facilitar la evaluación microscópica, varios estudios sobre susceptibilidad a fármacos en *Leishmania* se basan en el porcentaje de células infectadas [24,25,29,134]. La divergencia de los resultados entre estudios y la disparidad entre susceptibilidad *in vitro* y la respuesta al tratamiento puede ser

atribuida en parte al uso de diferentes criterios de evaluación del efecto leishmanicida. El análisis metódico de la influencia de esta variable en la susceptibilidad soporta el uso de la carga parasitaria como estándar en la evaluación de susceptibilidad a medicamentos. Por otro lado, es conocido que la infectividad varía entre cepas clínicas de *Leishmania*. En consecuencia así se establezca una dosis infectiva única, la intensidad de la infección será variable entre las cepas. No obstante, el rango de dosis infectivas de 5 a 20 parásitos:macrófago, no alteró la medida de la susceptibilidad de las cepas evaluadas aunque la carga parasitaria inicial establecida con las dosis infectivas mayores fue más alta. Mientras se dependa de la evaluación microscópica de la carga parasitaria, dosis infectivas altas dificultan la visualización de la morfología y recuento de los amastigotes. Marcadores bioquímicos o moleculares de la viabilidad del parásito superarían este inconveniente. Actualmente nuestro grupo trabaja en la validación de un marcador molecular en el parásito (7SLRNA) que permite determinar su viabilidad [135].

La temperatura de incubación también influyó en la evaluación de la susceptibilidad de cepas clínicas del subgénero *Viannia*. La sensibilidad de amastigotes intracelulares a la temperatura es reconocida. Aunque no se ha examinado sistemáticamente, la evidencia muestra que especies dermatotropicas tienen menores tasas de crecimiento a temperaturas por encima de 35°C, mientras que las especies vicerotropicas crecen bien tanto a 37°C como a 35°C [136,137]. En este estudio se demostró que la carga parasitaria fue significativamente más baja después de 4 días de cultivo a 37°C comparado con 34°C tanto en ausencia como en presencia de fármaco (Tabla 1). Por lo tanto, la evaluación de la susceptibilidad a 34°C evita la distorsión del efecto leishmanicida inducido por temperaturas mayores en la infección con cepas de *Leishmania* del subgénero *Viannia*.

La exactitud de los valores de  $EC_{50}$  y la confiabilidad de su interpretación depende del número y rango de las concentraciones del fármaco evaluadas en el ensayo *in vitro* dado que los intervalos de las concentraciones necesarias para ver un efecto de dosis respuesta varían en relación con la susceptibilidad de la población de parásitos evaluada. Por consiguiente, el uso de un rango fijo de concentraciones del fármaco, como es generalmente empleado en los ensayos de  $EC_{50}$ , no se adecua de manera uniforme al espectro del fenotipo de susceptibilidad encontrado en las cepas clínicas. La evaluación de la susceptibilidad basada en la reducción absoluta de la carga de parásitos a una concentración del fármaco, definida en relación con la farmacocinética *in vivo* y el umbral de tolerancia de las líneas sensible y resistente, obvian este importante e inapreciado origen de error al interpretar los valores de  $EC_{50}$ .

La menor complejidad y costo de la evaluación de supervivencia en presencia de concentraciones discriminatorias de Sb(V) y HePC hace más eficiente y facilita el monitoreo de la susceptibilidad a estos fármacos. Esta estrategia es aplicable a cualquier especie y cepa de *Leishmania* y puede ser estandarizada para otros fármacos, como sucede con la evaluación de susceptibilidad a través del  $EC_{50}$ . Sin embargo, la dependencia de la lectura microscópica sigue siendo una limitación. Para este fin se requiere del desarrollo de métodos de alto rendimiento para la determinación de parásitos viables. Métodos basados en la detección del ARN combinados con el uso del método desarrollado en este estudio permitirían monitorear la susceptibilidad a medicamentos en uso de forma rutinaria para contribuir a definir políticas de tratamiento [135].

En resumen la evaluación de la susceptibilidad usando una única concentración del fármaco bajo condiciones estandarizadas provee una eficiente y confiable estrategia para el monitoreo de emergencia de tolerancia o resistencia en cepas clínicas de *Leishmania*.

## **Capítulo II. Susceptibilidad y emergencia de resistencia a antimonio de meglumina y miltefosina en las poblaciones de *Leishmania* spp. que causan la leishmaniasis cutánea en Colombia**

### **Introducción**

En la LC y visceral se ha evidenciado una creciente falla al tratamiento y emergencia de parásitos resistentes a los antimoniales [28,30,138]. Recientemente también se reportó emergencia de resistencia a HePC en el tratamiento de la LV [31] Aunque el rol de la susceptibilidad del parásito en la falla al tratamiento es complejo de establecer debido a que la respuesta clínica es multifactorial, el análisis de cepas aisladas antes y en el momento de falla terapéutica demuestra que la pérdida de susceptibilidad puede contribuir en la falla al tratamiento. En el caso de la HePC se desconoce si el tratamiento induce pérdida de susceptibilidad en cepas de *Leishmania* del subgénero *Viannia* y su influencia en la falla al tratamiento de la LC.

La respuesta clínica a los antimoniales y HePC reportada en diferentes países indica una alta variación en la eficacia de estos fármacos [10,15,17,18,23,112,139]. En Colombia, donde *L. panamensis* es la especie predominantemente aislada de pacientes de la población civil [4,5,32], uno de los primeros ensayos clínicos con HePC mostró que un 91% de los individuos respondieron al tratamiento, mientras que en Guatemala, donde las especies predominantes son *L. mexicana* y *L. braziliensis*, solo un 53% de los pacientes respondieron al tratamiento [10]. No obstante, la LC causada por *L. braziliensis* en Guatemala tuvo una alta tasa (96%) de respuesta a estibogluconato de sodio [112]. Para *L. guyanensis* en Brasil se encontró una pobre respuesta al tratamiento con Sb(V) (26%) [15], pero esta especie tuvo una respuesta estimada del 92% al mismo tratamiento en Perú [23]. Aunque algunos de estos reportes no son basados en ensayos clínicos controlados, reflejan la variación de la respuesta al

tratamiento con relación a la región geográfica, especie y poblaciones de parásitos circulantes en la zona endémica.

Existe evidencia de diferencias en la susceptibilidad *in vitro* a Sb(V) y HePC inter especies de *Leishmania*; sin embargo, estos estudios se realizaron con máximo 24 cepas de *L. donovani*, 10 cepas de *L. braziliensis*, 2 cepas de *L. guyanensis* y 4 cepas de *L. lainsoni* [24,25,26]. La susceptibilidad *in vitro* a HePC de cepas de *L. braziliensis* parece ser menor que la susceptibilidad en cepas de *L. donovani*. Esta diferencia ha sido atribuida a la baja expresión en la membrana plasmática de *L. braziliensis* del complejo de transportadores de HePC, LbMT/LbRos3 [96]. Notablemente cambios en un solo nucleótido de la proteína transportadora LdMT pueden conferir resistencia [95]. La expresión de este transportador en otras especies y poblaciones de *Leishmania*, y la participación de este y otros transportadores en la respuesta al tratamiento eran desconocidas cuando se inició este estudio.

Las limitaciones técnicas para la evaluación de la susceptibilidad *in vitro* en parásitos intracelulares en relación al tiempo de proceso, número de condiciones, re-procesos y costo han restringido el estudio en un número representativo de cepas impidiendo el entendimiento de la susceptibilidad en el contexto de la prevención y el control. El desarrollo de una metodología basada en la proporción de supervivencia del parásito en presencia de una concentración única y farmacológicamente relevante de Sb(V) y HePC, que discrimina entre líneas sensibles y resistentes derivadas experimentalmente, permitió desarrollar el presente estudio para evaluar a mayor escala de número de cepas la susceptibilidad a los fármacos de uso en Colombia y los potenciales factores influyentes.

## **Materiales y Métodos**

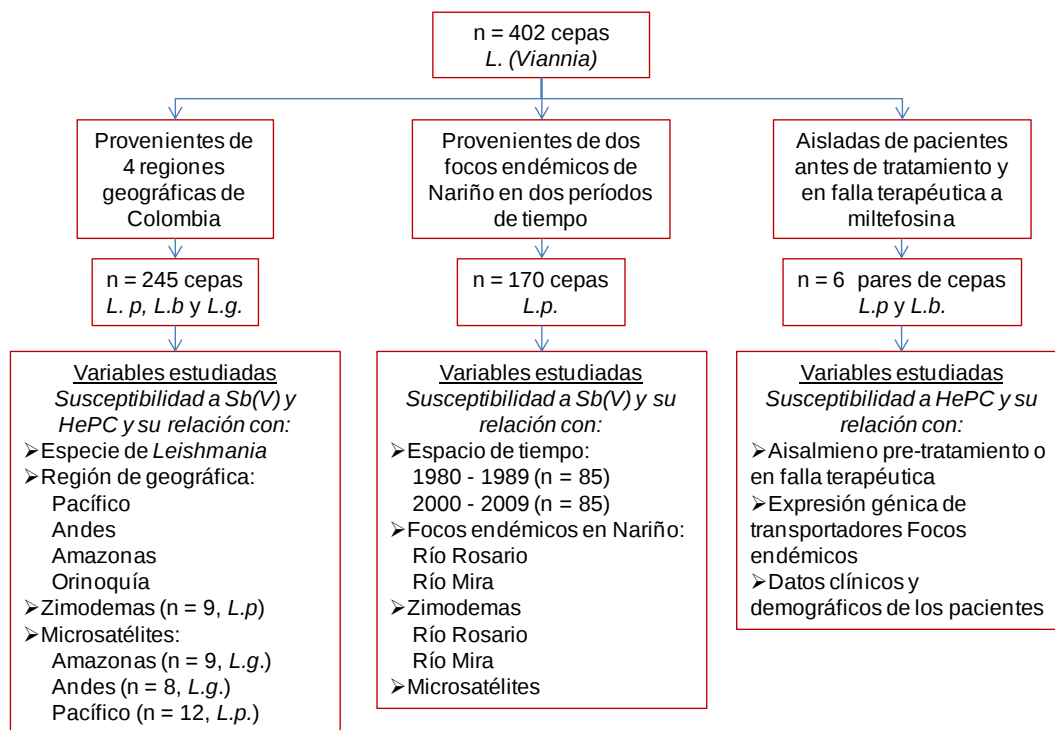
### **Diseño del estudio**

Se realizó un estudio experimental descriptivo para: i) determinar la susceptibilidad *in vitro* a Sb(V) y HePC en las especies de *Leishmania* más prevalentes en regiones de alta transmisión en Colombia, ii) evaluar cambios en la susceptibilidad a Sb(V) en poblaciones de *L. panamensis* aisladas entre 1980-1989 y 2000-2009, procedentes de dos focos endémicos en Nariño (Río Mira y Río Rosario) y iii) evaluar si la pérdida de susceptibilidad a HePC contribuye a la falla terapéutica (Figura 1). La susceptibilidad de las especies de *Leishmania* más prevalentes en Colombia fue evaluada en cepas clínicas de *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* aisladas al momento del diagnóstico de pacientes que adquirieron la infección en diferentes focos de transmisión en las regiones naturales del Pacífico, Andes, Orinoquía y Amazonas. Debido a que el Sb(V) es el tratamiento estándar en Colombia desde 1980, se evaluó si la susceptibilidad a Sb(V) en cepas de *L. panamensis*, la especie más prevalente entre la población civil, cambio en un periodo de 10 años entre 1980-1989 y 2000-2009 en dos focos de transmisión en el municipio de Tumaco. La asociación entre el fenotipo isoenzimático de *L. panamensis* y la susceptibilidad fue estudiada a nivel de genotipo en una muestra de parásitos usando la tipificación multilocus de microsatélites (MMLT).

Estudios realizados por el CIDEIM en Tumaco desde la década de los 80 han contribuido a la colección y caracterización fenotípica de cepas clínicas con base en el perfil de polimorfismos isoenzimáticos (zimodemas) [32]. Este valioso recurso junto con la información de variables demográficas y epidemiológicas (focos de transmisión, edad, sexo, y ocupación) de los pacientes de quienes se aislaron las cepas, fueron aprovechadas para investigar y entender su relación con la susceptibilidad.

Con el fin evaluar si la susceptibilidad a HePC contribuye en la falla al tratamiento, se evaluaron seis pares de cepas de *Leishmania spp.* obtenidas antes de

tratamiento y en el momento de falla terapéutica de 6 pacientes con LC aguda que recibieron tratamiento con HePC. Se analizó la expresión génica de moléculas potencialmente involucradas en el transporte de HePC. La información demográfica y clínica de los pacientes fue examinada estadísticamente en conjunto con los resultados de susceptibilidad de las cepas para identificar potenciales factores de hospedero que pudieran influenciar la respuesta al tratamiento.



**Figura 1.10** Estrategia experimental y tamaño de muestra para la evaluación de la susceptibilidad y emergencia de resistencia en cepas de las especies de *Leishmania* prevalentes en Colombia.

El diagrama de flujo muestra el tamaño de muestra de las cepas de *Leishmania* spp. evaluadas de acuerdo a las variables estudiadas. La susceptibilidad fue evaluada en amastigotes intracelulares usando la concentración discriminadora para Sb(V) y HePC. En las cepas aisladas antes de tratamiento y en falla terapéutica a HePC adicionalmente se determinó el EC<sub>50</sub> de HePC. L. p. = *L. panamensis*, L. b. = *L. braziliensis* y L. g. = *L. guyanensis*.

### **Cepas clínicas de *Leishmania***

Las cepas de *Leishmania* se aislaron en el momento del diagnóstico de pacientes con LC por personal clínico de dos de los Centros de Referencia de Leishmaniasis en Colombia y criopreservadas en los bancos de cepas de estas instituciones: *Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM*, Cali, y el *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, CDFLLA*, Bogotá, Colombia. Las cepas aisladas pre-tratamiento y en el momento de la falla terapéutica a HePC se obtuvieron de 6 pacientes que recibieron atención médica en CIDEIM sede Tumaco o Cali. La susceptibilidad *in vitro* de los parásitos se evaluó con máximo 4 pases después de su aislamiento. La identificación de especie se realizó a través de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos de especie o por electroforesis de isoenzimas (6-fosfogluconato deshidrogenasa, E.C. 1.1.1.44; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, E.C. 1.1.1.49; fosfoglucomutasa, E.C. 2.7.5.1; manosa fosfato isomerasa, E.C. 5.3.1.8; glucosa fosfato isomerasa, E.C. 5.3.1.9; superóxido dismutasa, E.C. 1.15.1.1; Inosine nucleosidasa, E.C. 3.2.2.2) [5,32].

El número de cepas evaluadas de *L. panamensis* corresponde a una muestra representativa de las regiones del Pacífico y los Andes donde es prevalente esta especie (tamaño de muestra entre 35 y 58 cepas por región para Sb(V) y HePC, IC95% 0.71-0.97). Para el cálculo del tamaño de muestra se asumió una sensibilidad *in vitro* esperada de *L. panamensis* a Sb(V) de 84% de acuerdo al reporte de eficacia en pacientes [16]. Para *L. braziliensis* y *L. guyanensis* el tamaño de muestra por región geográfica fue por conveniencia, en el caso de las cepas provenientes de las regiones de Amazonas y Orinoquía se trabajó con el total de cepas disponibles en los Centros de Referencia. En total 245 cepas se evaluaron, de las cuales 41 eran solo para Sb(V) y otras 41 solo para HePC. El resto (n=163) se evaluaron para los dos fármacos. El número de cepas evaluadas por especie para cada fármaco se resume en la Tabla 1.

Con el propósito de caracterizar cambios en el perfil de susceptibilidad para el Sb(V) en un área de alta transmisión en Colombia y con un uso prolongado de antimonio de meglumina, se evaluaron cepas aisladas en dos periodos: entre 1980 y 1989, al inicio del programa nacional para el control de leishmaniasis, y cepas aisladas en la década reciente, entre 2000 y 2009. Se estimó un tamaño de muestra para la diferencia de promedio de dos grupos con un nivel de confianza del 95%, un poder estadístico del 80% y una razón entre los grupos de 1. Se asumió un  $EC_{50}$  promedio de 52,29  $\mu\text{g/ml}$  de Sb(V) con una desviación estándar de 64,33  $\mu\text{g/ml}$  de Sb(V) para las cepas aisladas entre 1980 y 1989 de acuerdo a datos obtenidos en previos estudios de la misma época y región [132]. Teniendo en cuenta la desviación estándar obtenida en los  $EC_{50}$  de las cepas de la década de los 80, se planteó una hipótesis nula de  $EC_{50} = 80 \mu\text{g/ml}$  para las cepas aisladas entre 2000 y 2009, asumiendo que la varianza de los grupos son homogéneas. Se obtuvo un tamaño de muestra de 85 cepas para cada periodo (170 en total). Las cepas se evaluaron con base en la supervivencia frente a la concentración discriminatoria teniendo en cuenta su correlación con los valores de  $EC_{50}$ .

**Tabla 1.4** Número de cepas clínicas evaluadas de las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* provenientes de diferentes regiones geográficas de Colombia.

|              | Número de cepas evaluadas por especie (%) |                        |                      | Total de cepas evaluadas por fármaco |
|--------------|-------------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------------|
|              | <i>L. panamensis</i>                      | <i>L. braziliensis</i> | <i>L. guyanensis</i> |                                      |
| <b>Sb(V)</b> | 117 (57)                                  | 58 (28)                | 29 (15)              | <b>204</b>                           |
| <b>HePC</b>  | 107 (52)                                  | 63 (31)                | 34 (17)              | <b>204</b>                           |

Nota: Se evaluaron un total de 245 cepas: 163 cepas para los dos fármacos, 41 cepas sólo para Sb(V) y 41 cepas sólo para HePC.

### **Características de los pacientes con falla terapéutica a miltefosina**

Se determinó la susceptibilidad en cepas de *Leishmania* aisladas antes de tratamiento y en el momento de falla terapéutica de 6 pacientes con LC (Tabla 2) para evaluar la influencia de la pérdida de susceptibilidad en la falla terapéutica con HePC. Cuatro de los pacientes presentaron entre 1 y 6 lesiones cutáneas activas de 1 a 4 meses de evolución. Un paciente presentó LM y LC diseminada de un mes de evolución y otro presentó LM activa de 96 meses de evolución con cicatrices de lesiones cutáneas compatibles con leishmaniasis que ocurrieron 25 años antes de la consulta. El diagnóstico y tratamiento fue realizado por personal de salud de CIDEIM. Todos los pacientes completaron tratamiento con HePC con esquemas de 1.4-2.5 mg/kg/día durante 28 días.

Dos de los pacientes eran niños que recibieron el tratamiento supervisado dentro de un ensayo clínico controlado realizado entre el 2007 y 2009 [12]. Se evaluaron clínicamente durante y al final del tratamiento, y a las 13 y 26 semanas después de iniciarlo. La falla al tratamiento en estos niños fue diagnosticada por la ausencia de cicatrización de las lesiones a la semana 13 de acuerdo con el protocolo de estudio. Los cuatro pacientes adultos, con edades entre 55 y 72 años, presentaron condiciones clínicas concomitantes (Tabla 2) y recibieron el tratamiento ambulatoriamente. Dos de los adultos habían fallado previamente al tratamiento con antimonio de meglumina. La falla al tratamiento en los pacientes adultos ocurrió a la semana 26 de iniciar el tratamiento o antes. En uno de los casos la lesión inicial empeoró y nuevas lesiones aparecieron al final del tratamiento (seis en total). En otro caso no hubo curación a la semana 26 y los otros dos experimentaron reactivación de lesiones cutáneas o mucosa.

El presente estudio fue aprobado y monitoreado por los Comités Institucionales de Ética Humana de CIDEIM y del CDFLLA para el uso de cepas clínicas e información relacionada con los pacientes de acuerdo a las guías nacionales e internacionales de Buenas Prácticas Clínicas. En el momento del diagnóstico los

pacientes con edad  $\geq$  a 18 años aprobaron mediante la firma de un consentimiento informado el uso de la información clínica. En el caso de los niños previamente incluidos en el ensayo clínico se obtuvo su asentimiento y el consentimiento fue firmado por uno de los padres.

**Tabla 2.5** Características clínicas y susceptibilidad de las cepas de *Leishmania* aisladas antes de tratamiento y en el momento de falla terapéutica con miltefosina.

| Paciente No. | Sexo | Edad (años) | Condiciones concurrentes                                      | Tipo de lesiones | No. de lesiones | Duración de las lesiones (meses) | Tratamientos previos (No. ciclos)        | Especie                   | EC <sub>50</sub> *           |                | % de reducción de la infección con 16 $\mu$ moles HePC /L (%) $\pm$ DS* |                      |
|--------------|------|-------------|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|----------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|              |      |             |                                                               |                  |                 |                                  |                                          |                           | $\mu$ moles HePC /L $\pm$ SD |                | Antes de tratamiento                                                    | En falla terapéutica |
| 1            | M    | 8           | Ninguna                                                       | Cutánea          | 5               | 1                                | Ninguno                                  | <i>L. V. panamensis</i>   | 2.1 $\pm$ 0.7                | 2.9 $\pm$ 2.2  | 88.0 $\pm$ 2.0                                                          | 88.0 $\pm$ 5.0       |
| 2            | F    | 10          | Ninguna                                                       | Cutánea          | 3               | 1                                | Ninguno                                  | <i>L. V. panamensis</i>   | 10.0 $\pm$ 3.7               | >32.0          | 67.0 $\pm$ 6.0                                                          | 31.0 $\pm$ 3.0       |
| 3            | M    | 55          | Hipertensión arterial no controlada                           | Mucocutánea      | ~50             | 1                                | Ninguno                                  | <i>L. V. panamensis</i>   | 15.9 $\pm$ 3.2               | ND †           | 48.0 $\pm$ 5.0                                                          | 60.0 $\pm$ 10        |
| 4            | F    | 64          | Adenocarcinoma de seno                                        | Cutánea          | 1               | 4                                | Antimoniato de Meglumina (2 incompletos) | <i>L. V. braziliensis</i> | 10.5 $\pm$ 4.1               | 8.7 $\pm$ 2.5  | 65.0 $\pm$ 8.0                                                          | 62.0 $\pm$ 9.0       |
| 5            | M    | 64          | Insuficiencia cardíaca<br>Hipertensión arterial no controlada | Cutánea          | 6               | 2                                | Ninguno                                  | <i>L. V. braziliensis</i> | 20.3 $\pm$ 2.5               | >32.0          | 39.0 $\pm$ 8.0                                                          | 0 $\pm$ 2            |
| 6            | M    | 72          | Inmunosupresión farmacológica                                 | Mucosa           | 2               | 96                               | Glucantime® (1 completo)                 | <i>L. V. braziliensis</i> | 10.7 $\pm$ 3.0               | 12.0 $\pm$ 5.2 | 54.0 $\pm$ 1.0                                                          | 45.0 $\pm$ 5.0       |

\*Los ensayos de susceptibilidad fueron realizados en amastigotes intracelulares. Los datos representan al menos dos replicas experimentales.

† El valor de EC<sub>50</sub> no fue determinado por que los intervalos de confianza fueron amplios (ND). Los datos de la curva de dosis respuesta en 2 de 3 ensayos independientes no permitieron calcular el intervalo de confianza.

Abreviaciones: EC<sub>50</sub> : 50% de la concentración efectiva. HePC (hexadecilfosfolina), miltefosina. DS: Desviación Estándar

### **Evaluación de la susceptibilidad *in vitro* en amastigotes intracelulares**

La susceptibilidad en todas las cepas fue determinada con base en la reducción intracelular de la carga parasitaria usando las concentraciones discriminatorias de 32 µg/mL de Sb(V) y 16 µM de HePC como se describió en el capítulo 1 (páginas 35 a 37) [124]. La dosis infectiva parásito:macrófago usada fue de 5:1. La susceptibilidad se expresó como el porcentaje de reducción de la carga parasitaria respecto al control sin fármaco. La clasificación cualitativa de sensibilidad o tolerancia fue definida respectivamente por la reducción de la carga parasitaria por encima o por debajo del rango definido como indeterminado para cada fármaco [Sb(V): sensibilidad por encima de 48% y tolerancia por debajo de 35%, para HePC: sensibilidad por encima de 56% y tolerancia por debajo de 44%]. (Figura 2). La metodología de la evaluación de susceptibilidad de amastigotes intracelulares y el fundamento de la clasificación de sensibilidad y tolerancia corresponden a la descripción de métodos del capítulo 1 (páginas 27 a 33), al igual que la descripción de las líneas control incluidas en todos los ensayos y la información de los fármacos. Adicionalmente, se hicieron ensayos de dosis respuesta con HePC (rango de HePC: 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µM) para determinar el EC<sub>50</sub> en las cepas aisladas antes de tratamiento y en el momento de falla terapéutica a HePC.

### **Genotipificación de cepas de *Leishmania* usando la tipificación multilocus de microsatélites**

Con el fin de examinar la relación entre el genotipo y la susceptibilidad de las cepas de *Leishmania*, se analizó mediante tipificación multilocus de microsatélites (*Multilocus Microsatellite Typing - MLMT*) la diversidad de las cepas de *L. panamensis* de la región del Pacífico pertenecientes a los zimodemas 2.2 (n = 10) y 2.3 (n = 10). También se incluyeron cepas de *L. panamensis* que no tenían clasificación del zimodema procedentes de la misma región del Pacífico (12 cepas), y cepas de *L. guyanensis* de la región del Amazonas (n = 9) y de los Andes (n = 8). Las cepas de *L. guyanensis* fueron incluidas para explorar la

diversidad genética y la relación entre las poblaciones involucradas en la epidemia de transmisión doméstica en la región de los Andes (Chaparral- Tolima) [140,141] y las cepas procedentes del Amazonas donde prevalece esta especie en pacientes expuestos por ocupación a la transmisión selvática.

Las muestras de ADN fueron extraídas de los promastigotes en fase logarítmica empleando un kit de extracción (DNeasy Blood & Tissue Kit - Qiagen, USA). Un total de 14 microsatélites distribuidos en 13 de los cromosomas de *Leishmania* se amplificaron por PCR como se ha descrito previamente [142]. El tamaño de los microsatélites se determinó por la movilidad del producto de PCR en geles de agarosa al 4.5%. La distancia genética se estimó usando los programas MSA 4.05 y Populations 1.2.32 y en la construcción del dendograma de las poblaciones estudiadas se usó el método Neighbor Joining en MEGA-5.

### **Evaluación de la expresión génica de transportadores tipo ABC y LbMT por qRT-PCR**

Para explorar la relación entre la susceptibilidad a HePC y la expresión de transportadores potencialmente involucrados en el transporte de HePC en el parásito, se evaluó el perfil de expresión génica del transportador de HePC LbMT, de los transportadores asociados a multiresistencia a fármacos como ABCC2 y ABCC3, y de los transportadores de lípidos como ABCA2, ABCA3, ABCG4 y ABCG6. El análisis se hizo con base en la homología bioquímica de HePC con la molécula de fosfatidilcolina y la evidencia de que ABCG4 [98] y ABCG6 [99] están involucrados en la resistencia a HePC desarrollada experimentalmente.

La expresión de los genes *abca2* (LbrM. 11.1020), *abca3* (LbrM. 11.1000), *abcc2* (LbrM. 23.0230), *abcc3* (LbrM.23.0280), *abcg4* (LbrM. 15.0930) *abcg6* (LbrM. 35.3110) y *LbMT* (XM\_001563228) se evaluó por qRT-PCR. El ARN total se extrajo de promastigotes en fase logarítmica empleando TRIzol (Invitrogen, USA),

seguido por la transcripción reversa a ADNc con un kit de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los cebadores pareados fueron:

***abca2***

ABCA2-F 5' ACCCTGGCGCGTGAGCTTTC3'

ABCA2-R 5' AGCGCCTCCACCTCCTCCAG3'

***abca3***

ABCA3-F 5' GCGAAGTG GGCGAGGTGCTT3'

ABCA3-R 5' GTCTGTGACGTGCAGCCGCT3'

***abcc2***

ABCC2-F 5' CGAACGAGTAGCGTTGTGAA3'

ABCC2-R 5' CGAGAAACTCGACACGAACA3'

***abcc3***

ABCC3-F 5' CAGAGCGCACTGGTACCAC3'

ABCC3-R 5' GCAGCTCTGG GTCAGGCTGG3'

***abcg4***

ABCG4-F 5' CTCATCACGAACCCCTTTGT3'

ABCG4-R 5' CCAGTAGCAGCAGATCGTCA3'

***abcg6***

ABCG6-F 5' ACGACGCTGCTCGATA TCTT3'

ABCG6-R 5' CTAGTTCCTCGGTCGAGACG3'

***LbMT***

LbMT-F 5' GGTG ACGTCAGTTGTGCCGC3'

LbMT-R 5' GACGACATCGGCACGCACCT3'

***$\beta$ -tubulin (LbrM.21.2150)***

$\beta$ TUB-F 5' CGTGCAGAACAAAGAACTCCA3'

$\beta$ TUB-R-F 5' CTCGGTG AACTCCATCTCGT3'

La qRT-PCR se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied-Biosystems) y el sistema de detección para PCR en tiempo real Bio-Rad

CFX96™. La expresión génica se cuantificó con base en curvas estándar para cada gen y normalizada con la expresión del gen *β-tubulina*.

### **Métodos estadísticos**

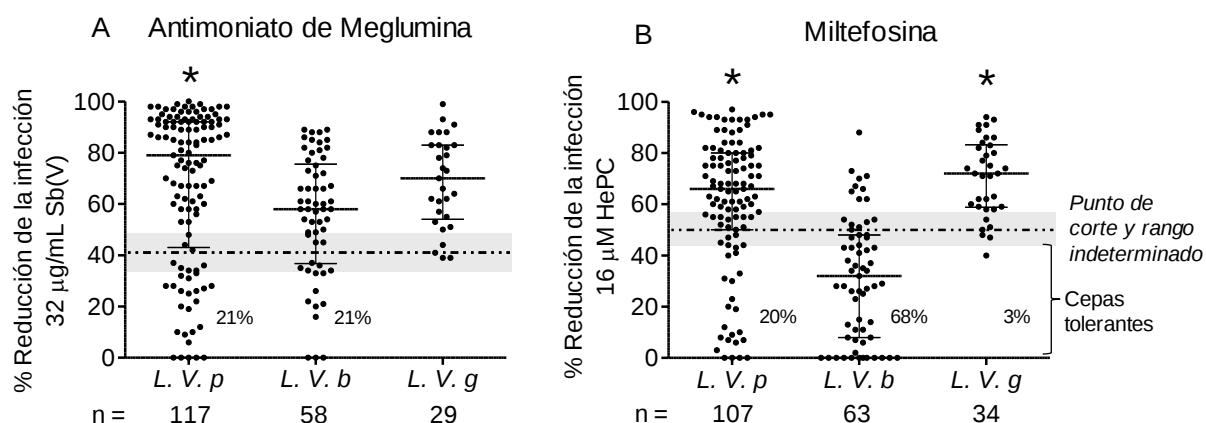
Las cepas de *L. panamensis* de las regiones del Pacífico y Andes se seleccionaron usando una técnica de aleatorización simple. Teniendo en cuenta la distribución de los datos se usaron las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (K-W) acompañada con la prueba de Dunn para comparaciones entre dos o múltiples grupos respectivamente. La asociación entre la susceptibilidad y variables como el zimodema, la edad y ocupación se determinó usando tablas de contingencia (Chi cuadrado). La comparación de las proporciones (expresadas como porcentajes) se hizo aplicando la prueba Z. El área bajo la curva se uso para determinar diferencias en la susceptibilidad a HePC en las cepas clínicas aisladas antes y en el momento de falla terapéutica. Los análisis de correlación se realizaron con el coeficiente de correlación de Spearman. Los valores de EC<sub>50</sub> se determinaron usando el programa Probit de SPSS (versión 20). La expresión del gen *LbMT* de las cepas aisladas antes de tratamiento y en falla terapéutica fue analizado con la prueba Wilcoxon signed-rank o pruebas pareadas de acuerdo a la distribución de los datos. El análisis de componentes principales fue desarrollado para la expresión de los genes de los transportadores usando el software Tanagra [143]. El valor  $P < 0.05$  se consideró significativo para todas las pruebas. Los datos se analizaron usando el software estadístico Prism 5 (GraphPad, Inc).

### **Resultados**

***La susceptibilidad a los anti-leishmaniales varió entre cepas de Leishmania de la misma especie y entre las especies del subgénero Viannia.*** La comparación del porcentaje de reducción de la infección mostró que las cepas de *L. braziliensis* fueron significativamente más tolerantes a los dos fármacos comparado con las otras especies del subgénero *Viannia* (Figura 2). El análisis cualitativo, teniendo en cuenta el punto de corte y el rango indeterminado, mostró

que *L. panamensis*, la especie de mayor prevalencia en Colombia, incluía aproximadamente un 20% de cepas tolerantes tanto para Sb(V) como para HePC. *L. guyanensis* presentó la mayor proporción de cepas sensibles para ambos fármacos [82%, 28/34 para HePC and 86%, 25/29 para Sb(V)], con solo una cepa clasificada como tolerante a HePC y ninguna a Sb(V). En contraste, una alta proporción de cepas (68% 43/63) de *L. braziliensis* presentaron tolerancia a HePC, pero la mayoría de cepas fueron sensibles a Sb(V) (69%, 40/58). La susceptibilidad de una menor proporción de cepas, 8% para Sb(V) y 16% para HePC cayó dentro del rango indeterminado.

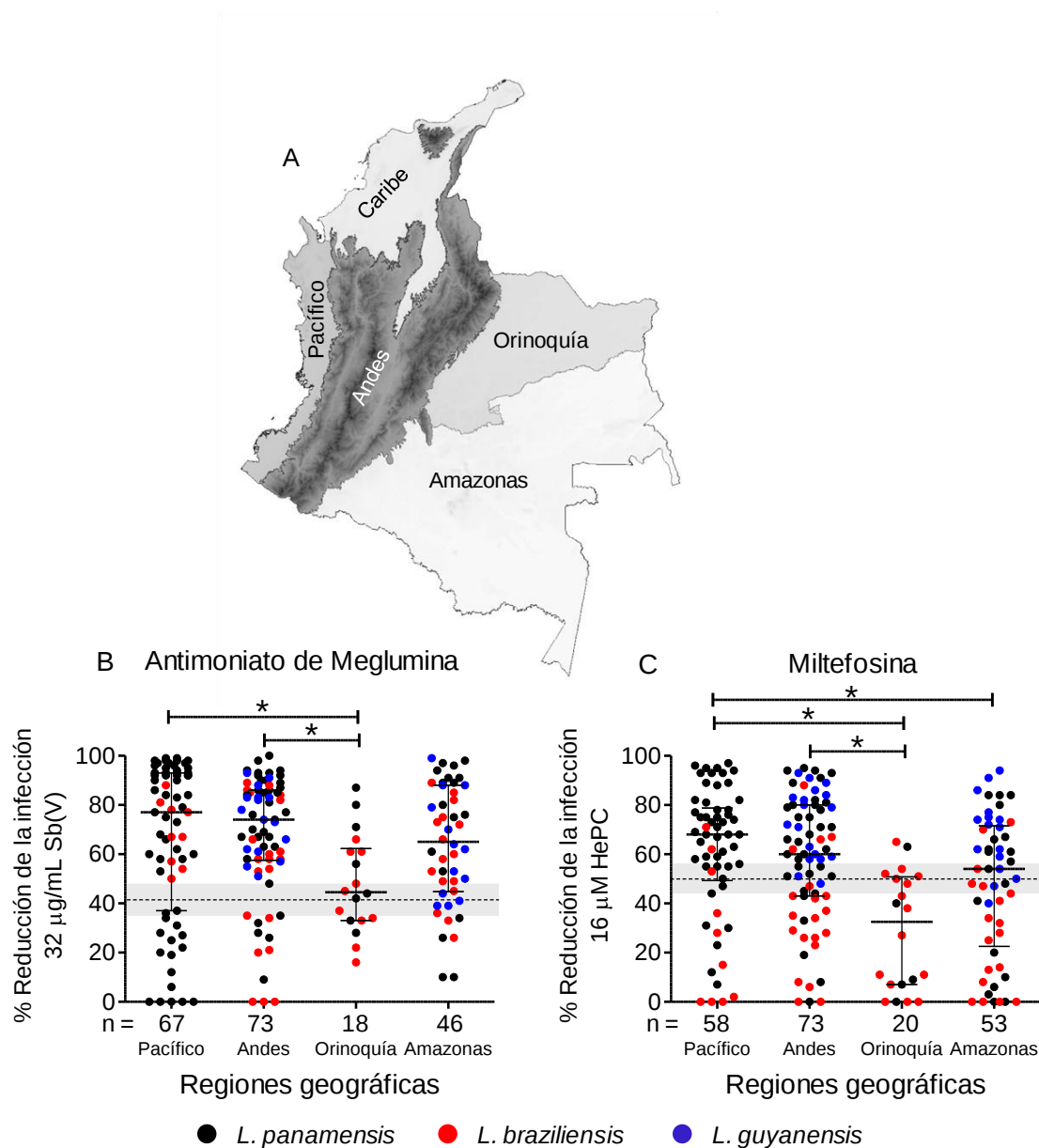
Solo un 10% (16/163) de las cepas de las tres especies evaluadas con los dos medicamentos mostraron tolerancia a ambos fármacos: 9% (7/80) de *L. panamensis* y 17% (9/54) de *L. braziliensis*. Aunque el análisis de correlación de susceptibilidad a los dos fármacos fue significativo ( $P = 0.0002$ ), el efecto atribuible fue muy bajo,  $r_s = 0.283$ .



**Figura 2.11** Susceptibilidad a Sb(V) y HePC de las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* prevalentes en Colombia.

Los datos son presentados como el porcentaje de reducción de la infección a la concentración discriminatoria de los anti-leishmaniales en cepas clínicas de *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. La línea punteada indica el punto de corte de <41% de reducción de la infección para Sb(V) (A), y <50% de reducción de la infección para HePC (B). La zona gris corresponde a la zona indeterminada definida entre 35% y 48% para Sb(V) y entre 44% y 56% para HePC (Fernandez O, et al 2012). La comparación entre grupos se realizó con la prueba Kruskal-Wallis (K-W). KW para Sb(V):  $P = 0.0009$  y K-W para HePC:  $P < 0.0001$ . \*Prueba de Dunn  $P < 0.05$ : \*Comparado con *L. braziliensis*.

**La susceptibilidad a Sb(V) y HePC varió entre cepas de diferente origen geográfico.** Los análisis exploratorios mostraron una variación en la susceptibilidad entre regiones geográficas (Figura 3). Las cepas provenientes de pacientes que adquirieron la infección al oriente de la cordillera de los Andes (Orinoquía y Amazonas) fueron significativamente menos susceptibles a HePC que las cepas de pacientes provenientes de la región del Pacífico, al occidente de la cordillera (Figura 3C). La tolerancia a HePC de las cepas del Amazonas fue influenciada principalmente por *L. braziliensis* (K-W:  $P = 0.0003$ , Prueba Dunn's:  $P < 0.05$ ). Las cepas de la Orinoquía presentaron la mayor tolerancia a los dos fármacos (Figura 3B y C).

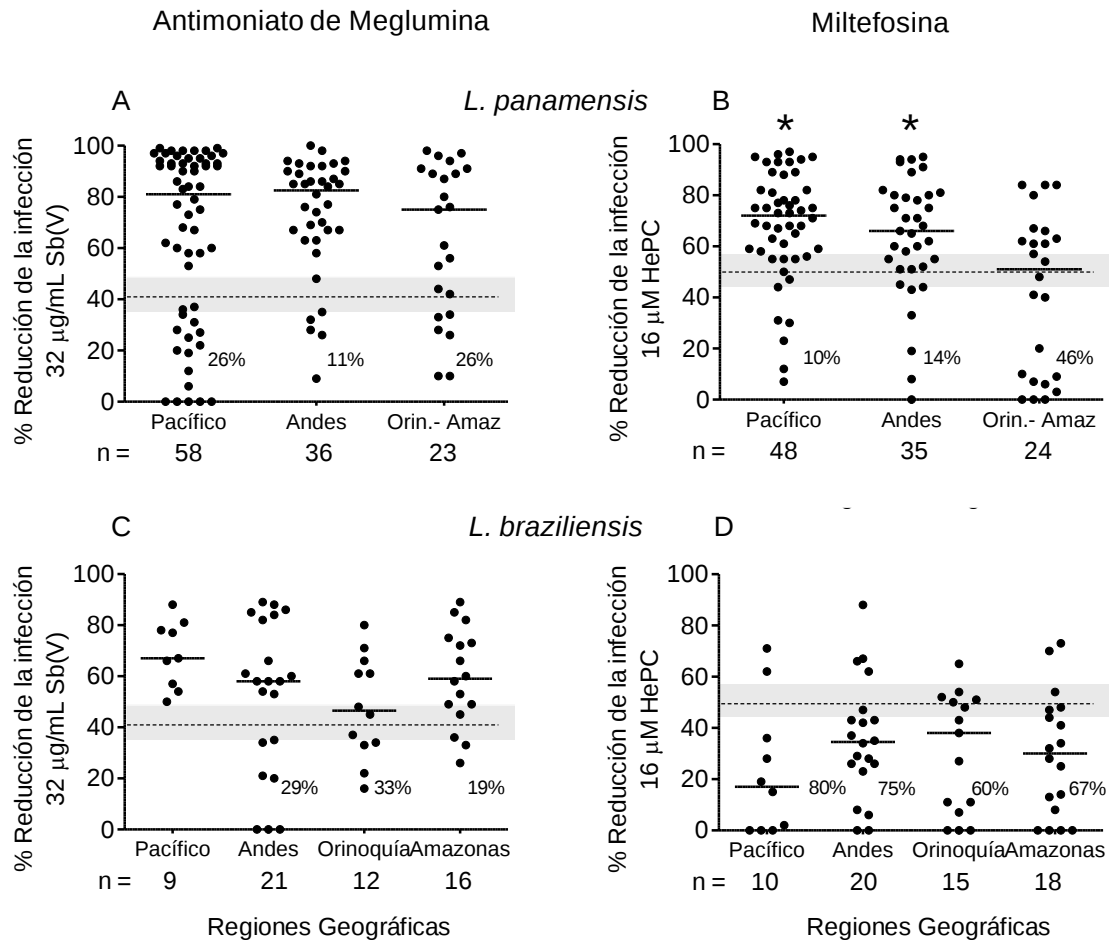


**Figura 3.12** Susceptibilidad a Sb(V) y HePC en las especies de *Leishmania Viannia* provenientes de las regiones geográficas naturales de Colombia.

Mapa de las regiones geográficas naturales de Colombia de acuerdo al Instituto Geográfico Agustín edición 2012 (A). Susceptibilidad expresada como el porcentaje de reducción de la infección a la concentración discriminadora de Sb(V) (B) y HePC (C) en cepas clínicas de *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. La distribución de los datos está representada como la mediana y el rango intercuartílico. La clasificación cualitativa de la susceptibilidad se definió por el punto de corte (línea punteada) y el rango

indeterminado (zona gris). K-W para Sb(V):  $P = 0.012$  y K-W para HePC:  $P < 0.0001$ .  
\*Prueba de Dunn  $P < 0.05$ .

Una proporción significativamente mayor de cepas de *L. panamensis* de las regiones de Orinoquía y Amazonas presentaron tolerancia *in vitro* a HePC (46%, 11/24) comparado con las cepas de los Andes y del Pacífico (14%, 5/35 y 10%, 5/48, respectivamente) (Figura 4B). Sin embargo, una alta proporción de estas mismas cepas (73%) fueron sensibles a Sb(V) (Figura 4A). El análisis de la susceptibilidad a HePC de acuerdo al año de aislamiento de las cepas de *L. panamensis* procedentes de Orinoquía y Amazonas, mostró que los parásitos aislados durante o después del año de aprobación de HePC como tratamiento de la LC en Colombia (2005), presentaron una reducción de la infección significativamente menor que las cepas aisladas antes de este año (Figura 5) sugiriendo que el uso del medicamento haya influenciado la susceptibilidad. En el caso de *L. braziliensis*, aunque no se encontraron diferencias significativas, las nueve cepas provenientes del Pacífico fueron sensibles a Sb(V) comparado con un espectro que incluía tolerancia en otras regiones (Figura 4C) y en todas las regiones se encontraron proporciones altas de cepas tolerantes a HePC (Figura 4D).



**Figura 4.13** Susceptibilidad de *L. panamensis* y *L. braziliensis* a Sb(V) y HePC por región geográfica.

Reducción de la infección a la concentración discriminatoria de Sb(V) (A y C) y HePC (B y D) para cepas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* precedentes de las regiones del Pacífico, Andes, Orinoquía y Amazonas. Las cepas de *L. panamensis* procedentes del oriente de la cordillera de los Andes (regiones de Orinoquía y Amazonas) se agruparon debido al bajo número de cepas. La clasificación cualitativa de la susceptibilidad se definió por el punto de corte (línea punteada) y el rango indeterminado (zona gris). K-W para *L. panamensis* y HePC,  $P = 0.0012$  y prueba de Dunn:  $P < 0.05$ . \*Comparado con las regiones de Orinoquía y Amazonas.

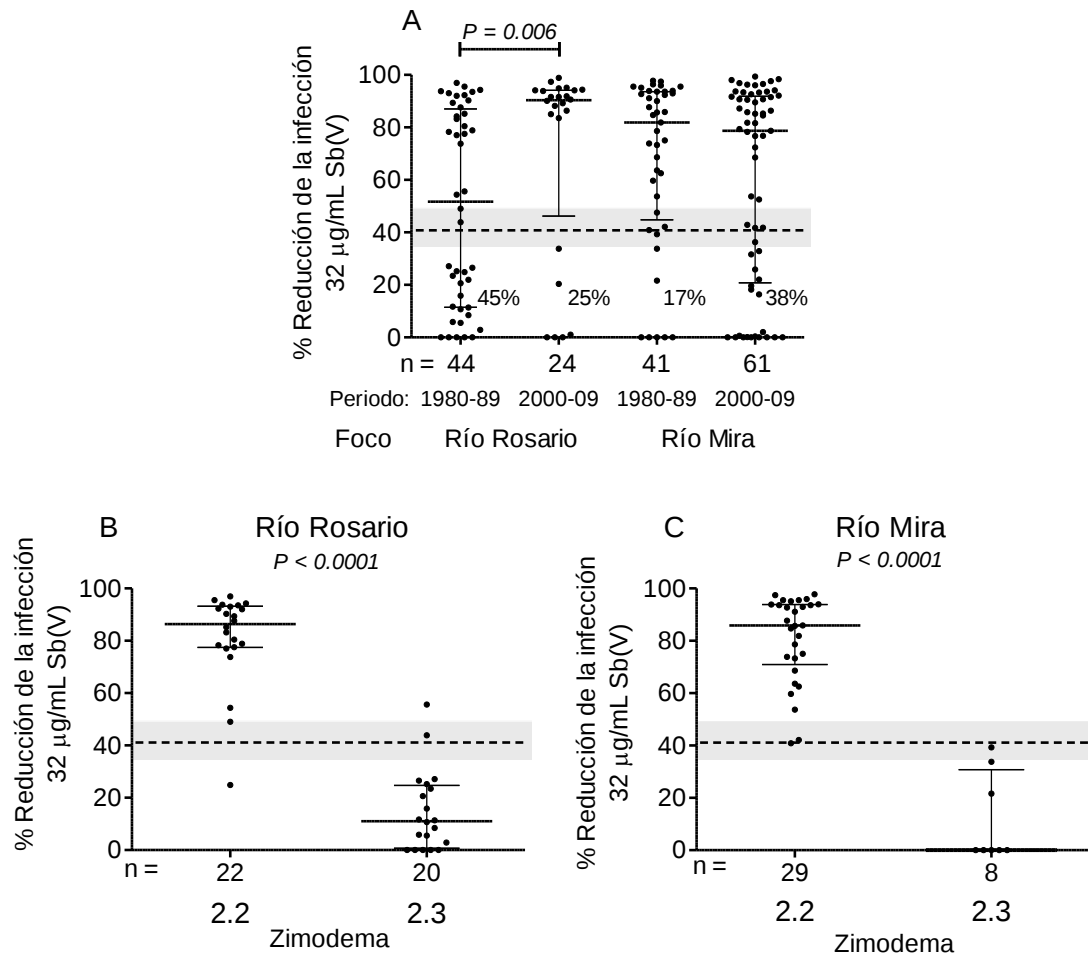


en la mediana y el rango intercuartílico, se distinguió el 25% de las cepas que tenían una alta reducción de la infección ( $> 87\%$ ), y otro 25% de las cepas que tenían una muy baja reducción de la infección ( $< 11\%$ ). Con estas poblaciones se investigó la relación de la susceptibilidad con variables del parásito y del hospedero.

***Las diferencias en la susceptibilidad de las cepas de *L. panamensis* en los focos endémicos de Tumaco se asociaron con los zimodemas y el genotipo del parásito.*** Muchas de las cepas de *L. panamensis* aisladas en Tumaco en la década 1980-89 fueron previamente clasificadas por análisis de isoenzimas como zimodemas 2.2 y 2.3, correspondientes a los perfiles isoenzimáticos de *L. panamensis* más comunes en la región suroccidental de Colombia [32]. El análisis de los zimodemas y la susceptibilidad a Sb(V) reveló una asociación significativa ( $P < 0.05$ ). La mayoría de las cepas tolerantes de los dos focos endémicos pertenecían al zimodema 2.3, mientras que las cepas sensibles pertenecían al zimodema 2.2 (Figura 6B y C). Las cepas del zimodema 2.3 fueron significativamente menos sensibles a Sb(V) que las cepas pertenecientes al zimodema 2.2 ( $P < 0.0001$ ). Estos resultados se corroboraron en 20 cepas aisladas en la década del 2000-2009 en los focos endémicos del Río Rosario y Río Mira y en 9 cepas aisladas de pacientes en Departamentos diferentes a Nariño dentro y fuera de la Región del Pacífico.

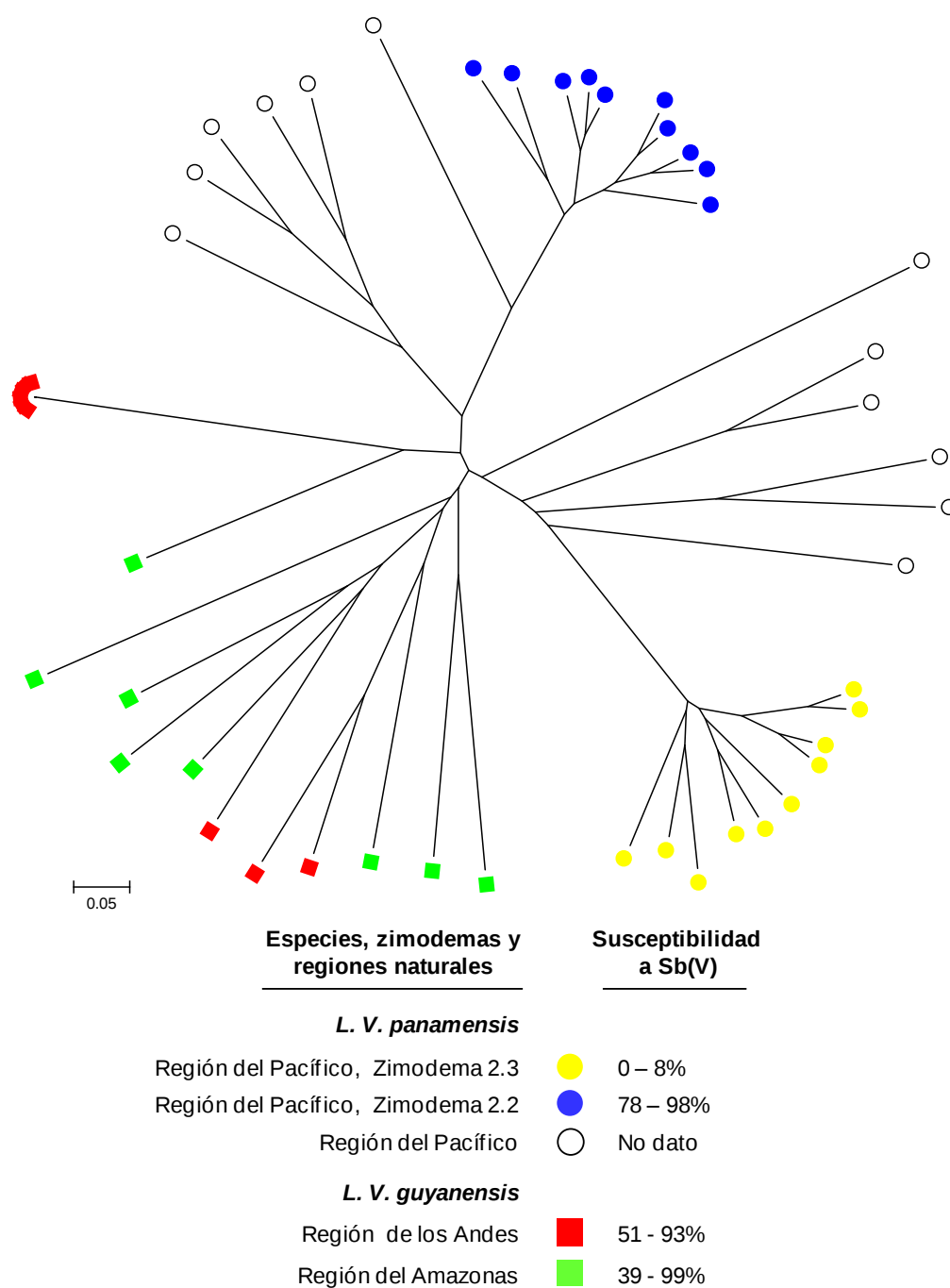
La tipificación multilocus de microsatélites - MLMT reveló la existencia de diversidad genética entre las cepas de *L. panamensis* evaluadas. Dos poblaciones con genotipos independientes coincidían con los zimodemas 2.2 y 2.3, y el fenotipo de susceptibilidad a Sb(V) (Figura 7). Las cepas de *L. guyanensis* fueron también diversas genéticamente dentro de las regiones del Amazonas y los Andes, sin embargo, 6 de las 9 cepas aisladas en Chaparral, Tolima tuvieron idéntico perfil MLMT (Figura 7), sugiriendo predominancia de un clon de poblaciones en este foco de transmisión. No hubo relación entre el genotipo MLMT

y la susceptibilidad a Sb(V) entre las cepas de *L. guyanensis*, pero fueron relativamente homogéneos en cuanto a la susceptibilidad, limitando la factibilidad de discernir una relación.



**Figura 6.15** Susceptibilidad de cepas de *L. panamensis* a Sb(V) y asociación con el zimodema de las sub-poblaciones circulantes en zonas endémicas de Tumaco.

Distribución y mediana de la susceptibilidad de cepas clínicas provenientes de los focos endémicos de los Ríos Rosario y Mira durante las décadas del 1980-1989 y 2000-2009 (A). Comparación de la susceptibilidad de cepas pertenecientes al zimodema 2.2 y 2.3 aislados en la década del 1980-1989 de los focos endémicos del Río Rosario y Río Mira (B y C). La clasificación cualitativa (fenotipo) de la susceptibilidad fue definida por el punto de corte (línea punteada) y el rango indeterminado (zona gris). La comparación entre grupos fue realizada con la prueba U de Mann-Whitney.

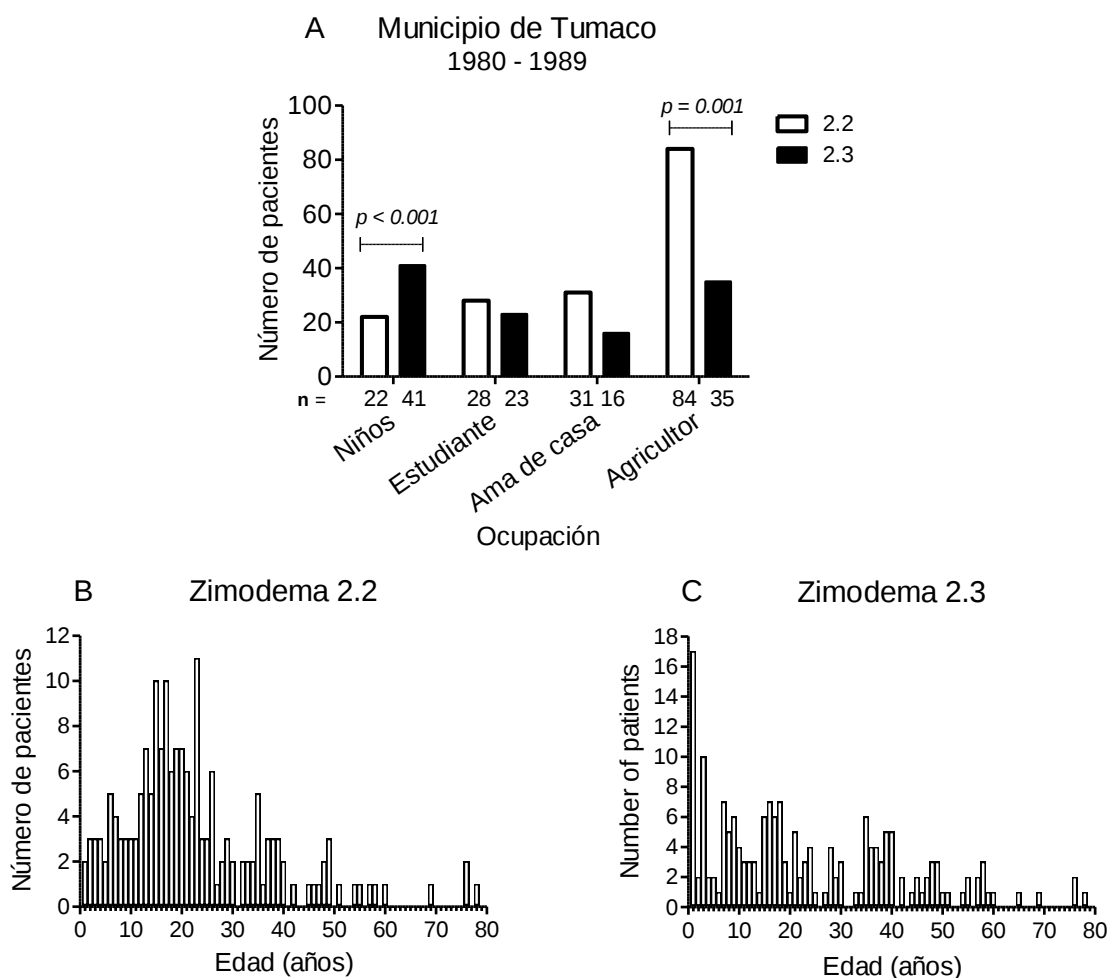


**Figura 7.16** Análisis de la diversidad genética de cepas de *L. panamensis* y *L. guyanensis*.

La relación entre la diversidad genética, el zimodema, la susceptibilidad a Sb(V) y la distribución geográfica fue evaluada con un dendrograma, generado a partir del cálculo de

distancias genéticas con los datos de microsatélites. Se incluyeron cepas de *L. panamensis* aisladas de pacientes del Municipio de Tumaco, Nariño pertenecientes a los zimodemas 2.3 (n=10) y 2.2 (n=10), cepas de *L. panamensis* de la Costa Pacífica sin identificación de zimodemas y cepas de *L. guyanensis* aisladas de pacientes de los Andes (n=9) y Amazonas (n=8). El rango de susceptibilidad a 32 µg/mL de Sb(V) es mostrado para los grupos genéticamente discriminados de cepas. ND\* No tienen zimodema determinado.

El análisis entre zimodemas y variables demográficas con base en la información recopilada previamente en CIDEIM en la década de los 80, mostró asociaciones con la edad y ocupación. Un número significativo de cepas aisladas de niños menores de 7 años de edad del municipio de Tumaco pertenecían al zimodema 2.3 (Figura 8A). En contraste, un número o proporción mayor de cepas aisladas de individuos involucrados en la actividad agrícola pertenecían al zimodema 2.2. La frecuencia de las distribuciones de las cepas por zimodemas y de acuerdo a la edad sugiere un perfil epidemiológico característico de la transmisión selvática para el zimodema 2.2 por su mayor frecuencia en la infección en adultos que trabajan en la agricultura y de transmisión doméstica para el perfil 2.3 por su asociación a la infección en niños menores de 7 años (Figura 8B y C).

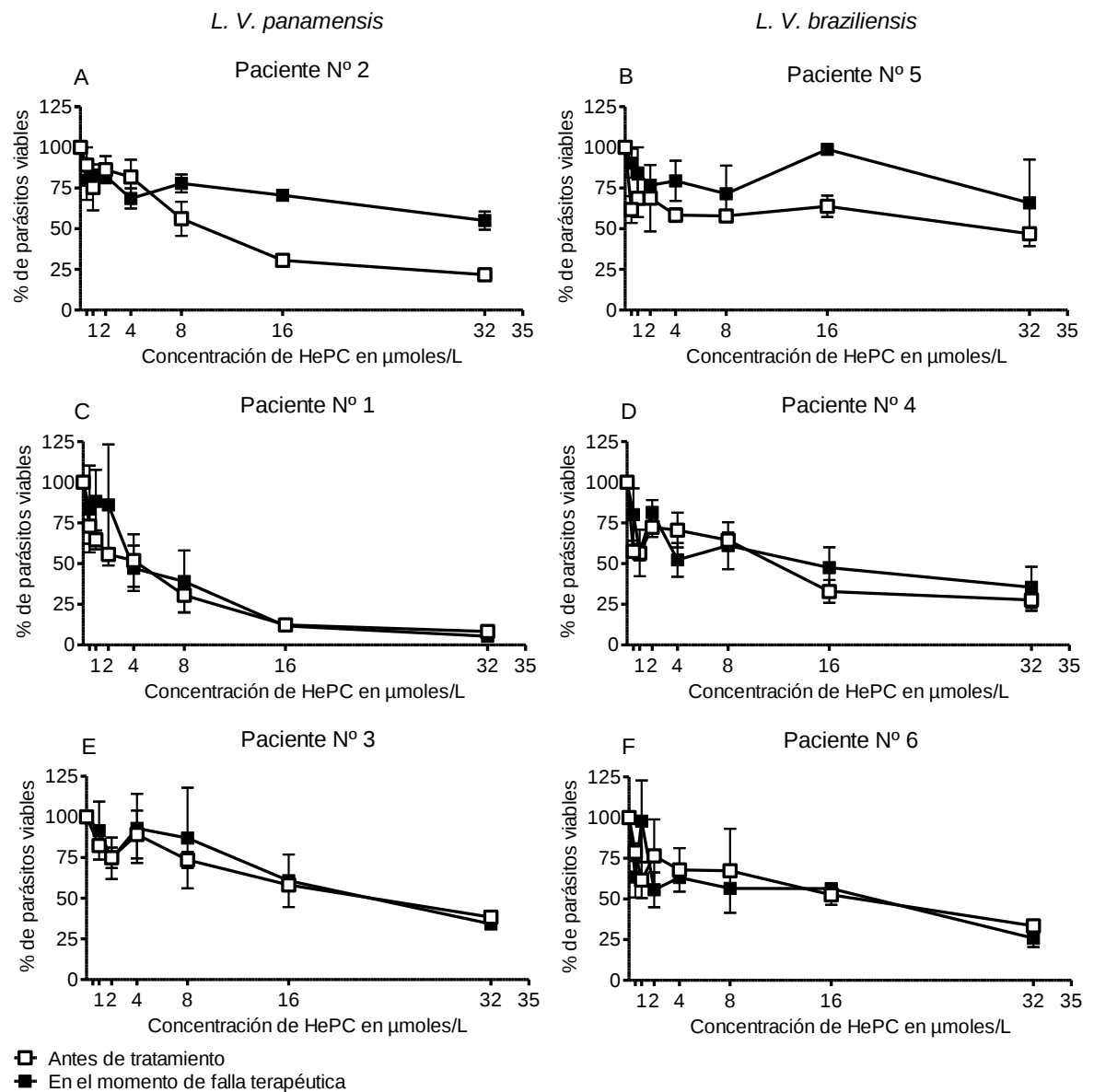


**Figura 8.17 Asociación entre de zimodema, edad y ocupación en el municipio de Tumaco.**

Los niños menores de 7 años se infectaron más frecuentemente con cepas de *L. panamensis* pertenecientes al zimodema 2.3, mientras que las personas que tenían como ocupación la agricultura se infectaron más frecuentemente con cepas del zimodema 2.2,  $n = 280$  (A), Asociación determinada mediante la prueba de Chi cuadrado,  $P < 0.05$ . Distribución de las cepas de *L. panamensis* pertenecientes al zimodema 2.2 ( $n = 181$ ) y 2.3 ( $n = 149$ ) de acuerdo a la edad del pacientes con LC del municipio de Tumaco en la década, 1980-1989 (B y C).

***El tratamiento con HePC selecciona cepas de L. Viannia tolerantes al fármaco contribuyendo con la falla terapéutica.*** El tratamiento con HePC conllevó a la emergencia de poblaciones de *L. panamensis* y *L. braziliensis* tolerantes al medicamento en dos de los seis pacientes cuyo tratamiento con HePC fracasó: un niño (paciente No. 2) y un adulto (paciente No. 5), respectivamente (Figura 9). La pérdida de susceptibilidad fue demostrada por un menor porcentaje de reducción de la infección en la cepa aislada en el momento de la falla terapéutica comparada con la cepa aislada antes del tratamiento. La reducción de la infección a la concentración discriminatoria de HePC de la cepa de *L. panamensis* del paciente No. 2 disminuyó de 67%, antes de tratamiento, a 31% en el momento de la falla terapéutica. De forma similar la cepa de *L. braziliensis* aislada del paciente No. 5 pasó de tener un % de reducción de la infección de 39% a no reducir la infección cuando se expuso a la concentración discriminatoria (Tabla 2).

El mayor valor de  $EC_{50}$  para HePC en las cepas aisladas en el momento de falla corrobora la disminución de la susceptibilidad comparado con las cepas aisladas antes de tratamiento (Tabla 2, Figura 9A y B). El  $EC_{50}$  en las cepas aisladas en el momento de falla terapéutica para los pacientes 2 y 5 estuvo por encima de 32  $\mu$ M de HePC, la concentración máxima que puede ser evaluada con la prueba de susceptibilidad en amastigotes intracelulares por su toxicidad en las células hospederas, y similar al perfil obtenido con la línea control resistente. El cambio del área bajo la curva fue significativo para las cepas del paciente No. 2 ( $P < 0.001$ ). Los otros cuatro pacientes no mostraron cambios en la susceptibilidad de las cepas aisladas antes y en el momento de falla al tratamiento (Tabla 2 y Figura 9C a F).

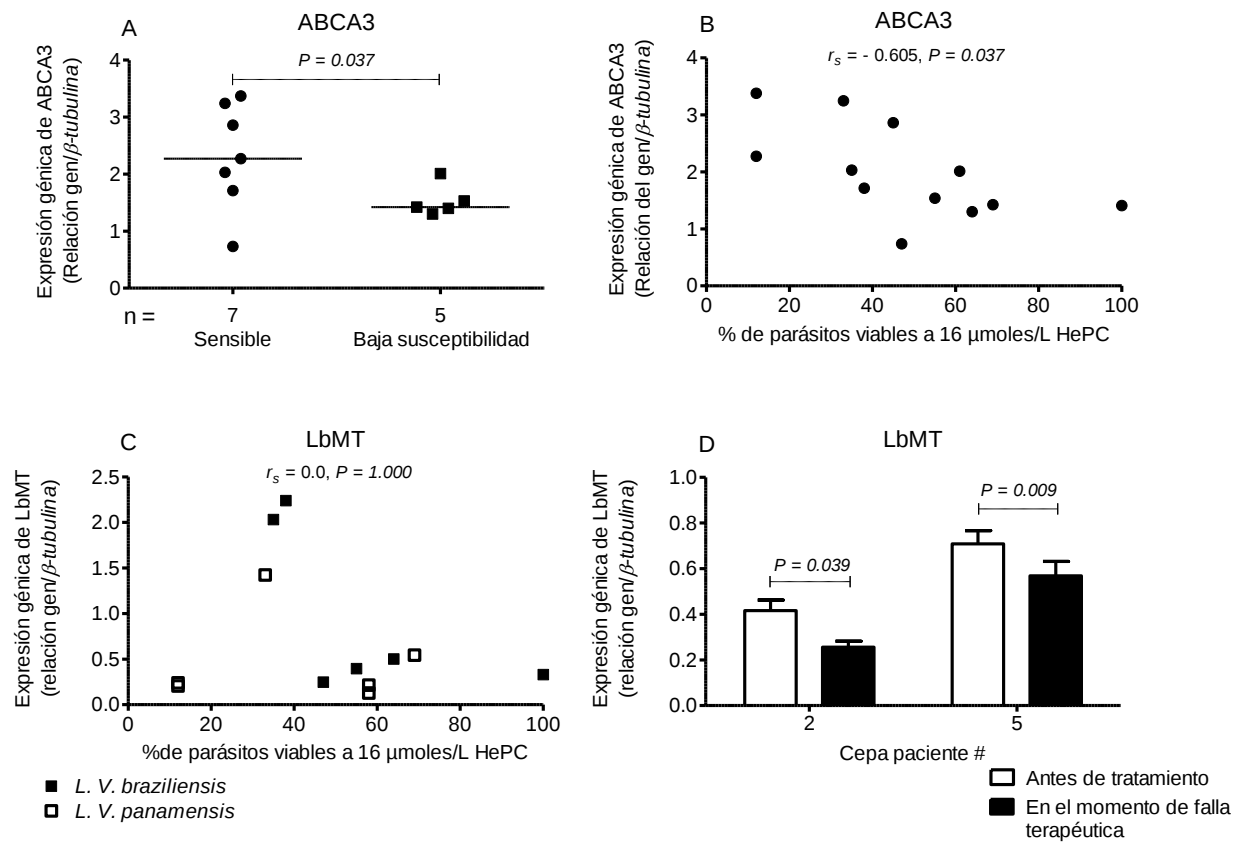


**Figura 9.18** Dosis respuesta de la susceptibilidad de cepas aisladas de pacientes antes de tratamiento y en el momento de falla terapéutica a HePC.

Susceptibilidad *in vitro* a HePC de los pares de cepas aisladas de los 6 pacientes que tuvieron falla terapéutica con HePC. La infección en los pacientes 2, 1 y 3 fue causada por *L. panamensis* (A, C y E) y la infección en los pacientes 5, 4 y 6 fue causada por *L. braziliensis* (B, D y F). Los resultados son presentados como el porcentaje de parásitos viables, determinados por microscopía, comparado con el control sin fármaco. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

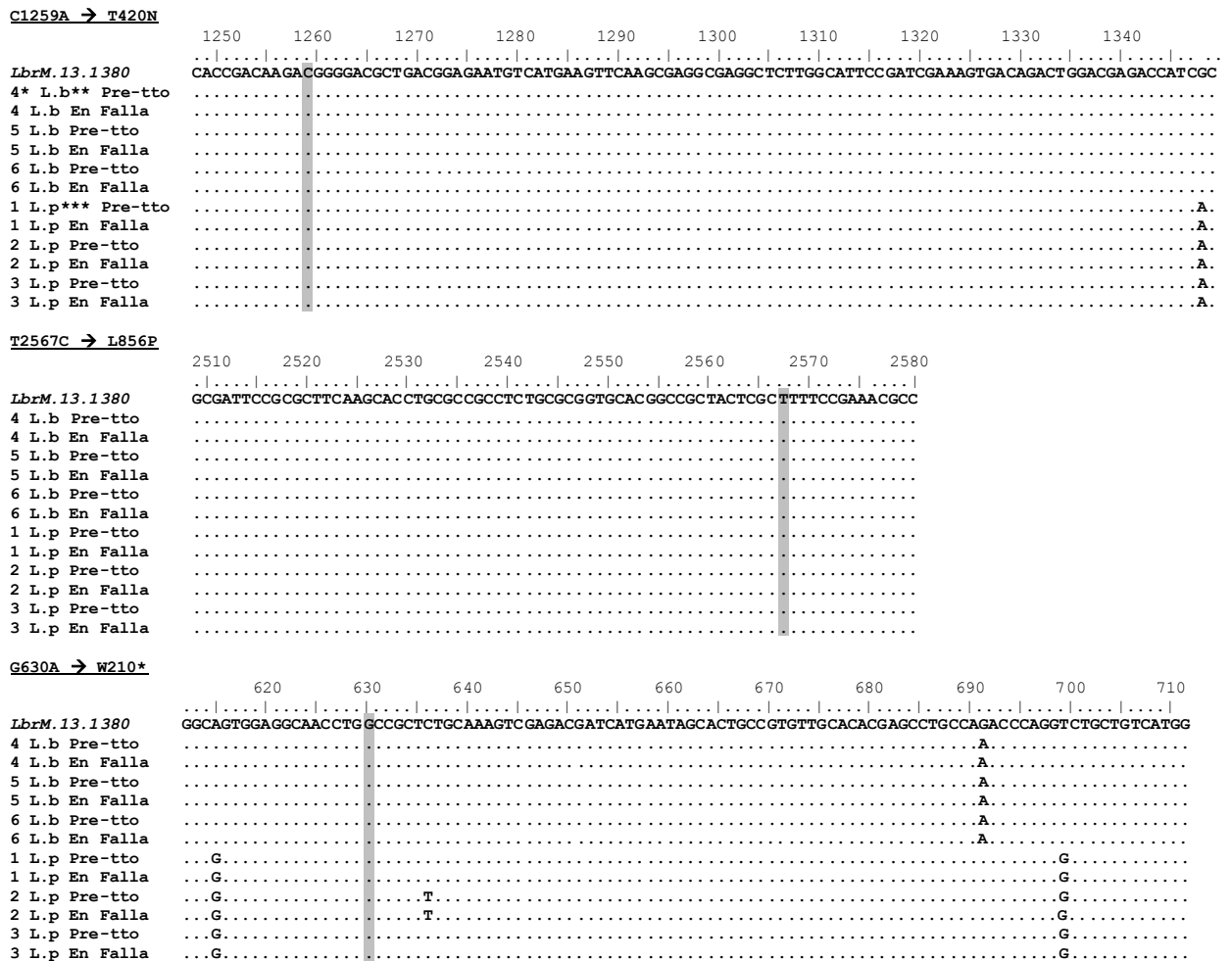
**La expresión génica de los transportadores *abca3* y *LbMT* presentan cambios relacionados con la susceptibilidad.** Las cepas sensibles a HePC presentaron una expresión significativa de *abca3* comparado con las cepas tolerantes ( $P = 0.037$ ) (Figura 10A). Se observó una correlación inversa significativa ( $P = 0.037$ ) entre la expresión de *abca3* y la supervivencia intracelular de los parásitos expuestos a la concentración discriminatoria (Figura 10B). En contraste la expresión de *abca2*, *abcg4*, *abcg6*, *abcc2* y *abcc3* no cambio con relación al perfil de susceptibilidad. La expresión génica del transportador *LbMT* no se correlacionó con el grado de susceptibilidad a HePC en las cepas clínicas aisladas de los 6 pacientes (Figura 10C). Sin embargo, se observó una disminución significativa de la expresión génica en las cepas que desarrollaron tolerancia a HePC después del tratamiento en los pacientes No. 2 y 5 (Figura 10D).

Los análisis de secuencias del gen *LbMT* en las posiciones 1259 y 2567, previamente reportadas por estar asociadas con la pérdida de función de *LbMT* [95] y la posición 630 analizada en cepas de *L. donovani* aisladas de pacientes con LV y PKDL quienes recayeron después de tratamiento con HePC [31], no mostraron relación entre estos SNPs y el fenotipo de susceptibilidad, ni variaciones genéticas entre las cepas aisladas antes de tratamiento y en falla terapéutica del mismo paciente (Figura 11). Curiosamente los SNPs A615G, G691A, T699G, y G1348A fueron especie específicos, diferenciando *L. panamensis* de *L. braziliensis*.



**Figura 10.19** Expresión génica de *abca3* y *LbMT* y susceptibilidad a HePC en cepas clínicas de *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

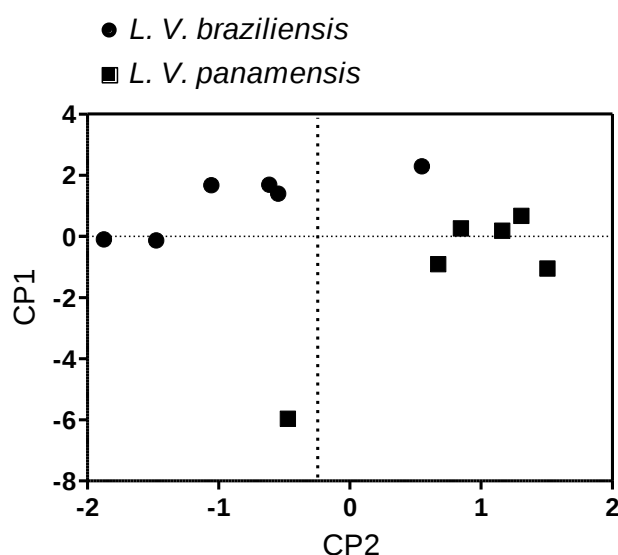
Comparación de la expresión génica del transportador *abca3* en cepas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* sensibles y tolerantes a HePC (A). Correlación de la expresión génica de *abca3* (B) y *LbMT* (C) con la susceptibilidad de las cepas clínicas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* a 16  $\mu$ M de HePC (n = 12). Los datos corresponden a tres experimentos independientes. Comparación de la expresión génica de *LbMT* en las cepas que presentaron disminución de la susceptibilidad en el momento de falla terapéutica. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes.



**Figura 11.20** Análisis de secuencias del gen *LbMT*.

Se secuenciaron los productos de PCR del gen *LbMT* de 6 pares de cepas (12 cepas) aisladas antes y en el momento de falla terapéutica. Se analizó la presencia de los SNPs G630A, C1259A y T2567C (sombreado) en relación con el fenotipo de susceptibilidad a HePC de cada cepa. \*Número asignados a cada paciente del cual se aisló las cepas. \*\**L. braziliensis*; \*\*\**L. panamensis*. Las secuencias fueron alineadas con la secuencia de la cepa de referencia de *L. braziliensis* LbrM.13.1380

El análisis de componentes principales (CP) distinguió los grupos de cepas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* en relación al componente 1 y 2 (Figura 12). La evaluación de las variables que contribuyeron a los diferentes componentes muestra que el CP1 comprometió los genes *abca2*, *abca3*, *abcc3*, *abcg4* y *abcg6*, mientras que el CP2 fue dominado por los genes *abcc2* y *LbMT*. Estos análisis revelaron altos niveles del CP2 y una tendencia de incremento de CP1 para *L. panamensis* comparado con *L. braziliensis*. El CP1 explicó un 61% de la variabilidad de la expresión genética y el PC2 un 17%.



**Figura 12.21** Análisis multivariado de componentes principales (CP) de la expresión de genes de transportadores en promastigotes de *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

Cada punto representa una cepa individual. CP1 refleja la expresión génica de los transportadores *abca2*, *abca3*, *abcc3*, *abcg4* y *abcg6*, y el CP2 refleja la expresión génica de *abcc2* y *LbMT*.

### Discusión

La respuesta clínica a Sb(V) y HePC observada en diversos contextos geográficos ha sugerido diferencias en la eficacia de acuerdo a la especie de *Leishmania* infectante. En el presente estudio se evidenciaron diferencias en la susceptibilidad a los dos principales medicamentos en uso entre las especies de *Leishmania*

prevalentes en Colombia. *L. guyanensis*, una especie característicamente selvática que sólo recientemente ha sido encontrada en el contexto de transmisión doméstica [140], fue consistentemente sensible a Sb(V) y HePC. *L. panamensis*, la especie de mayor prevalencia en Colombia [4,5,32] y frecuentemente transmitida a nivel doméstico [42], presentó tolerancia a cada uno de los dos fármacos en un 20% de las cepas. En el análisis cuantitativo de la susceptibilidad *L. braziliensis* fue la especie que mostró una menor reducción de la infección a la concentración discriminatoria de los dos fármacos, aunque en el análisis cualitativo tuvo una proporción de cepas similar a *L. panamensis* clasificadas como tolerantes a Sb(V). No obstante la reducción de la carga parasitaria fue significativamente menor con Sb(V) para esta especie que lo observado con *L. panamensis*. La susceptibilidad de *L. braziliensis* a HePC fue notablemente baja tanto en el análisis de la reducción de la carga parasitaria como en el porcentaje de cepas clasificadas como tolerantes (68%). Este último resultado concuerda con la baja respuesta clínica a HePC reportada en pacientes infectados con *L. braziliensis* en determinadas áreas geográficas y contextos ocupacionales [10,11].

En poblaciones expuestas por ocupación al ciclo de transmisión selvático de *L. braziliensis*, como el personal militar, y en regiones donde *L. braziliensis* es la causa predominante de LC, el riesgo de una respuesta terapéutica inadecuada con HePC puede ser mayor que en poblaciones expuestas a *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Sin embargo, HePC ha mostrado eficacia en casos de *L. braziliensis* en Bolivia y Brasil [17,18]. Como sucede con otros agentes antimicrobianos, la susceptibilidad no necesariamente predice la respuesta clínica individual [110,111,144], pero la frecuencia de riesgo de falla al tratamiento incrementa con la mayor tolerancia a los fármacos de los microorganismos circulantes. Considerando la naturaleza multifactorial de la cura clínica, la resolución de las lesiones puede ser alcanzada a pesar de la resistencia o tolerancia *in vitro* del microorganismo a los fármacos [145]. Además, como se demuestra en el presente estudio existen poblaciones de *L. braziliensis* sensibles a HePC, y no es preciso

concluir que esta especie, la cual es muy heterogénea y está distribuida ampliamente en Centro y Sur América, es tolerante a HePC. Variaciones en la susceptibilidad de diferentes poblaciones de la especie pueden explicar en parte porque en algunos estudios hechos en Colombia, Brasil y Bolivia reportan que la mayoría de pacientes con LC infectados por *L. braziliensis* responden al tratamiento con HePC [11,17,18]. No obstante, la alta frecuencia de cepas con tolerancia *in vitro* a HePC entre las cepas de *L. braziliensis* que circulan en Colombia remarca la importancia de un seguimiento sistemático del tratamiento y motiva la evaluación del uso de terapias combinadas que reduzcan el riesgo de falla terapéutica y la selección de poblaciones de parásitos resistentes.

El análisis de cepas clínicas de diferentes regiones reveló una mayor prevalencia de cepas tolerantes tanto para Sb(V) como para HePC entre las poblaciones de *Leishmania* provenientes del lado oriente de la cordillera de los Andes, lo que constituye una importante barrera natural geográfica. Aunque la proporción de las tres especies obtenidas de pacientes infectados al lado oriental u occidental de los Andes fue diferente, en general las cepas de *Leishmania* procedentes de la región del Pacífico y de los Andes fueron más sensibles a los dos fármacos que las cepas provenientes de la región de Orinoquía y Amazonas. Los resultados muestran que las cepas de *L. panamensis* aisladas de pacientes procedentes de Orinoquía y Amazonas fueron significativamente más tolerantes a HeCP que las cepas de esta especie provenientes de las regiones del Pacífico y Andes, planteando las preguntas: *¿las poblaciones de L. panamensis adquiridas por individuos expuestos por ocupación pueden haber derivado de un ciclo de transmisión que involucra parásitos intrínsecamente menos susceptibles?*, o alternativamente, *¿podría esta resistencia microbiológica revelar exposición al tratamiento con HePC?*

Soportado por la plausibilidad de que la exposición al fármaco puede contribuir a la pérdida de la susceptibilidad, la mayoría de las cepas de *L. panamensis* de

Orinoquía y Amazonas (79%) tolerantes a HePC fueron aisladas de personal uniformado (militares y policías) después del 2005, año de aprobación del uso HePC en Colombia. El análisis de zimodemas, microsatélites u otros marcadores moleculares de estas cepas podrían ayudar a revelar si diferentes poblaciones de *L. panamensis* transmitidas bajo circunstancias epidemiológicas y ecológicas de estas regiones contribuyen a las diferencias observadas en la susceptibilidad.

La tolerancia/resistencia puede ser debida un fenotipo primario o secundario, como se ha observado con Sb(V) [30]. En el caso de HePC, los resultados con cepas aisladas antes de tratamiento y en falla terapéutica del presente estudio muestran la existencia de tolerancia tanto primaria como adquirida. En uno de los casos, la resistencia emergió de la infección con una cepa sensible de *L. panamensis*, mientras que en el otro caso la tolerancia al fármaco incremento en una cepa de *L. braziliensis* con tolerancia primaria. Estos dos casos de pérdida de susceptibilidad a HePC proveen evidencia directa de que HePC administrada como monoterapia para la LC puede seleccionar parásitos resistentes y contribuir en la falla al tratamiento. En la India se reportó disminución de la eficacia clínica de HePC después de una década de uso no regulado y su impacto sobre la susceptibilidad [114]. Las cepas de *L. donovani* aisladas de pacientes con LC y PKDL quienes recayeron después del tratamiento con HePC fueron significativamente más tolerantes a HePC que las cepas pre-tratamiento [31]. El potencial selectivo del tratamiento con HePC en la LV fue también demostrado por un incremento en la tolerancia de cepas de *L. infantum* aisladas secuencialmente en recaídas de pacientes co-infectados con VIH quienes recibieron tratamiento de mantenimiento con HePC durante varios años [113]. La emergencia de poblaciones tolerantes/resistentes de *Leishmania* en diferentes circunstancias clínicas, epidemiológicas y geográficas resaltan la necesidad de adoptar medidas para proteger la vida útil de HePC y disminuir el impacto en las fallas terapéuticas.

Las diferencias farmacocinéticas asociadas a la edad, susceptibilidad del fármaco y condiciones clínicas concomitantes que alteran la respuesta inmune, evidentemente contribuyen a una respuesta clínica desfavorable al tratamiento con HePC. El paciente de 10 años de edad, de quien se aisló la cepa de *L. panamensis* con pérdida de susceptibilidad a HePC, no presentó evidencia clínica de inmunosupresión o co-morbilidades que pudieran afectar la respuesta al tratamiento. Sin embargo, análisis previos de farmacocinética de HePC reportados por Dorlo y colaboradores en el año 2012 muestran una disminución en la exposición a HePC asociada al tamaño del cuerpo cuando se dosifica el fármaco de acuerdo al peso del cuerpo como se usa en adultos [21]. Esto soportaría la factibilidad de que una baja exposición al fármaco promoviera la emergencia de parásitos tolerantes y en consecuencia la falla al tratamiento en este paciente. El paciente de 8 años de edad que presentó falla al tratamiento a pesar de tener una cepa sensible antes y en el momento de falla al tratamiento, tenía una lesión en la oreja, una parte de cuerpo reconocida por ser un reto terapéutico debido a las concentraciones de fármaco alcanzadas [146]. En los pacientes adultos se presentaron condiciones clínicas concomitantes como alteraciones de la función renal, inmunosupresión e hipertensión [147], lo que probablemente haya contribuido a la pobre respuesta clínica al tratamiento con HePC, independiente de la susceptibilidad de la cepa infectante. Por lo tanto, incluso cuando la resistencia emerge, es poco probable que sea la única causa de la falla al tratamiento. Los factores del hospedero que permiten sobrevivir y proliferar a los parásitos pueden promover el fracaso clínico y también la emergencia de poblaciones tolerantes o resistentes.

El análisis de cepas de *Leishmania* experimentalmente seleccionadas para resistencia a HePC muestran que diferencias en la expresión de transportadores del fármaco contribuyen a cambios en la susceptibilidad [95,96]. La reducida expresión del complejo translocasa LbMT/LbRos3 confiere resistencia a cepas de *L. braziliensis* a través de la disminución de su internalización [96]. Aunque para

este estudio la expresión génica de *LbMT* no fue correlacionada con la susceptibilidad primaria a HePC en las cepas clínicas de *L. panamensis* y *L. braziliensis*, la disminución de su expresión ocurrió en las cepas que presentaron pérdida de susceptibilidad. Esto sugiere que la exposición *in vivo* a HePC podría promover la selección de poblaciones de parásitos menos susceptibles que presentan una disminuida expresión de *LbMT*.

La expresión génica de los transportadores de lípidos ABCA reveló una correlación inversa entre *abca3* y la supervivencia intracelular del parásito por la exposición *in vitro* a HePC, sugiriendo la posibilidad de que el nivel de expresión de ABCA3 podría contribuir a variaciones intrínsecas en la susceptibilidad de cepas de *Leishmania* a HePC. De manera interesante, el transportador ABCA3 ha sido localizado en la membrana intracelular de una línea celular del epitelio alveolar humano donde promueve la acumulación y almacenamiento en vesículas de fosfatidilcolina [148]. Por lo tanto, la sobre-expresión de ABCA3 en *Leishmania* podría promover un incremento en la acumulación del fármaco a través del almacenamiento en vesículas intracelulares, contribuyendo al fenotipo de susceptibilidad al fármaco. No obstante, es necesaria la confirmación funcional de la participación y rol de ABCA3 en la acumulación del fármaco a nivel intracelular en el parásito y su relación con la mayor sensibilidad de las cepas clínicas a HePC.

Finalmente, el agrupamiento de las cepas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* a través del análisis de los componentes principales de expresión génica de transportadores sostiene un perfil de expresión relacionado a la especie para estos transportadores. La unión de todos estos resultados soporta la cooperación de múltiples y diferentes mecanismos entre los fenotipos de resistencia primaria y adquirida a HePC en cepas y especies de *Leishmania*.

Por otro lado, la evaluación de la susceptibilidad a Sb(V) en relación con el zimodema de cepas de *L. panamensis* aisladas durante la década de 1980- 1989 de pacientes procedentes de dos focos endémicos del municipio de Tumaco [32], mostró que las cepas con tolerancia al fármaco pertenecían al zimodema 2.3 y las cepas sensibles al zimodema 2.2. Estas diferencias fenotípicas fueron también distinguibles a nivel genético. Estos resultados y la confirmación de la asociación entre susceptibilidad y zimodema de cepas de *L. panamensis* provenientes de otras áreas de transmisión dentro y fuera de la región del Pacífico, y de cepas aisladas en la década del 2000-2009, proporcionan pruebas de la existencia marcadores intrínsecos asociados con susceptibilidad dentro de las subpoblaciones de esta especie. Aunque se desconoce si el polimorfismo isoenzimático o genético determinado por microsatélites está relacionado directamente con la susceptibilidad, proveen un potencial marcador para aplicaciones epidemiológicas o decisiones clínicas. El reconocimiento de estas poblaciones de parásitos también puede ser explorado para proporcionar información sobre los mecanismos involucrados y sus divergencias en la susceptibilidad a Sb(V), lo que podría ser relevante y útil para otras especies.

La asociación observada entre el zimodema de *Leishmania* con la ocupación y edad del paciente, como con la susceptibilidad en los focos endémicos del municipio de Tumaco sugiere la superposición de los ciclos de transmisión doméstico y selvático entre los habitantes de estas comunidades. Se plantea la hipótesis de que la transmisión doméstica podría ser un factor en la emergencia y diseminación de las poblaciones del zimodema 2.3 de *L. panamensis* en los focos endémicos del Río Rosario y Río Mira en Nariño durante las dos décadas estudiadas que abarcaron 30 años.

En conclusión y de acuerdo al objetivo propuesto, este estudio evidenció que existe un amplio rango de susceptibilidad a Sb(V) y HePC entre cepas de las especies de *Leishmania* (*Viannia*) más prevalentes en Colombia influenciado por

la especie de *Leishmania*, sub-poblaciones de una misma especie y la región geográfica. El estudio de emergencia de tolerancia/resistencia a Sb(V) a nivel poblacional de cepas de *L. panamensis* no mostró un incremento relacionado a los años de uso de Sb(V) como monoterapia. Los cambios observados en la susceptibilidad a lo largo de tres décadas de uso de Sb(V) se asociaron con la circulación de cepas de *L. panamensis* de los zimodemas 2.2 y 2.3. En el caso del estudio de emergencia de tolerancia/resistencia a HePC el estudio a nivel de individuos en una cohorte de 6 pacientes demostró que un ciclo de tratamiento con el esquema terapéutico actual de este medicamento puede seleccionar cepas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* resistentes que pueden contribuir con la falla al tratamiento.

### **Capítulo III. Determinación de la respuesta integrada parásito-hospedero a fármacos, inmunomoduladores y nuevas formulaciones**

#### **Introducción**

La respuesta clínica a los anti-leishmaniales involucra factores del hospedero [19]. No obstante, los métodos para evaluar la susceptibilidad y la respuesta *in vitro* a los fármacos están limitados a la valoración del efecto sobre el parásito intracelular, sin tener en cuenta otros factores del hospedero que naturalmente contribuyen en el control de la infección y que pueden mediar la actividad de los medicamentos. La respuesta inmune e inflamatoria inducida por la infección con especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, son fundamentales en la resolución clínica y patogénesis de la LC y mucosa [53,149,150] e influyen en la eficacia del tratamiento [19,151]. Estos resultados han motivado la exploración de estrategias terapéuticas para re-direccionar la respuesta inmune hacia la cura de la enfermedad. Por tanto, la evaluación *in vitro* de la respuesta concomitante o integrada del parásito y de factores del hospedero es crítica para tener una mejor aproximación y entendimiento de la respuesta al tratamiento.

Entre las estrategias para la optimización del tratamiento de la leishmaniasis se ha planteado el uso de inmunomoduladores en combinación con anti-leishmaniales y el desarrollo de nuevas formulaciones de los fármacos disponibles para incrementar su eficacia. Dada la relación entre la respuesta inmune pro-inflamatoria y la severidad de la LC ocasionada por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, diferentes inmunomoduladores están siendo estudiados para ser usados como terapias combinadas con fármacos anti-leishmaniales [152,153,154].

La pentoxifilina (PTX) es un inmunomodulador reconocido por su efecto anti-inflamatorio en el tratamiento de sepsis por bacterias Gram-negativas y enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso [155,156]. Este compuesto

ha sido usado en combinación con Sb(V) para incrementar la eficacia en el tratamiento de la LC y mucocutánea refractaria al tratamiento con Sb(V) [153,157,158]. La LMC es una presentación de la enfermedad asociada a una intensa respuesta inflamatoria; en estos reportes, la adición de PTX aumentó la tasa de curación y disminuyó los niveles plasmáticos de la citoquina inflamatoria  $\text{TNF}\alpha$  [153].

Los oligodeoxinucleótidos (ODN) que contienen secuencias de citosina-fosfodiéster-guanina (CpG) también han demostrado capacidad inmunomoduladora. Dependiendo de la secuencia, la respuesta inducida por CpG ODN ha mostrado ser de tipo Th1 o de células T reguladoras en modelos murinos y en los humanos [159,160,161,162]. Secuencias de CpG se han investigado en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer, alergias y asma [163,164]. La combinación de CpG con HePC se evaluó en el tratamiento de la LV experimental obteniendo como resultado eficacia con una reducida dosis y duración del tratamiento [152]. En este estudio, los niveles de citoquinas Th2 (IL-10 y  $\text{TGF}\beta$ ) fueron disminuidos significativamente y la expresión de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  y IL-12 incrementó en los hámsteres y ratones infectados con *L. donovani* que recibieron terapia combinada de CpG y HePC [152].

Además de la modulación de la respuesta inmune, la formulación de anti-leishmaniales en nanopartículas está siendo explorado como estrategia terapéutica para incrementar la potencia de los fármacos [165]. Las nanopartículas han sido propuestas como una estrategia prometedora como sistemas de transporte y liberación de medicamentos en el sitio específico de acción [166]. Dada su estructura molecular, estos sistemas de transporte pueden ser usados tanto para fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos [167]. El tamaño, forma y las propiedades de la superficie de las nanopartículas favorecen la fagocitosis y su concentración en el macrófago [168], la principal célula hospedera de *Leishmania* spp. Esta acumulación en el sitio de acción puede favorecer la potencia de los

anti-leishmaniales. La factibilidad de una terapia combinada con inmunomoduladores y formulada en nanopartículas es una alternativa prometedora tanto para el tratamiento sistémico como tópico de la LC.

En el presente estudio se desarrolló una estrategia de infección *ex vivo* con una línea transfectada de *L. panamensis* usando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con leishmaniasis que permite una mejor aproximación al entendimiento de la respuesta integrada del parásito (susceptibilidad) y del hospedero (respuesta inmune) frente a la actividad de los anti-leishmaniales convencionales y nuevas opciones terapéuticas. La inclusión de componentes de la respuesta inmune en la evaluación de la potencia de los fármacos aporta información relevante a la respuesta clínica que contribuye a entender la relación entre susceptibilidad y respuesta al tratamiento.

## **Materiales y Métodos**

### **Diseño del estudio**

Se desarrolló un estudio experimental analítico para evaluar de forma concomitante la respuesta inmune (secreción de citoquinas) y la susceptibilidad del parásito frente a Sb(V), HePC y nuevas estrategias terapéuticas usando un modelo de infección *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con LC aguda. El cultivo de CMSP humanos ha sido ampliamente usado como modelo *ex vivo* de la respuesta inmune mediada por células. Éste cultivo además de linfocitos T, B y células asesinas naturales (Natural Killers), contiene monocitos que pueden ser infectados con *Leishmania*. La presencia de macrófagos diferenciados de monocitos fue usada para desarrollar un modelo de infección en cultivos de células mononucleares con cepas de *Leishmania* transfectadas con el gen de la luciferasa. Para este fin se determinaron las condiciones del cultivo, periodos de exposición y concentración de los anti-leishmaniales que permitieran la evaluación concomitante de la viabilidad del parásito y la secreción de citoquinas de la respuesta de células Th1

y Th2: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-13 e IL-10, inducidas por la infección con *Leishmania* en CMSP de pacientes. El modelo *ex vivo* usando CMSP permitió evaluar la actividad de los anti-leishmaniales [Sb(V) y HePC] solos o en combinación con compuestos inmunomoduladores (PTX y CpG ODN 2006) y novedosas formulaciones de HePC en nanopartículas.

### **Población de estudio**

Se obtuvieron muestras de sangre de 27 pacientes con diagnóstico parasitológico de LC reclutados en CIDEIM - Cali y en la sede de Tumaco, entre los años 2010 y 2015. Los pacientes incluidos fueron hombres y mujeres entre 18 y 60 años con tiempos de evolución de la enfermedad menor a 5 meses (media de 2.6 meses) y provenientes de la región del Pacífico. Para todos los pacientes la muestra de sangre se tomó antes de iniciar el tratamiento. Los parásitos aislados de los participantes fueron principalmente *L. panamensis* (23/24, 96%), uno de los pacientes fue infectado con una cepa de *L. braziliensis*. En tres de los pacientes no se logró aislar el parásito en cultivo, a pesar que se pudo observar en el frotis de la lesión. Todos los pacientes fueron seronegativos para VIH-1/VIH-2 (prueba rápida Alere Determine™ VIH-1/2 Ag/Ab). La confirmación parasitológica de leishmaniasis fue basada en la detección de amastigotes intracelulares en los frotis de lesión y/o aislamiento e identificación de *Leishmania* en cultivo de fluido aspirado del tejido de las lesiones. Los ensayos de toxicidad se desarrollaron en CMSP de 13 donantes de sanos obtenidos de capas leucocitarias provenientes del Hemocentro del Hospital Universitario de Valle.

El presente estudio fue aprobado y monitoreado por el Comité Institucional de Ética Humana de CIDEIM para la inclusión de sujetos humanos de acuerdo a las guías nacionales e internacionales de Buenas Prácticas Clínicas. Todos los voluntarios incluidos firmaron el consentimiento informado autorizando la toma de muestra de sangre y la prueba de VIH. La obtención de muestras para VIH siguió las recomendaciones de la normatividad nacional, en cuanto a consejería pre y

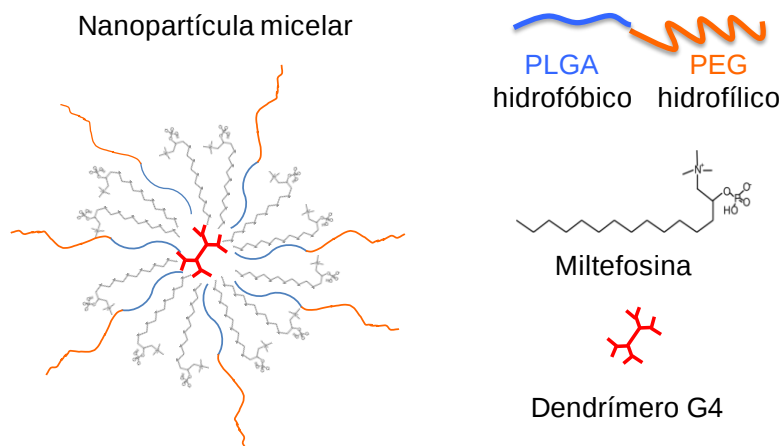
post y la firma de un documento de consentimiento informado independiente al del estudio.

### **Fármacos anti-leishmaniales, compuestos inmunomoduladores y formulaciones de miltefosina en nanopartículas**

La PTX (P1784; Sigma-Aldrich, Corp in Saint Louis, MO, USA) fue preparada a 10 mM y el CpG ODN 2006 (abreviado en adelante como CpG) (tlrl-2006; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) fue preparado a 500  $\mu$ M. Ambos inmunomoduladores se disolvieron en agua estéril, se filtraron con membranas de 0.22  $\mu$ m (MS® MCE Syringe filters; Membrane Solutions) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. La descripción de los anti-leishmaniales esta consignada en la metodología del capítulo I. Los fármacos fueron ajustados a la concentración requerida para cada experimento mediante dilución en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Corp in Saint Louis, MO, USA) con 10% de SFB (medio completo).

Las formulaciones de HePC en nanopartículas (NPs) se desarrollaron y caracterizaron por el grupo de investigación del Dr. Tarek Fahmy de la Escuela de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Yale en Estados Unidos. Se diseñaron NPs micelares compuestas por co-polímeros de ácido láctico y glicólico (PLGA) (50:50, iv. 55-75 dL/g, Durect Corporation) conjugado a polietilenglicol (PEG) (JenKem Technology USA) y dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM, Sigma-Aldrich, Corp in Saint Louis, MO, USA) de cuarta generación 4 (G4) (Figura 1). Las nanopartículas se prepararon por nanoprecipitación [169,170] disolviendo diferentes proporciones del HePC en una cantidad fija del polímero de PLGA-PEG y del dendrímero. Las características físicas como potencial zeta y diámetro hidrodinámico se evaluaron en todas las formulaciones. La concentración de HePC en las NPs se determinó usando el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) desarrollado por el Dr. Tomas Dorlo y colaboradores [171]. Las NPs sin el fármaco

se usaron como control. Las características de las formulaciones de HePC se describen en la Tabla 1.



**Figura 1.22** Esquema de la formulación de miltefosina en las nanopartículas micelares.

Las nanopartículas micelares son hidrofílicas en la superficie y encapsulan el fármaco y el dendrímico G4, en el caso de las NPs M5 y M6. La NP M3 no encapsula el dendrímico G4. Figura diseñada por Alyssa L. Siefert, quien desarrollo las formulaciones como parte de su proyecto de tesis de doctorado en la Universidad de Yale.

**Tabla 1.6 Características de las nanopartículas micelares.**

| Nombre de la NP micelar | Proporción de HePC:PLGA-PEG-G4                | Diámetro (nm) | Potencial zeta (mV) | μM de HePC | mg/mL de NP |
|-------------------------|-----------------------------------------------|---------------|---------------------|------------|-------------|
| M3                      | 0.125:1 sin G4                                | 204           | -17,7               | 735        | 1           |
| M5                      | 5:1 encapsulando G4                           | 39            | -18,8               | 690        | 1           |
| M6                      | 2.5:1 encapsulando G4                         | 33            | -23,1               | 374        | 1           |
| E1                      | Micela sin fármaco (PLGA:PEG-sin G4)          | 114           | -34                 | 0          | 1           |
| E2                      | Micela sin fármaco (PLGA:PEG encapsulando G4) | 49            | -26,1               | 0          | 1           |

Nota: las nanopartículas fueron suspendidas en agua esteril mas 10% de DMSO

### **Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

Se tomaron muestras de 100 mL de sangre a pacientes con LC aguda confirmada parasitológicamente antes de recibir tratamiento. Las células de donantes sanos se obtuvieron del Hemocentro como capas leucocitarias a partir de las cuales se aislaron las células mononucleares. Las CMSP fueron separadas usando la solución de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Corp in Saint Louis, MO, USA) y siguiendo las instrucciones del producto. Las células fueron congeladas en 90% de SFB más 10% de DMSO y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su uso. Previo a cada experimento las células fueron descongeladas a 37°C y las CMSP con una viabilidad  $\geq 90\%$  se usaron en los experimentos [172].

### **Ensayos de citotoxicidad de los fármacos**

Se desarrollaron ensayos para evaluar la toxicidad de los compuestos usando CMSP de donantes sanos a una concentración de  $2 \times 10^6$  c/mL distribuidos en un volumen final de 200 μL en placas de 96 pozos. Las nanopartículas fueron evaluadas en CMSP infectadas y no infectadas para identificar diferencias en la toxicidad. Las concentraciones evaluadas de los compuestos fueron: Sb(V): 4, 8, 16, 32 y 64 μg/mL, HePC: 2, 4, 8, 16 y 32 μM, PTX: 300 μM, CpG: 10 μM. Las concentraciones de HePC evaluadas en las NPs se ajustaron a la concentración

en  $\mu\text{g/mL}$  de la NP completa. Las concentraciones de HePC en las formulaciones estuvieron entre: 4.6 y 92  $\mu\text{M}$  para M3, 2.1 y 34  $\mu\text{M}$  para M5 y entre 2.4 y 47  $\mu\text{M}$  para M6. La viabilidad de las células se determinó mediante la actividad de la fosfatasa ácida después de 96 h de exposición a los medicamentos y 120 h de exposición a los compuestos inmunomoduladores a 34°C y 5% de  $\text{CO}_2$  [127].

### **Estandarización de la infección de células mononucleares para la detección de la carga parasitaria y la secreción de citoquinas**

Para todos los experimentos las CMSP se cultivaron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/mL. Las células se descongelaron y re-suspendieron en medio RPMI completo y ajustadas a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/mL. La suspensión de células se dispensó de a 100  $\mu\text{L}$  ( $4 \times 10^5$  células/pozo) en placas de 96 pozos y las células se cultivaron por 2 h a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  para iniciar el proceso de adherencia. La infección se realizó con la línea de *L. panamensis* transfectada con el gen la luciferasa (MHOM/COL/03/3594/LUC001) [120] adicionando 100  $\mu\text{L}$  de promastigotes en fase estacionaria diluidos en RPMI completo. Los promastigotes fueron previamente opsonizados por 1 h a 34°C con suero AB humano inactivado por calor [30]. Se evaluaron dosis infectivas de 10:1 y 20:1 parásitos:monocito y el cultivo de células y promastigotes se incubó por 24 h a 34°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . La carga parasitaria y la secreción de las citoquinas  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-13 e IL-10 se evaluó después de 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación a 34°C, 5% de  $\text{CO}_2$ .

Para la estandarización de la dosis infectiva en CMSP se estimó una concentración de 10% de monocitos del total del células mononucleares para todas las muestras [173]. Para evaluar y confirmar la infección de los macrófagos en el cultivo de CMSP, la carga parasitaria del total de CMSP se comparó con la carga de parásitos en las células adheridas sin linfocitos, usando una infección de 10:1 parásito:monocito. Ésta dosis infectiva se seleccionó porque a pesar que la carga parasitaria fue menor comparada con la dosis de 20 parásitos, la secreción

de citoquinas se detectó con una sensibilidad similar a la dosis infectiva de 20 parásitos por célula. La lectura de la infección por luminometría se hizo en paralelo en CMSP totales y en los macrófagos infectados después de remover por lavados las células no adheridas y los parásitos extracelulares a las 72 h de infección. La internalización de los parásitos se confirmó por microscopía. Cada condición fue evaluada por triplicado.

### **Ensayos de dosis respuesta y cinética de los anti-leishmaniales**

Se desarrollaron ensayos de dosis respuesta y cinética de Sb(V) y HePC para determinar el efecto en la carga parasitaria, en la secreción de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-13 e IL-10 y la relación entre estos parámetros. Los anti-leishmaniales se adicionaron a las 24 h después de la exposición de las CMSP con *L. panamensis*. Las concentraciones evaluadas de los fármacos fueron 4, 8, 16, 32 y 64  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V), y 2, 4, 8, 16 y 32  $\mu\text{M}$  de HePC. Este rango permitió determinar la concentración del fármaco que redujo la carga parasitaria en aproximadamente un 80% sin eliminarla, comparado con el control sin fármaco. De esta manera se pudo determinar en terapias combinadas el efecto del inmunomodulador en la carga parasitaria. Los ensayos de cinética se evaluaron a las 24, 48, 72 y 96 h después de adicionar las concentraciones de los fármacos que reducían la infección en un 80% [4  $\mu\text{M}$  de HePC y 8  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V)]. Las células infectadas y expuestas a los fármacos se incubaron a 34°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **Evaluación de la respuesta a anti-leishmaniales combinados con inmunomoduladores o formulado en nanopartículas**

La respuesta a los anti-leishmaniales, inmunomoduladores y nanopartículas se evaluó en CMSP de pacientes con LC aguda expuestos a una dosis infectiva de 10:1 parásito:monocito. Un rango de concentraciones de PTX y CpG se evaluaron solas o en combinación con 4  $\mu\text{M}$  de HePC o 8  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V). Los inmunomoduladores se adicionaron concomitantemente con los promastigotes al momento de la infección a las concentraciones de 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  PTX y 2.5, 5,

10  $\mu$ M de CpG; los anti-leishmaniales y las NPs se adicionaron 24 h después de la infección. Los rangos de concentraciones de los inmunomoduladores se basaron en experimentos preliminares donde se evaluó el efecto de PTX en la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  y previos estudios de CpG en la respuesta inmune de CMSP humanas [174,175]. Para las NPs se escogieron dos concentraciones de HePC de cada formulación (M3, M5 y M6). Una de las concentraciones fue 4  $\mu$ M de HePC para todas las NPs con el fin de comparar la potencia con el fármaco sólo, y la otra concentración correspondió a la máxima concentración no toxica de cada NP con el fin de evaluar la respuesta de citoquinas a concentraciones altas de las formulaciones. Como control se evaluó el fármaco sólo y las nanopartículas sin fármaco (E1 y E2) a las concentraciones correspondientes de las formulaciones con HePC. La carga parasitaria y la secreción de las citoquinas  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  e IL-10 se evaluaron a las 120 h de cultivo y 96 h después de adicionar los anti-leishmaniales.

#### **Determinación de la carga parasitaria y cuantificación de citoquinas**

Las placas de 96 pozos que contenían los cultivos de CMSP se centrifugaron a 1097Xg por 10 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La infección se cuantificó mediante la actividad de la luciferasa usando luminometría (Chameleon V MultilabelMicroplater Reader; Hidex, Finland) como se ha descrito previamente [176]. La concordancia entre la luminometría y la lectura de la carga de parásitos ha sido demostrada previamente en la evaluación de la susceptibilidad a Sb(V) y HePC [121,124]. Las citoquinas se evaluaron en el sobrenadante de los cultivos por ELISA [177] o Luminex (Luminex Screening Assay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Los ensayos con Luminex se desarrollaron usando 50  $\mu$ L de sobrenadante en duplicado de acuerdo a las especificaciones del kit.

## Métodos estadísticos

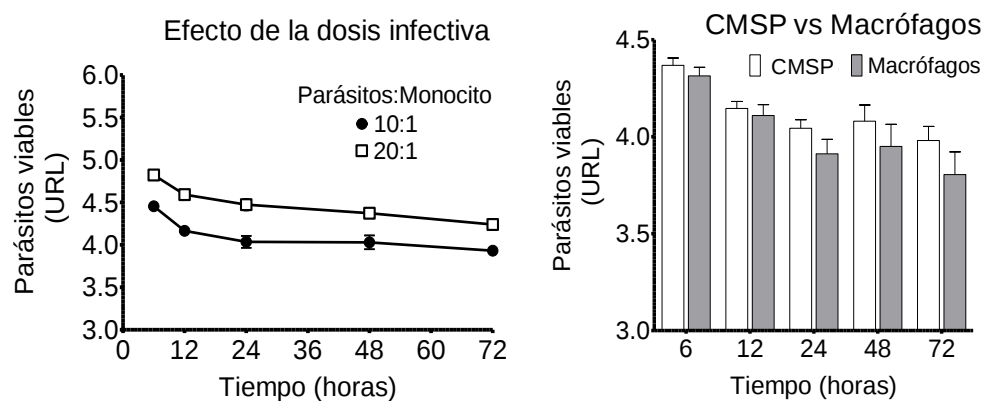
El tamaño de muestra en los diferentes análisis se definió por conveniencia y basado en previos estudios de la respuesta inmune en CMSP de pacientes con LC, en donde se obtuvieron diferencias significativas en la secreción de citoquinas [178]. La prueba de Anova o Kruskal-Wallis se usaron para establecer diferencias significativas entre grupos de acuerdo a la distribución de los datos. Las pruebas Dunnett o Dunn se desarrollaron para comparar cada grupo con el grupo control. Los análisis se realizaron usando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos.

## Resultados

***Las respuestas inmune y del parásito en ausencia de fármacos fueron evaluables en el modelo ex vivo de células mononucleares.*** La carga parasitaria fue proporcional a la dosis infectiva del parásito y medible hasta las 72 h evaluadas después de la infección (Figura 2A). Se detectó una alta carga parasitaria a las 6 h post-infección (dosis infectiva de 10: 29566 URL; dosis infectiva de 20: 70537 URL) la cual decreció marcadamente hasta las 24 h post-infección (dosis infectiva de 10: 11705 URL; dosis infectiva de 20: 32054 URL) y después fue relativamente constante hasta las 72 h (Figura 2A). No se observaron diferencias significativas en la carga parasitaria total en el cultivo de CMSP comparado con los macrófagos a los que se les retiraron los linfocitos y parásitos extracelulares en el momento de la lectura de la infección a las 72 h (Figura 2A). Este resultado y la verificación microscópica de parásitos intracelulares confirmaron la infección de los macrófagos. La producción de las citoquinas  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-13 e IL-10, observadas en el espectro de la infección con *L. (Viannia)* se indujeron y detectaron bajo las condiciones experimentales del modelo ex vivo y se midieron concomitantemente con la carga de infección. La cinética de la producción individual de estas citoquinas varió:  $\text{TNF}\alpha$  se secretó temprano después de la infección mientras que las otras citoquinas (IL-10, IL-13,  $\text{IFN}\gamma$ ) fueron detectables entre las 24 y 48 h después de la infección (Figura 2B). A

diferencia de la carga parasitaria, la expresión de citoquinas no fue proporcional a la dosis infectiva, alcanzándose concentraciones similares de citoquinas para las dos dosis infectivas.

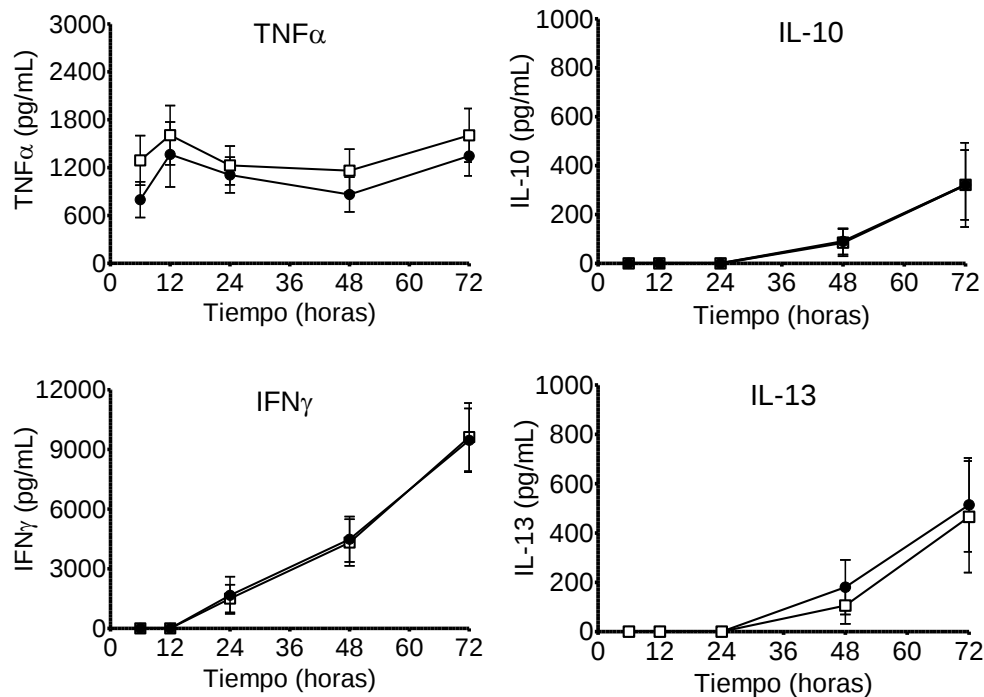
#### A Cinética de la infección



#### B Cinética de la secreción de citoquinas

Parásitos:Monocito

● 10:1 □ 20:1

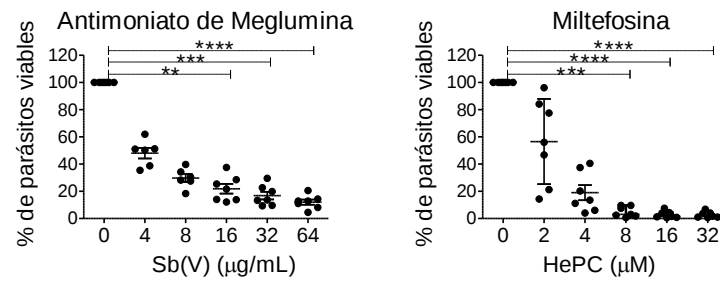


**Figura 2.23** Cinética de la respuesta inmune y de la infección en ausencia de fármacos.

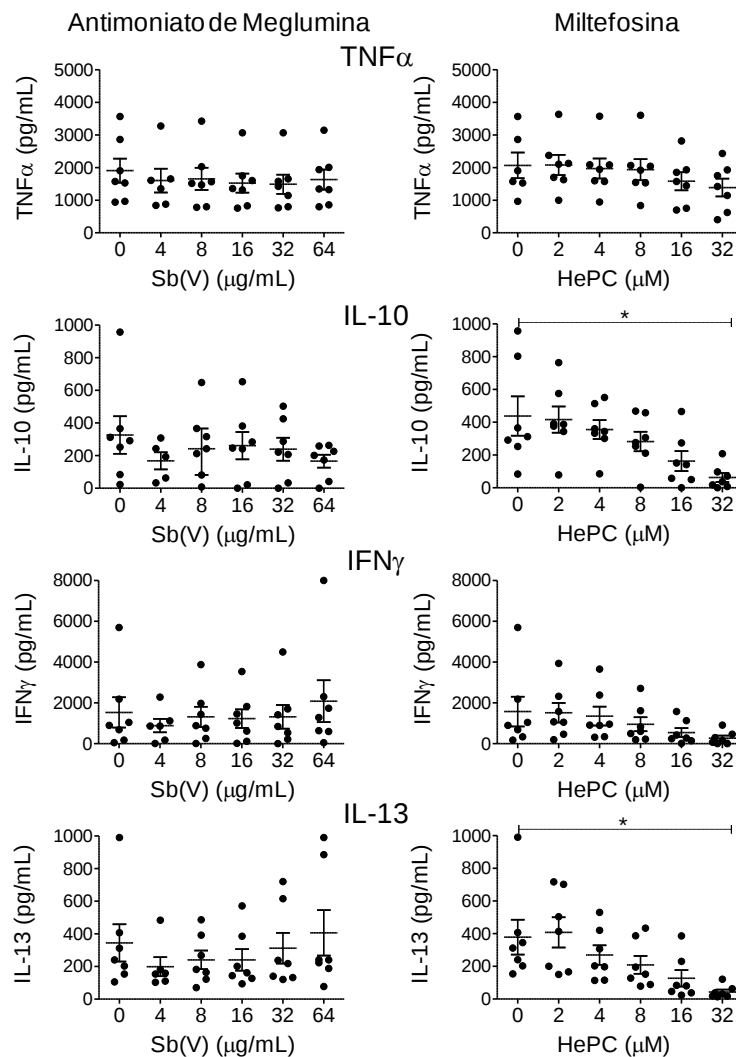
Se evaluó la cinética de la infección usando las dosis infectivas de 10:1 y 20:1 parásitos:monocito (A, panel izquierdo), y la carga parasitaria en CMSP vs macrófagos solos (A, panel derecho) a una dosis infectiva de 10:1. La supervivencia de los parásitos es expresada por la actividad de la luciferasa como unidades relativas de luz (URL). En forma concomitante se evaluó la cinética de la secreción de citoquinas ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-10, IL-13,  $\text{IFN}\gamma$ ) inducidas por la infección hasta las 72 h. Los datos son basados en experimentos hechos con CMSP de al menos 4 pacientes y expresados como la media  $\pm$  SEM.

***El modelo ex vivo permitió detectar la actividad anti-leishmanial de Sb(V) y HePC y la secreción de citoquinas.*** Los anti-leishmaniales Sb(V) y HePC redujeron la carga parasitaria de manera concentración dependiente alcanzando diferencias significativas a las mayores concentraciones de los fármacos comparado con el control de infección sin tratamiento (Figura 3A). La respuesta parasitológica se basó en el porcentaje de reducción de la señal (URL) comparado con el control de células sin infectar de cada donante, controlándose la variación en la carga parasitaria entre las células de donantes. HePC suprimió la secreción de IL-10 e IL-13 de manera dosis dependiente, con una disminución significativa a 32  $\mu\text{M}$  del fármaco comparado con el control (Figura 3B). En contraste no hubo efecto significativo en la secreción de  $\text{IFN}\gamma$  o  $\text{TNF}\alpha$  en el rango de concentraciones evaluadas para HePC. Notablemente, el Sb(V) indujo una reducción significativa de la carga parasitaria entre 16 y 64  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V) pero no alteró de forma significativa la secreción de las citoquinas evaluadas (Figura 3B). Con base en estos resultados se seleccionaron las concentraciones de los anti-leishmaniales para ser evaluadas en combinación con los inumonuladores PTX y CpG. Las concentraciones evaluadas de Sb(V) y HePC en el ensayo de dosis respuesta no fueron tóxicas en CMSP de donantes sanos.

### A Carga parasitaria



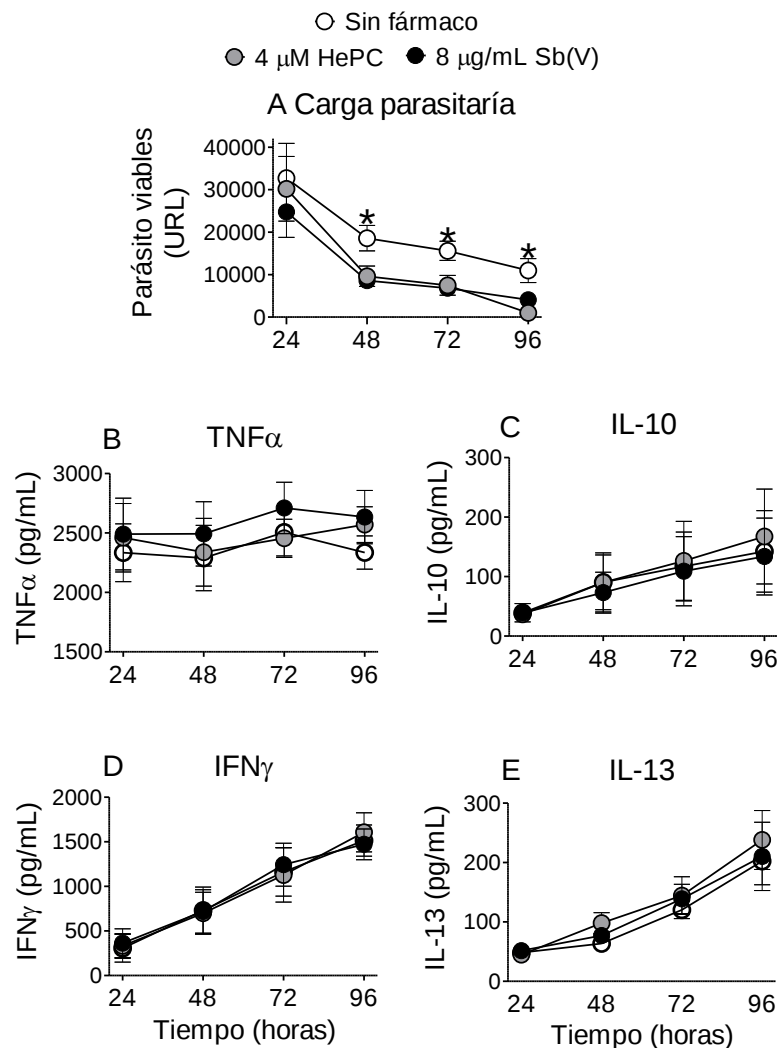
### B Secreción citoquinas



**Figura 3.24** Dosis respuesta de Sb(V) y HePC en la supervivencia del parásito y en la secreción de citoquinas.

La viabilidad del parásito (A) y la secreción de citoquinas (B) fueron evaluadas después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de Sb(V) y HePC. Las citoquinas fueron evaluadas en el sobrenadante de los cultivos de CMSP expuestas a la infección con promastigotes de *L. panamensis* tranfectados con el gen de la luciferasa. Los datos se basan en experimentos hechos con CMSP de al menos 6 pacientes y se presentan como la media  $\pm$  SEM tanto para la carga parasitaria como para la secreción de citoquinas. Los asteriscos indican las diferencias significativas comparadas con el control sin fármaco. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ .

***Las concentraciones seleccionadas de los anti-leishmaniales para la combinación con los inmunomoduladores no alteraron la secreción de citoquinas.*** La carga parasitaria fue significativamente reducida a las 48 h de exposición a 8  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V) o 4  $\mu\text{M}$  de HePC. La supervivencia continuó declinando significativamente hasta alcanzar un porcentaje de parásitos viables de 37% y 9% a las 96 horas de exposición a Sb(V) y HePC, respectivamente, comparado con la infección en ausencia de fármaco (Figura 4A). La secreción de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-10,  $\text{IFN}\gamma$  e IL-13 no fue afectada por la concentración evaluada de los fármacos (Figuras 4B-E).



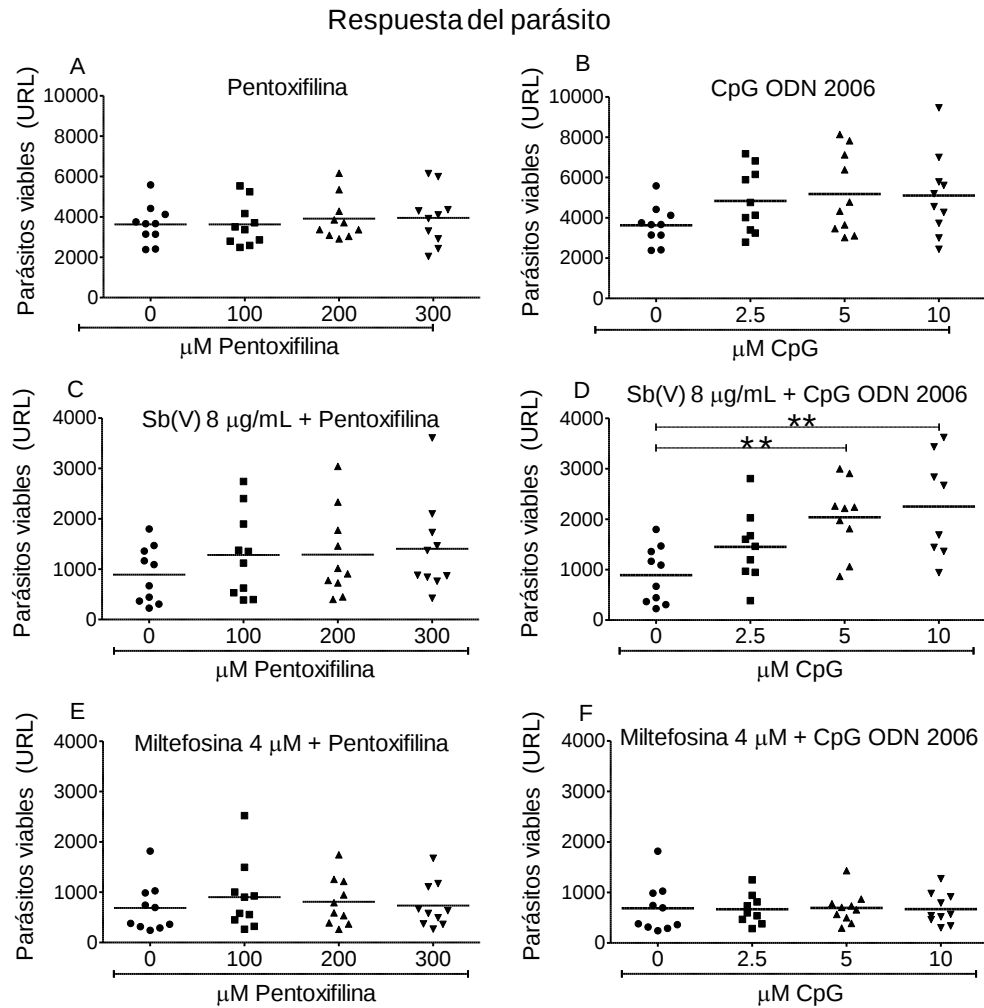
**Figura 4.25** Cinética de la supervivencia del parásito y la secreción de citoquinas en respuesta a 4  $\mu$ M de HePC y 8  $\mu$ g/mL de Sb(V) usando el modelo *ex vivo* de células mononucleares.

Se evaluó la viabilidad del parásito (A) y la secreción de citoquinas (B a E) hasta 96 h de exposición al fármaco. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM de experimentos hechos con CMSP de 5 pacientes.  $*P \leq 0.01$ , control vs los dos fármacos.

**La supervivencia del parásito y la secreción de citoquinas fueron diferencialmente afectadas por los anti-leishmaniales e inmunomoduladores solos o combinados.** La PTX no afectó directamente la carga parasitaria (Figura 5A) ni la actividad anti-leishmanial de Sb(V) y HePC (Figuras 5C y E). El CpG solo

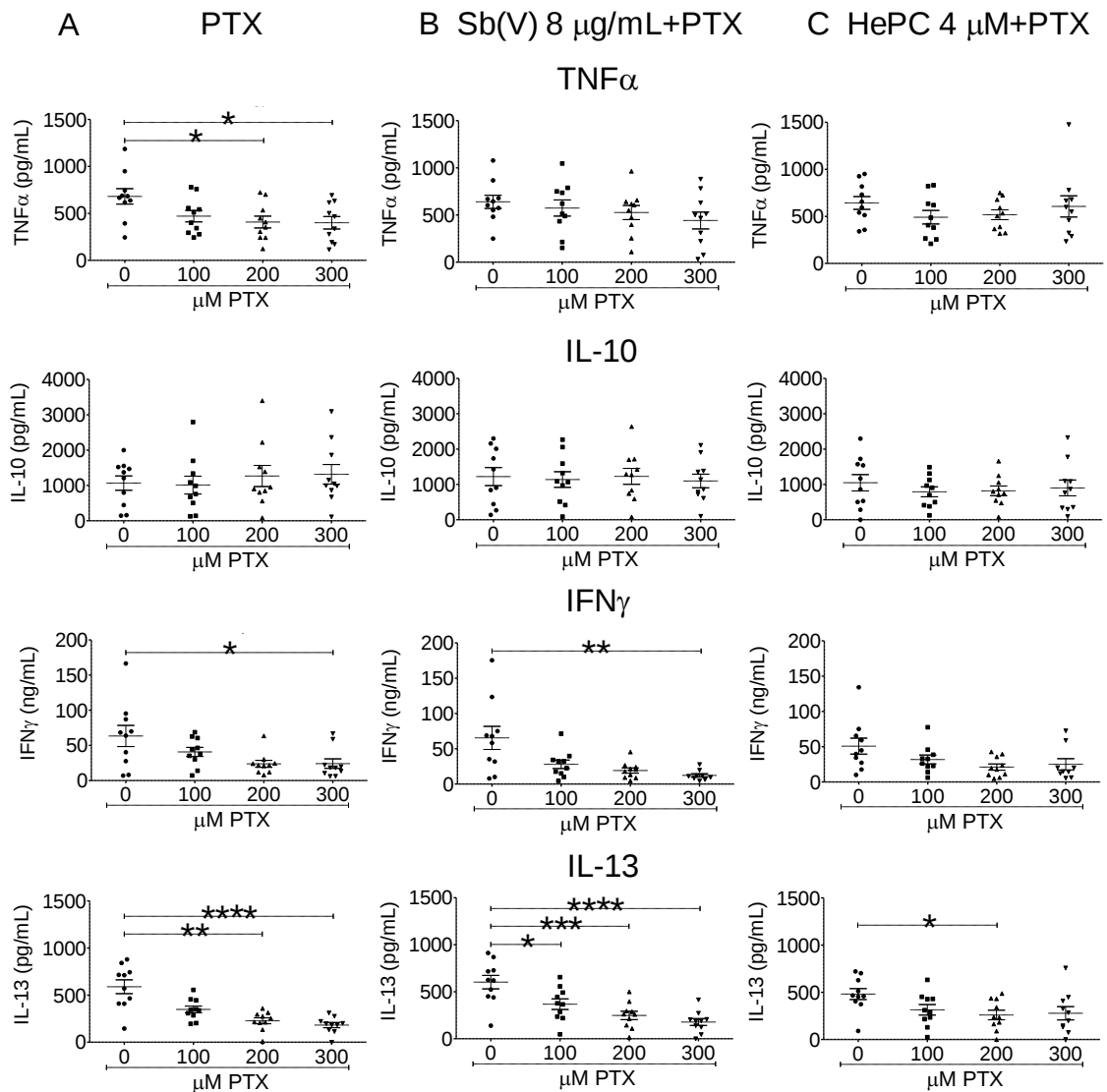
no afectó significativamente la supervivencia del parásito (Figura 5B), pero su combinación con Sb(V) disminuyó significativamente la actividad anti-leishmanial comparado con el fármaco solo (Figura 5D). En contraste la muerte de los parásitos inducida por HePC no se afectó con CpG (Figura 5F). La máxima concentración evaluada de los inmunomoduladores no fue tóxica en las CMSP de donantes sanos. El porcentaje de CMSP viables con 300  $\mu$ M de PTX fue 98.2  $\pm$  5.1 SEM, n = 3 y para 10  $\mu$ M de CpG fue de 90.8  $\pm$  9.1 SEM, n = 2.

Cuando las CMSP infectadas se expusieron a PTX se produjo una reducción significativa de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-13 e  $\text{IFN}\gamma$  dependiente de la concentración de PTX (Figura 6A). El efecto supresor de PTX en IL-13 e  $\text{IFN}\gamma$  se mantuvo cuando el inmunomodulador fue combinado con Sb(V) y HePC (Figuras 6B y C). La secreción de IL-10 inducida por la infección no fue afectada por PTX sola o combinada con las concentraciones evaluadas de Sb(V) y HePC (Figura 6). La PTX no indujo la secreción de citoquinas en CMSP no infectadas, siendo indetectable o presente en concentraciones iguales o menores que lo detectado en los correspondientes controles sin PTX.



**Figura 5.26 Efecto en la viabilidad del parásito frente a fármacos anti-*Leishmania*, compuestos inmunomoduladores y su combinación.**

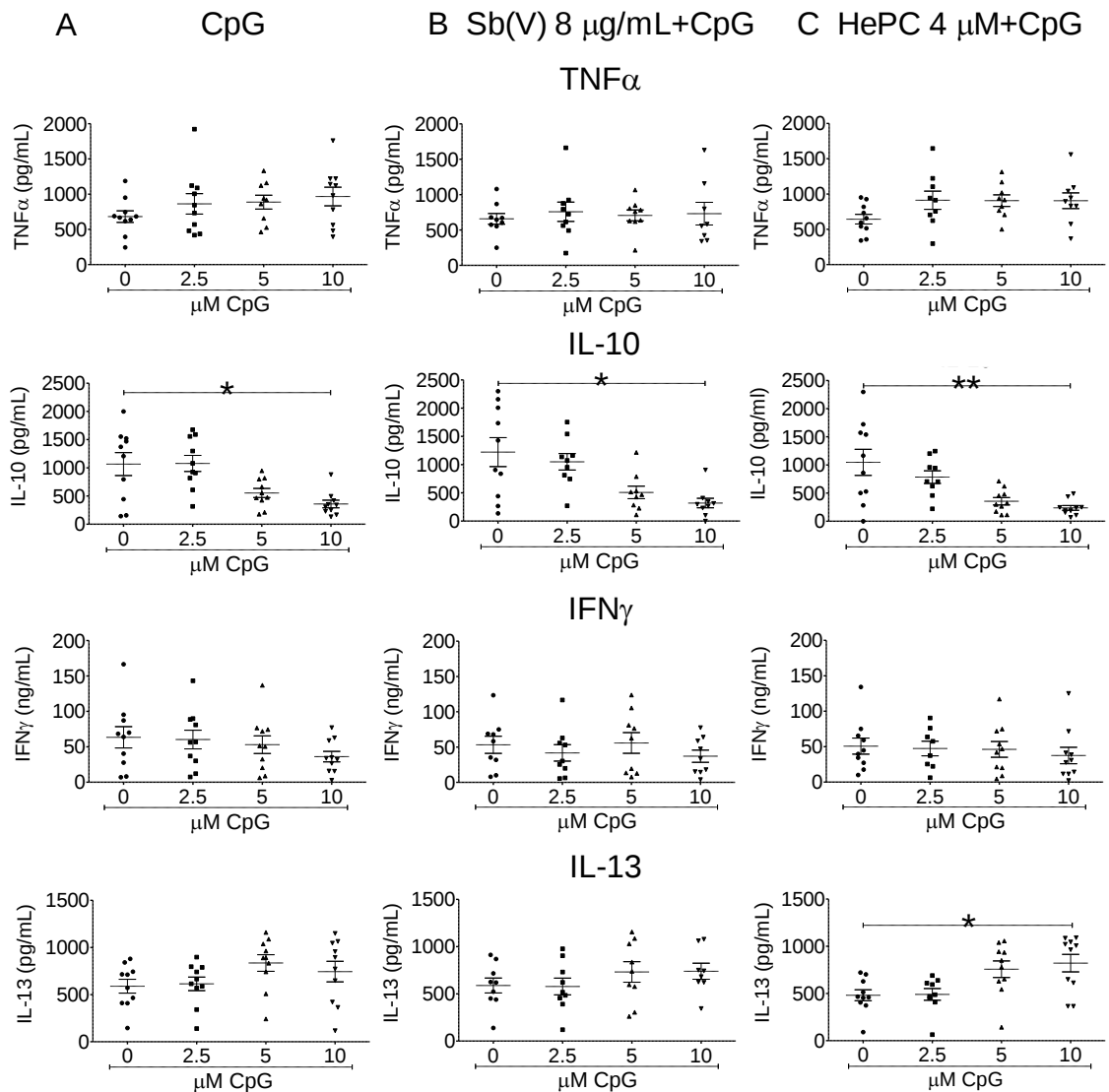
Dosis respuesta sobre la viabilidad del parásito de los inmunomoduladores solos: PTX (A) y CpG (B), combinados con 8  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V) (C y D) o con 4  $\mu\text{M}$  de HePC (E y F). Los datos son presentados como la media  $\pm$  SEM de la carga parasitaria en CMSP de 10 pacientes. \*  $P < 0.05$ , comparado con el control sin fármaco.



**Figura 6.27** Dosis respuesta de la secreción de citoquinas por células mononucleares expuestas a PTX y su combinación con Sb(V) y HePC.

Las CMSP de 10 pacientes fueron expuestas a la infección con una dosis infectiva de 10:1 parásitos:monocito. Las citoquinas fueron evaluadas a las 96 h de tratamiento. Las concentraciones evaluadas de los anti-leishmaniales en las combinaciones fueron 8 µg/mL de Sb(V) y 4 µM de HePC. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ , comparado con el control sin tratamiento.

En el caso de CpG, la concentración de IL-10 disminuyó significativamente en respuesta al inmunomodulador solo o en combinación con Sb(V) o HePC. La secreción de IL-13 incremento significativamente en los cultivos expuestos a la combinación de CpG con HePC (Figura 7C), y no cambio cuando se combino con Sb(V) (Figura 7B). La secreción de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  no fue afectada por CpG solo o combinado con HePC o Sb(V) (Figura 7A, B y C). En CMSP no infectadas, CpG indujo la secreción de IL-10 (concentración media para CMSP sin estimulo = 0 vs 151 pg/mL con 10  $\mu\text{M}$  CpG Mann Whitney test  $p = 0.0023$ ,  $n = 8$ ), pero no indujo la secreción de IL-13 (concentración media para CMSP sin estimulo = 38 pg/mL vs 42 pg/mL con 10  $\mu\text{M}$  CpG, Mann Whitney test  $p = 0.2788$ ,  $n = 8$ ) o  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ , las cuales no fueron detectadas en el sobrenadante de las CMSP no infectadas con o sin CpG.

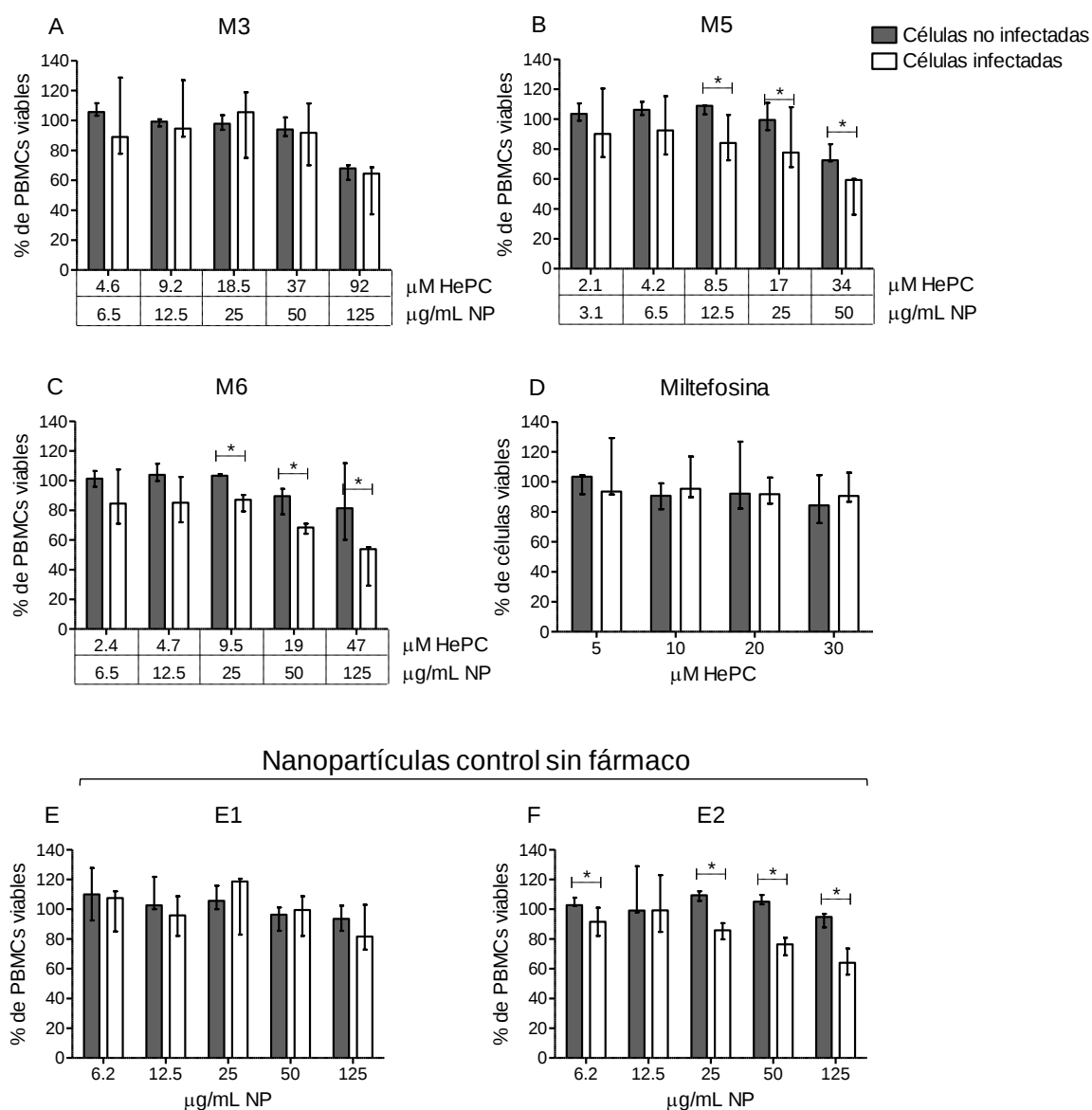


**Figura 7.28** Dosis respuesta de la secreción de citoquinas por células mononucleares expuestas a CpG y su combinación con Sb(V) y HePC.

Las CMSP de 10 pacientes fueron expuestos a la infección con una dosis infectiva de 10:1 parásitos:monocito. Las citoquinas fueron evaluadas a las 96 h de tratamiento. Las concentraciones evaluadas de los anti-leishmaniales en las combinaciones fueron 8 µg/mL de Sb(V) y 4 µM de HePC. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , comparado con el control sin tratamiento.

***La formulación de HePC en nanopartículas micelares incrementó la actividad anti-leishmanial del fármaco, sin afectar la secreción de las citoquinas evaluadas.*** La toxicidad y potencia de las formulaciones varió en relación al tamaño de las NPs. Las formulaciones de menor tamaño (M5, M6 y E2, Figura 8B, C y F), fueron más tóxicas que las nanopartículas más grandes (M3 y E1, Figura 8A y E) y significativamente más tóxicas en CMSP expuestas a la infección con *L. panamensis* comparado con las CMSP no infectadas. La toxicidad fue independiente de que las formulaciones contuvieran o no HePC. La potencia de M5 y M6 fue significativamente mayor que la del fármaco sólo a la concentración de 4  $\mu$ M, mientras que M3 tuvo una potencia similar al fármaco solo (Figura 9). La concentración de la formulación de NPs sin fármaco correspondiente a cada NP no tuvo efecto anti-leishmanial.

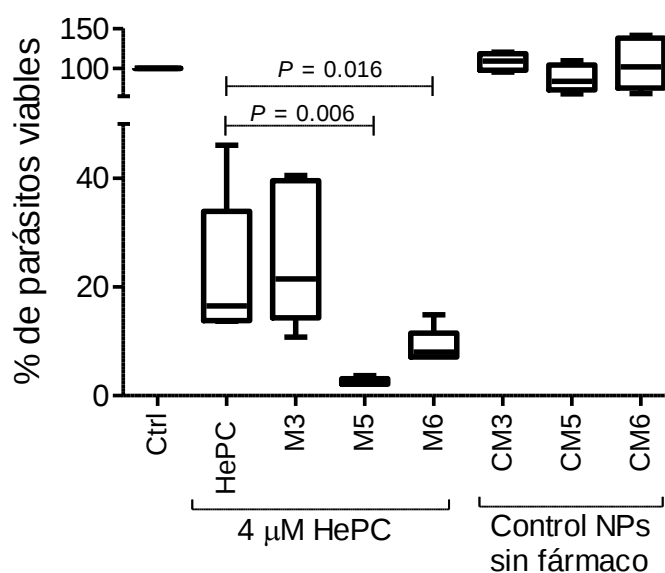
La evaluación de la secreción de IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por las NPs mostró que la IL-10 fue significativamente menor en las células tratadas con la concentración más alta de las NPs M3 y M5, las cuales contenían las mayores concentraciones del fármaco (20 y 35  $\mu$ M de HePC) (Figura 10A); sin embargo, esta diferencia se atribuye a la concentración del fármaco solo evaluado como control en el mismo experimento el cual disminuyó significativamente la secreción de IL-10 de manera dosis dependiente, reproduciendo el resultado obtenido previamente en este estudio (Figura 3). La evaluación de la secreción de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por las NPs no mostró diferencias significativas con las células sin tratamiento en las concentraciones evaluadas (Figura 10B y C), similar a lo observado con el fármaco solo.



**Figura 8.29** Toxicidad de las NPs micelares en células mononucleares no infectadas e infectadas con *L. panamensis*.

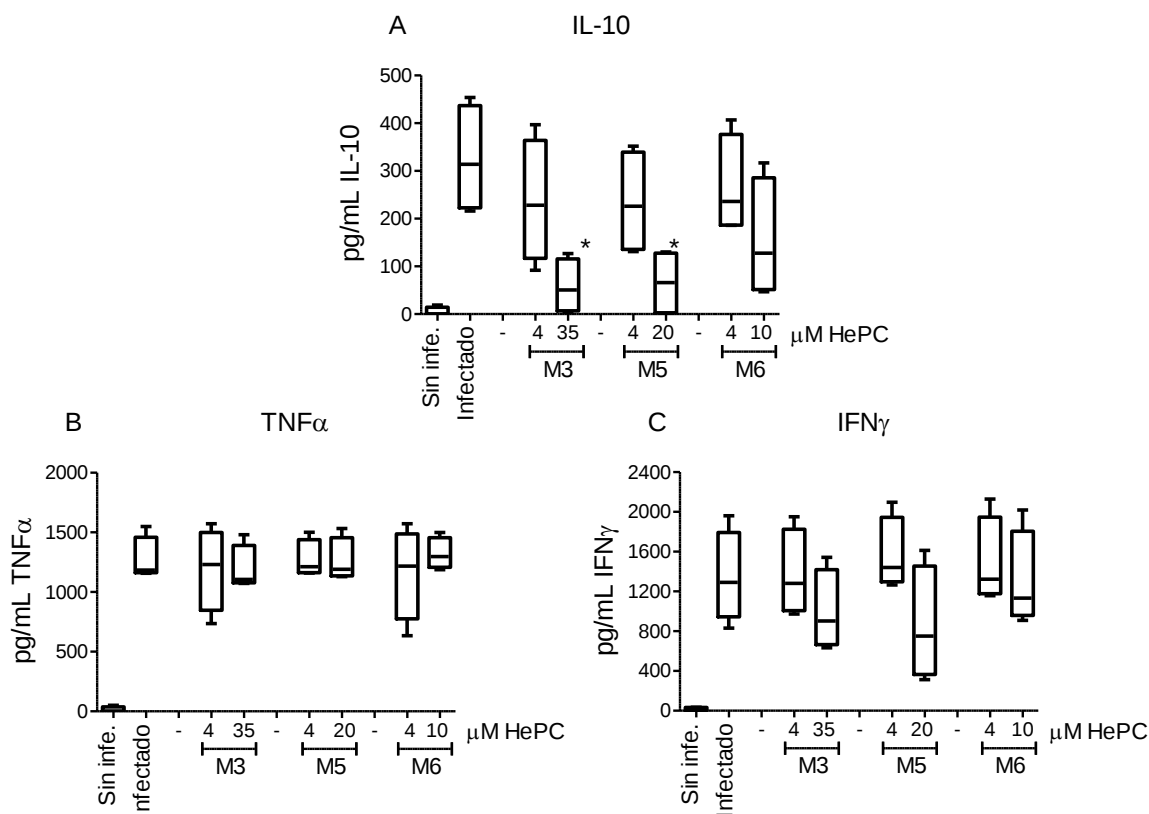
La toxicidad de las NPs M3 (A), M5 (B) y M6 (C) fue evaluada en PBMC de pacientes no infectados o expuestos a infección con *L. panamensis*. Las concentraciones evaluadas se ajustaron a la concentración en μg/mL de las NPs completas. La concentración de HePC contenida en las NPs es presentada para cada una de las formulaciones evaluadas.

Como control se evaluó el fármaco solo (D), y las NPs sin fármaco E1 (control de M3), y E2 (control de M5 y M6). Los datos corresponden a la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de células viables de 3 pacientes. \*  $P < 0.05$ , comparado con el control sin infección.



**Figura 9.30** Comparación de la actividad anti-leishmanial de M3, M5 y M6 con el fármaco solo.

La potencia de las NPs fue comparada con la potencia del fármaco solo a la concentración de 4  $\mu$ M de HePC. Como control se evaluaron las concentraciones correspondientes de las NPs sin fármaco. Los datos son expresados como el porcentaje de parásitos viables comparado con el control sin tratamiento. Los datos corresponden a la mediana y el rango intercuartílico de la evaluación en CMSP de 5 pacientes. CM3, CM5 y CM6 corresponden a las NPs sin HePC con la misma concentración de PLGA-PEG y/o G4 de las NPs con fármaco.



**Figura 10.31** Respuesta de la secreción de IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en células mononucleares expuestas a HePC formulada en NPs.

Se evaluó la secreción de IL-10 (A), TNF $\alpha$  (B) e IFN $\gamma$  (C) en CMSP expuestas a dos concentraciones de cada NP. Las concentraciones evaluadas fueron 4  $\mu$ M de HePC y la máxima concentración no toxica de M3, M5 y M6. Como control se evaluaron CMSP sin infectar e infectados sin tratamiento. Los datos son expresados como la mediana y el rango intercuartílico de la secreción de citoquinas en CMSP de 4 pacientes. \*  $P < 0.05$ , comparado con el control infectado sin tratamiento.

## Discusión

Los resultados de este estudio corroboran la factibilidad de una evaluación integrada de la susceptibilidad del parásito y de la respuesta inmune *ex vivo* de las CMSP del hospedero y líneas de *Leishmania* spp. transfectadas con el gen reportero de la luciferasa. Los anti-leishmaniales estándar y nuevas opciones terapéuticas fueron evaluadas en células mononucleares de la respuesta inmune de circulación sistémica de hospederos previamente expuestos a la infección, lo que permitió estudiar la interacción de los fármacos con el parásito y con factores de la respuesta innata o adquirida presentes o inducibles en CMSP de donantes sanos o de pacientes leishmaniasis cutánea activa. El uso de CMSP previamente expuestas a la infección en el paciente con LC permite tener una mejor aproximación de la actividad *in vitro* de los fármacos bajo las condiciones de estímulo y respuesta inmune *in vivo*.

Los parásitos transfectados con genes reporteros han sido exitosamente empleados para cuantificar la supervivencia del parásito *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* [176,179]. En el modelo *ex vivo* de CMSP, el uso de parásitos de *Leishmania* transfectados con la luciferasa permitió la cuantificación de parásitos viables en macrófagos diferenciados en presencia de linfocitos y sin los sesgos inherentes a la evaluación visual mediante microscopía. Es importante destacar que la infección de macrófagos primarios derivados de monocitos humanos fue realizada en placas de 96 pozos optimizando el uso de CMSP. Las ventajas del microcultivo en placas de 96 pozos se amplían por la posibilidad de usar ensayos como multiplex que requieren volúmenes mínimos de sobrenadante (25-50  $\mu$ L) para la cuantificación de citoquinas y otros mediadores. La evaluación mediante análisis de citometría (FACS) es también factible utilizando la estrategia del modelo *ex vivo*, con lo que se puede expandir ampliamente la información inmunológica a la que se puede acceder utilizando este modelo.

La robustez del método de evaluación de carga parasitaria en CMSP fue soportado por la señal medible para las dosis infectivas evaluadas (10:1 y 20:1 parásito:monocito) en los tiempos evaluados hasta tres días después de la infección. Notablemente, aunque la carga parasitaria fue menor en el inóculo de 10 parásitos comparado con 20 parásitos, la secreción de citoquinas no lo fue (Figuras 2A y B). Estos resultados sugieren que a concentraciones altas de la dosis infectiva (20p:1c) puede haber saturación en la inducción de mediadores de la respuesta inmune al estímulo con *Leishmania*. La independencia entre la carga parasitaria y la secreción de citoquinas fue también evidente en la divergencia de la respuesta de citoquinas y supervivencia del parásito en presencia de concentraciones crecientes de Sb(V) y HePC (Figura 3), y en los ensayos de cinética durante la exposición a una concentración de los fármacos anti-leishmaniales (Figura 4), y es soportada por otros estudios [180,181].

El modelo convencional de amastigote-macrófago usado en los ensayos de susceptibilidad permite evaluar la actividad leishmanicida de los fármacos que actúan directamente sobre el parásito o a través del macrófago. Este método ha sido ampliamente utilizado y los resultados del trabajo presentado en el capítulo 2 aplicando la estrategia del uso de una concentración discriminatoria de los fármacos, muestran la ventaja para el monitoreo de la susceptibilidad a nivel poblacional y el entendimiento de la respuesta terapéutica desde el punto de vista epidemiológico. Sin embargo, el modelo amastigote-macrófago comparado con el modelo de infección *ex vivo* usando CMSP no es informativo de la respuesta inmunomoduladora colateral de los anti-leishmaniales o de compuestos cuya actividad es mediada por otras células del sistema inmune. Por lo tanto, ni la respuesta inmune a la infección, ni la respuesta inmune inducida por el fármaco son evaluados con el macrófago solo. Es de resaltar que en el modelo *ex vivo* con CMSP, la viabilidad del parásito disminuye con el aumento de la concentración del fármaco como ocurre con el modelo de infección en macrófagos de los ensayos de

susceptibilidad [176,182], y además permite evaluar determinantes de la respuesta inmune regulados en las CMSP obtenidas de pacientes con leishmaniasis.

En resumen el modelo amastigote-macrófago (método convencional) es aplicable para estudios poblacionales de la susceptibilidad dada su mayor eficiencia como se demostró en el capítulo II, mientras que el modelo de infección *ex vivo* usando CMSP tiene aplicación en la evaluación y desarrollo de nuevas opciones terapéuticas y en estudios de mecanismos de la respuesta inmune de CMSP en el contexto de la interacción parasito-hospedero-fármaco.

La contribución de la respuesta inmune a la eficacia de los tratamientos anti-leishmaniales se conoce escasamente. Varios estudios *in vivo* sugieren una directa relación entre el efecto leishmanicida de antimonio y factores inmunes del hospedero como  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e IL-12 [35,183,184,185], y evidencia reciente sugiere que la activación de la respuesta inmune por HePC es un constituyente de su mecanismo de acción [91,92,186]. En el presente estudio encontramos que HePC reduce significativamente la secreción de IL-10 e IL-13 de manera dosis dependiente. La inhibición de la secreción de IL-10 fue previamente reportada en CMSP de pacientes con LV [92] y en el suero de pacientes con PKDL [91] que recibieron tratamiento con HePC en concordancia con lo observado en el modelo *ex vivo*. No obstante, la inhibición de la secreción de IL-10 e IL-13 en CMSP infectadas con *L. panamensis* y su relación con la actividad anti-leishmanial de HePC es un hallazgo nuevo. La atribución del efecto inhibitorio de estas citoquinas a HePC está soportada por la ausencia de efectos inmunomoduladores de Sb(V) a pesar de la reducción significativa de la carga de parásitos dependiente de la concentración del fármaco (Figura 3).

La inclusión de células sensibilizadas de la respuesta inmune adaptativa en la evaluación de agentes terapéuticos permite la cuantificación de la respuesta inmune pro y anti-inflamatoria y Th1/Th2 que pueden tener efecto sobre el espectro clínico de la infección por especies del subgénero *Viannia* [187,188,189].

La definición de marcadores de cura o falla al tratamiento podría orientar sobre que determinantes inmunológicos son más informativos para ser evaluados en el modelo *ex vivo* de tal forma que permitan conocer en una fase temprana del desarrollo de nuevas terapias cuál podría ser su efecto en la respuesta inmune del paciente. Por ejemplo se ha reportado que la alta expresión de quimioquinas pro-inflamatorias como CCL2, CXCL-9 y CXCL-10 están asociadas con la cronicidad de la LC ocasionada por *L. panamensis* [190]. La producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico han sido identificadas entre los mecanismos efectores que pueden contribuir en la actividad de los fármacos antimoniales y participar en muerte del parásito [191]. Estos y otros potenciales parámetros de la respuesta inmune incluyendo los fenotipos celulares y la expresión de genes asociados con la respuesta clínica y la respuesta terapéutica pueden también ser evaluados usando este modelo de infección.

En modelo de CMSP se evidenció que compuestos que modifican la respuesta inmune del hospedero pueden afectar la actividad microbicida de fármacos anti-leishmania, como se observó en la combinación de Sb(V) y CpG. Los mecanismos precisos no están determinados, sin embargo, se resalta la importancia de la evaluación preclínica para identificar posibles interacciones entre los procesos de inmunomodulación y la actividad de los fármacos. Considerando la relación interdependiente entre la respuesta inmune del hospedero y la eficacia del tratamiento anti-leishmanial, como se ha ilustrado ampliamente por la alta incidencia de fallas y recaídas de pacientes inmunocomprometidos [192,193,194], este modelo es una aproximación a la infección natural y es particularmente útil para el estudio de intervenciones terapéuticas que involucran inmunomodulación o la evaluación nuevos compuestos de los que se desconoce su efecto en la respuesta inmune.

El efecto supresor observado por PTX en la secreción de citoquinas fue consistente con previos reportes usando re-estimulo de de CMSP con antígeno soluble de *Leishmania* y la respuesta inmune *in vitro* durante otras patologías

asociadas con la respuesta inmune exacerbada [195,196,197,198]. En el caso del inmunomodulador CpG, se encontró que cuando se adicionó solo, indujo significativamente la secreción de IL-10 en CMSP no infectadas, corroborando un reporte previo en el que el estímulo con CpG en CMSP de humanos induce IL-10 [199]. Sin embargo, el CpG en combinación con los fármacos anti-leishmania disminuyó la secreción de IL-10 en CMSP infectadas con *Leishmania*. De forma similar en un estudio hecho en hámster y ratones BALB/c infectados con *L. donovani*, se observó una disminución de IL-10 y TGF- $\beta$  por el tratamiento con CpG solo o en combinación con HePC [152]. Por tanto, con el modelo *ex vivo* se evidencia que el uso algunos agentes inmunomoduladores junto a fármacos anti-leishmania pueden inducir efectos que difieren de lo observado con el agente solo.

Por otro lado, la mayor potencia de HePC en nanopartículas observada en este estudio corrobora la efectividad de estas novedosas formulaciones, cuyo uso como sistemas de suministro de fármacos ha incrementado considerablemente en la última década [200,201]. La mayor toxicidad y potencia observada con las NPs de menor tamaño (M5 y M6) es consistente con previos estudios *in vitro* en células humanas donde se ha observado que NPs entre 40 y 70 nm muestran mayor internalización celular y mayor toxicidad comparado con NPs grandes (100, 300 y 1000 nm) [202,203]. Otra característica importante en la internalización de las NPs es la carga neta en la superficie. Se ha reportado que las NPs cargadas negativamente son internalizadas rápidamente por macrófagos y otras células fagocíticas [204]. Las NPs micelares con mayor potencia evaluadas en el presente estudio tienen diámetros más pequeños y una carga negativa, características que podrían incrementar la internalización en el macrófago.

La mayor potencia de las NPs M5 y M6 que contienen el dendrímero G4, comparado con M3, formulada sin G4, podría estar explicada también porque los dendrímeros en conjunto con NPs poliméricas y liposomales tienen la capacidad de permeabilizar y desestabilizar el endosoma [205,206]. La inclusión de estas

macromoléculas en la formulación de HePC podría incrementar la actividad anti-leishmanial por desestabilización de la vacuola parasitófora e incremento del contacto con el parásito. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las NPs M5 y M6 son más efectivas son motivo de futuros estudios. A diferencia de lo reportado con el uso de NPs sólidas de PLGA y liposomas [152,207], las NPs micelares no afectaron la secreción de las citoquinas evaluadas. En los próximos pasos se incluirá la evaluación de otros mediadores y determinantes de la respuesta inmune relacionados con cura o severidad de la enfermedad.

El uso de NPs poliméricas de PLGA constituyen una plataforma disponible, estable y con materiales aprobados clínicamente [208]. Las NPs micelares se caracterizan por una elevada estabilidad frente a la fuerza iónica, dilución y temperatura. Además, pueden ser liofilizadas y conservadas en estado sólido evitando los costos de refrigeración. Previos estudios han mostrado que la formulación de HePC o Sb(V) en liposomas también incrementa la potencia del fármaco en amastigotes intracelulares de *L. donovani* y *L. major* [209,210]; sin embargo, el desarrollo de formulaciones con liposomas es más costoso. Los resultados preliminares obtenidos en el presente estudio, sumado a las ventajas mencionadas y al menor costo de las NPs poliméricas de PLGA comparado con los liposomas apoyan el desarrollo de siguientes fases de estudio para esta estrategia terapéutica.

En conclusión el análisis de la interacción de componentes de la respuesta inmune innata y adquirida y la actividad anti-leishmanial de los fármacos, agentes inmunomoduladores y nuevos tratamientos es alcanzable utilizando células mononucleares de donantes previamente expuestos a la infección natural con *Leishmania*. Usando esta aproximación, se obtuvo conocimiento sobre la susceptibilidad del parásito y la producción citoquinas moduladas por fármacos anti-leishmania y nuevas opciones terapéuticas encaminadas a re-direccionar la respuesta inmune o a incrementar la potencia de los fármacos. Esta estrategia puede ser usada para ajustar y optimizar la respuesta del hospedero (por ejemplo

mediante el uso de inmunomoduladores) y sobre el parásito con el fin de alcanzar la cura clínica. Además permite una mejor aproximación al entendimiento de lo que sucede *in vivo* en la relación entre la susceptibilidad del parásito a los fármacos y la respuesta al tratamiento.

## Discusión

La investigación y el análisis integrado de factores, y aun la inter-relación, del hospedero y el parásito contribuyen a un entendimiento distinto y comprensivo de la respuesta al tratamiento. En general para las enfermedades causadas por agentes infecciosos, la susceptibilidad del microorganismo y la respuesta inmune del hospedero son reconocidas como factores en la respuesta terapéutica. Por tanto, el conocimiento y monitoreo de la susceptibilidad de *Leishmania* a las drogas en uso es relevante para la revisión y definición de esquemas terapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis. La detección y distribución de resistencia, bien sea adquirida o intrínseca, a un tratamiento específico alerta sobre el riesgo de un incremento en la frecuencia de falla terapéutica. También informa sobre la necesidad de desarrollar nuevos fármacos, o terapias combinadas que conserven la vida útil de los tratamientos en uso. En este sentido, la evaluación preclínica integrada de la actividad antimicrobiana y la respuesta inmune del hospedero constituye una aproximación de lo que sucede *in vivo* durante el tratamiento en la interacción parásito-hospedero-fármaco, favoreciendo el diseño de terapias más efectivas.

El presente trabajo muestra una visión integrada de la susceptibilidad de *Leishmania* (*Viannia*) a nivel poblacional, en el contexto de la infección, la falla al tratamiento y la respuesta inmune del hospedero. La evaluación poblacional de la susceptibilidad hizo evidente la circulación de cepas del subgénero *Viannia* tolerantes/resistentes a los dos medicamentos de mayor uso en Colombia. Los datos obtenidos, confirman la emergencia de resistencia de cepas de *L. (Viannia) panamensis* y *braziliensis* durante el tratamiento con miltefosina en pacientes con falla terapéutica. Los resultados también apoyaron la hipótesis de tolerancia intrínseca entre poblaciones de *L. braziliensis* a este fármaco. Estos hallazgos alertan sobre la necesidad de nuevas opciones terapéuticas que bajo este estudio fueron exploradas como terapias combinadas de los anti-leishmaniales con inmunomoduladores y nuevas formulaciones de miltefosina en nanopartículas. La

evaluación concomitante de la susceptibilidad y la respuesta inmune para estas nuevas opciones terapéuticas generó información que direcciona próximos pasos para el desarrollo de medicamentos con mayor potencia como se observó en la formulación de miltefosina en nanopartículas.

El estudio poblacional de la susceptibilidad evidenció la circulación de sub-poblaciones de *L. panamensis* distinguibles por perfiles isoenzimáticos en el suroccidente del país asociadas con susceptibilidad o resistencia a Sb(V). De acuerdo al análisis de factores del hospedero como grupos étnicos y ocupacionales estas se sugiere que puede haber relación con diferentes ciclos de transmisión. Este interesante hallazgo plantea nuevas hipótesis sobre la influencia de la infección con estas sub-poblaciones de parásitos y la respuesta al tratamiento con Sb(V). Estas poblaciones, con distintos genotipos y fenotipos proporcionan además material valioso para estudiar mecanismos de resistencia en cepas clínicas de *Leishmania*.

Las estrategias metodológicas usadas para el desarrollo del presente trabajo fueron clave para el análisis a escala regional en Colombia y para la mejor comprensión de los factores del hospedero y del parásito que influyen en la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* prevalentes en Colombia. El uso de una única concentración discriminatoria de los fármacos hizo factible evaluar susceptibilidad a nivel poblacional y el trabajo interinstitucional permitió conocer el comportamiento de la susceptibilidad en las regiones de mayor prevalencia. La lectura microscópica de la infección continúa siendo una limitante a superar, probablemente mediante la aplicación de técnicas moleculares.

El desarrollo de una estrategia más eficiente para evaluar la susceptibilidad al alcance de centros de referencia, comparado con los ensayos de dosis respuesta ( $EC_{50}$ ), constituye una contribución metodológica de aplicación inmediata para el monitoreo de la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* circulantes en el

país a los fármacos en uso. Con relación al estudio de nuevas opciones terapéuticas, el modelo de infección de células monocucleares de pacientes fue diseñado para la evaluación integral de nuevos tratamientos, y para entender el efecto de los fármacos sobre la respuesta inmune e inflamatoria en el contexto de la infección *ex vivo* en CMSP. Adicionalmente los hallazgos obtenidos en este estudio generaron conocimiento que permite plantear nuevas estrategias de investigación para entender los mecanismos de resistencia del parásito y la relación entre la susceptibilidad y la falla terapéutica. En el caso específico de las sub-poblaciones de *L. panamensis* sensibles o resistentes a Sb(V) la identificación de marcadores bioquímicos partiendo de las diferencias conocidas en las isoenzimas, podría ser usada en estudios epidemiológicos para entender su relación con el ciclo de transmisión y con la respuesta al tratamiento a nivel poblacional.

### Conclusiones y significancia de los hallazgos

- La reducción proporcional de la carga de amastigotes intracelulares de *Leishmania* en presencia de una concentración del fármaco con relevancia clínica y que distingue las líneas control sensible y resistente, permitió discriminar la susceptibilidad a Sb(V) y HePC de cepas clínicas del subgénero *Viannia*. El establecimiento de una estrategia eficiente hizo factible el desarrollo de un análisis comprensivo en el contexto endémico y a una escala mayor que lo reportado previamente o factible a través de la determinación del EC<sub>50</sub>. La estrategia generada para la evaluación de la susceptibilidad La estrategia desarrollada permitió establecer una base de la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* (*Viannia*) en Colombia a los fármacos de mayor uso.
- Los resultados de este estudio evidencian un amplio rango de susceptibilidad a Sb(V) y HePC entre cepas de las especies de *Leishmania* (*Viannia*) mas prevalentes en Colombia. La susceptibilidad estuvo influenciada por la especie, sub-poblaciones del parásito de la misma especie y el origen geográfico de la cepa. Esta información establece un referente y línea de base para el futuro monitoreo de la susceptibilidad y emergencia de resistencia de las cepas circulantes de las especies evaluadas en los diferentes focos endémicos.
- Se demuestra por primera vez la existencia de marcadores intrínsecos asociados con tolerancia/resistencia al C<sub>max</sub> de Sb(V) alcanzado en plasma en una sub-población de cepas clínicas de *Leishmania* pertenecientes a la especie *L. panamensis*. El fenotipo de tolerancia/resistencia o sensibilidad estuvo asociado a los zimodemas 2.3 y 2.2 de *L. panamensis*, respectivamente. Notablemente estos zimodemas presentaron características epidemiológicas que sugieren su diseminación a través de diferentes ciclos de transmisión. Teniendo en cuenta la fuerte asociación encontrada y conservada a los largo de 30 años, el zimodema 2.3 constituye la base para el desarrollo de un potencial marcador indirecto de resistencia.

- El tratamiento con un ciclo de HePC puede seleccionar parásitos tolerantes del subgénero *Viannia*, contribuyendo a la falla terapéutica. La alta proporción de cepas de *L. braziliensis* aisladas de pacientes antes de tratamiento que presentaron un fenotipo de tolerancia a HePC, sugiere la existencia de poblaciones de parásitos intrínsecamente resistentes a este fármaco. Estos resultados junto a la larga vida media del fármaco en plasma y la facilidad de selección de parásitos resistentes experimentalmente, remarcan la necesidad del uso de terapias combinadas o nuevas formulaciones que protejan la vida útil del medicamento.
  
- El modelo *ex vivo* con CMSP de pacientes es una estrategia sensible, informativa y novedosa que permite estudiar, conocer y entender la respuesta inmune y del parásito a los anti-leishmaniales en uso y nuevas opciones terapéuticas. Esta estrategia permitió explorar la respuesta inmune y el efecto microbicida frente a Sb(V), HePC, terapias combinadas con inmunomoduladores y nuevas formulaciones de HePC en nanopartículas. Los resultados obtenidos podrían direccionar nuevas aproximaciones pre-clínicas para optimizar el tratamiento de la LC.

## Perspectivas

- El uso de proporción de sobrevivencia frente a una concentración de los fármacos para discriminar la susceptibilidad de las cepas clínicas de *Leishmania* debe ser validado. La validación requiere completar análisis con relación a los valores de  $EC_{50}$ , incluyendo cepas que permitan abarcar el rango indeterminado definido actualmente por ausencia de datos. También se debe evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad del método.
- Reconociendo la gran limitación de la lectura microscópica para determinar la viabilidad y cuantificar los parásitos en los ensayos de susceptibilidad, nuestro grupo ha venido trabajando en el desarrollo de un método molecular que permita ensayos de tipo “medium throughput” para determinar carga parasitaria. El método consiste en la ampliación del gen 7SLARN del parásito. Resultados en preparación para publicar sobre la evaluación de la susceptibilidad a través de la lectura por microscopía y la amplificación del 7SLARN (qRT-PCR) han mostrado una alta correlación ( $r_s = 0.9$ ,  $P < 0.001$ ) cuando se usó la concentración de 32  $\mu\text{g/mL}$  de Sb(V). El uso de este blanco molecular permitirá su aplicación tanto en la evaluación de susceptibilidad de cepas clínicas en el modelo convencional de macrófagos infectados, como en el modelo *ex vivo* de infección usando células mononucleares de pacientes. Esta estrategia agilizaría la evaluación de la respuesta de cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes en conjunto con la respuesta inmune en células mononucleares y su relación con la respuesta al tratamiento y otras interacciones parásito-hospedero relevantes en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.
- Uno de los principales alcances del presente trabajo fue establecer una línea de base de la susceptibilidad de las especies de *Leishmania*

prevalentes en regiones naturales de Colombia. Actualmente, en el marco de diferentes proyectos institucionales se continúa evaluando la susceptibilidad de cepas clínicas de *Leishmania*. Los resultados alimentaran una base de datos que nos permita actualizar la información sobre de la susceptibilidad a los fármacos en uso y monitorear la susceptibilidad y emergencia de resistencia en los focos endémicos de las poblaciones que se atienden en CIDEIM.

- La marcada tolerancia a Sb(V) identificada en las cepas de *L. panamensis* de los zimodemas 2.3, y la sensibilidad de cepas de zimodema 2.2, genera la oportunidad de determinar la relación entre la respuesta clínica al tratamiento y la susceptibilidad *in vitro*. Actualmente, se realiza un estudio para identificar la relación entre los zimodemas 2.3 y 2.2 y la respuesta al tratamiento mediante el análisis retrospectivo de las historias clínicas de pacientes infectados con *L. panamensis* de los zimodemas 2.2 y 2.3, y el análisis de zimodemas de cepas de *L. panamensis* obtenidas de pacientes con información de respuesta al tratamiento administrado en forma supervisada en ensayos clínicos controlados. Este trabajo es llevado a cabo por un Joven Investigador patrocinado por Colciencias.
- Las cepas *L. panamensis* de los zimodemas 2.2 y 2.3 constituyen un material valioso para entender los mecanismos que confieren el fenotipo de resistencia a Sb(V). Así mismo, las cepas clínicas de *L. braziliensis* altamente sensibles y resistentes a HePC brindan la materia prima para descifrar las bases para estos fenotipos naturales en la misma especie.
- El modelo *ex vivo* de PBMCs apenas empezó a ser explorado bajo el presente trabajo. Si bien el modelo convencional usando líneas celulares de macrófagos es el estándar de oro para monitorear la susceptibilidad de los fármacos a nivel poblacional, el uso del modelo *ex vivo* con PBMCs de

pacientes es la estrategia óptima para evaluar y entender la respuesta a los anti-leishmaniales en uso y a nuevas alternativas terapéuticas.

- Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se planteó el uso del modelo *ex vivo* con PBMCs de pacientes para la optimización preclínica de fármacos de administración oral para el tratamiento de la LC en niños. La propuesta fue sometida a la Convocatoria de Colciencias para Proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud en el año 2014 y aprobada para financiación.
- En el presente trabajo se identificó un prototipo de nanopartícula que mostró mayor eficacia que HePC libre. Actualmente, se continúa en la evaluación de nuevos lotes de nanopartículas micelares con las características del prototipo identificado con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el presente estudio. Una vez confirmados los resultados de toxicidad y potencia se procederá a estudiar los mecanismos que pueden estar implicados en la mayor potencia como: internalización de las nanopartículas, ubicación en compartimentos sub-celulares, ensayos de liberación del fármaco y otros posibles mecanismos que expliquen su efectividad. Este trabajo es llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Tarek Fahmy de la Escuela de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Yale en Estados Unidos, con quienes se ha propuesto continuar el desarrollo preclínico de esta novedosa formulación.

## Bibliografia

1. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G (2013) Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog* 9: e1003053.
2. Kaye P, Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9: 604-615.
3. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
4. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, et al. (1990) Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 42: 206-214.
5. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, et al. (2002) Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 66: 738-744.
6. Ovalle CE, Porras L, Rey M, Rios M, Camargo YC (2006) [Geographic distribution of *Leishmania* species isolated from patients at the National Institute of Dermatology Federico Lleras Acosta E.S.E., 1995-2005]. *Biomedica* 26 Suppl 1: 145-151.
7. Haldar AK, Sen P, Roy S (2011) Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int* 2011: 571242.
8. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D (2011) *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res* 109: 1225-1232.
9. Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, et al. (2008) Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol* 47: 109-124.
10. Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, et al. (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266-1272.
11. Velez I, Lopez L, Sanchez X, Mestra L, Rojas C, et al. (2010) Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83: 351-356.
12. Rubiano LC, Miranda MC, Muvdi Arenas S, Montero LM, Rodriguez-Barraquer I, et al. (2012) Noninferiority of miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. *J Infect Dis* 205: 684-692.
13. Dorlo TP, van Thiel PP, Huitema AD, Keizer RJ, de Vries HJ, et al. (2008) Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2855-2860.

14. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, et al. (2008) Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 46: 223-231.
15. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO (2001) Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456-465.
16. Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J (2005) Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72: 421-422.
17. Machado PR, Ampuero J, Guimaraes LH, Villasboas L, Rocha AT, et al. (2010) Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e912.
18. Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, et al. (2008) Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 78: 210-211.
19. Maurer-Cecchini A, Decuypere S, Chappuis F, Alexandrenne C, De Doncker S, et al. (2009) Immunological determinants of clinical outcome in Peruvian patients with tegumentary leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Infect Immun* 77: 2022-2029.
20. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, et al. (2005) Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101: 226-230.
21. Dorlo TP, Huitema AD, Beijnen JH, de Vries PJ (2012) Optimal dosing of miltefosine in children and adults with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 3864-3872.
22. Dorlo TP, Eggelte TA, Schoone GJ, de Vries PJ, Beijnen JH (2012) A poor-quality generic drug for the treatment of visceral leishmaniasis: a case report and appeal. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1544.
23. Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, et al. (2007) Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846-1851.
24. Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, et al. (2005) The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg* 73: 272-275.
25. Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL (2002) Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81: 151-157.

26. Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, et al. (2010) In vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health* 15: 68-76.
27. Weigle K, Saravia NG (1996) Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol* 14: 433-450.
28. Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, et al. (1997) In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 827-830.
29. Carrio J, Portus M (2002) In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol* 2: 11.
30. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, et al. (2006) Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *J Infect Dis* 193: 1375-1383.
31. Bhandari V, Kulshrestha A, Deep DK, Stark O, Prajapati VK, et al. (2012) Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1657.
32. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, et al. (1998) Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 59: 86-94.
33. Patole S, Burza S, Varghese GM (2014) Multiple relapses of visceral leishmaniasis in a patient with HIV in India: a treatment challenge. *Int J Infect Dis* 25: 204-206.
34. Ritmeijer K, Veeken H, Melaku Y, Leal G, Amsalu R, et al. (2001) Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 668-672.
35. Escobar P, Yardley V, Croft SL (2001) Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1872-1875.
36. WHO (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Chapter 3.9: 67-71.
37. Isaza DM, Restrepo BN, Arboleda M, Casas E, Hinestroza H, et al. (1999) [Leishmaniasis: knowledge and practice in populations of the Pacific coast of Colombia]. *Rev Panam Salud Publica* 6: 177-184.

38. Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, del Pilar Agudelo S (2001) [Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia]. *Cad Saude Publica* 17: 171-180.
39. (2014) Leishmaniasis. Protocolo de vigilancia en salud pública. . In: Salud INd, editor Colombia: Instituto Nacional de Salud.
40. (2014) Informe del evento Leishmaniasis hasta el periodo epidemiológico 12. In: Salud INd, editor. Colombia: Instituto Nacional de Salud.
41. Alexander B, Usma MC, Cadena H, Quesada BL, Solarte Y, et al. (1995) Phlebotomine sandflies associated with a focus of cutaneous leishmaniasis in Valle del Cauca, Colombia. *Med Vet Entomol* 9: 273-278.
42. Munoz G, Davies CR (2006) *Leishmania panamensis* transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. *Biomedica* 26 Suppl 1: 131-144.
43. Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, et al. (2001) Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 159-162.
44. Alexande, Agudelo LA, Navarro F, Ruiz F, Molina J, et al. (2001) Phlebotomine sandflies and leishmaniasis risks in Colombian coffee plantations under two systems of cultivation. *Med Vet Entomol* 15: 364-373.
45. Moreira ED, Jr., de Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, et al. (2003) Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69: 393-397.
46. Bourreau E, Prevot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P (2001) High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis* 184: 1628-1630.
47. Bourreau E, Prevot G, Pradinaud R, Launois P (2001) Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis* 183: 953-959.
48. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, et al. (2009) Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol* 70: 383-390.
49. Saravia NG, Valderrama L, Labrada M, Holguin AF, Navas C, et al. (1989) The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis* 159: 725-735.

50. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.
51. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr., Schriefer A, Machado PR, et al. (2005) Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 7853-7859.
52. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, et al. (2002) Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740.
53. Diaz YR, Rojas R, Valderrama L, Saravia NG (2010) T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania* (Viannia) species. *J Infect Dis* 202: 406-415.
54. Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, et al. (2001) Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 69: 3232-3239.
55. Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CB, Costa JM, et al. (2011) Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85: 70-73.
56. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ (2004) Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136: 341-348.
57. Bourreau E, Prevot G, Gardon J, Pradinaud R, Hasagewa H, et al. (2002) LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun* 70: 3122-3129.
58. Gomes-Silva A, de Cassia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, et al. (2007) Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149: 440-444.
59. Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, et al. (2006) CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 193: 1313-1322.
60. Carneiro FP, De Magalhaes AV, De Jesus Abreu Almeida Couto M, Bocca AL, Muniz-Junqueira MI, et al. (2009) Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 646-651.
61. Social MdIP (2010) Guía de Atención de la Leishmaniasis. Colombia: Ministerio de la Protección Social.

62. Alvar J, Croft S, Olliaro P (2006) Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 61: 223-274.
63. Thakur CP, Narayan S, Ranjan A (2004) Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res* 120: 166-172.
64. Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA (2001) Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 913-916.
65. Denton H, McGregor JC, Coombs GH (2004) Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* 381: 405-412.
66. Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D (2001) Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 276: 3971-3976.
67. Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R (2004) *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* 279: 37445-37451.
68. Berman JD, Gallalee JV, Best JM (1987) Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 36: 197-201.
69. Walker J, Saravia NG (2004) Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *J Parasitol* 90: 1155-1162.
70. Cunningham ML, Fairlamb AH (1995) Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem* 230: 460-468.
71. Frezard F, Silva H, Pimenta AM, Farrell N, Demicheli C (2012) Greater binding affinity of trivalent antimony to a CCCH zinc finger domain compared to a CCHC domain of kinetoplastid proteins. *Metallomics* 4: 433-440.
72. Carter KC, Hutchison S, Boitelle A, Murray HW, Sundar S, et al. (2005) Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania donovani* correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. *Parasitology* 131: 747-757.
73. Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Banerjee S, et al. (2006) Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1788-1797.

74. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279: 39925-39932.
75. Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M (2005) Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 57: 1690-1699.
76. Mittal MK, Rai S, Ashutosh, Ravinder, Gupta S, et al. (2007) Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 76: 681-688.
77. Goyeneche-Patino DA, Valderrama L, Walker J, Saravia NG (2008) Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 4503-4506.
78. Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, et al. (1999) Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 34: 726-735.
79. Leprohon P, Legare D, Ouellette M (2009) Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2646-2649.
80. Genest PA, Haimeur A, Legare D, Sereno D, Roy G, et al. (2008) A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 158: 95-99.
81. Singh R, Kumar D, Duncan RC, Nakhasi HL, Salotra P (2010) Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. *Int J Antimicrob Agents* 36: 50-57.
82. Choudhury K, Zander D, Kube M, Reinhardt R, Clos J (2008) Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *Int J Parasitol* 38: 1411-1423.
83. Brochu C, Haimeur A, Ouellette M (2004) The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *leishmania*. *Cell Stress Chaperones* 9: 294-303.
84. Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, et al. (1999) Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 341: 1795-1800.
85. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M (2006) Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S26-33.

86. Cheeranl M, Sundarll S, Rijal S, Faiz A, Milletl P, Oliaro P. (2010) A review of clinical trials of treatments for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent (India, Bangladesh and Nepal). TropIKA.net.
87. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM (2007) Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 51: 1425-1430.
88. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR (2000) Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 111: 1-14.
89. Wright MM, Howe AG, Zaremborg V (2004) Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. Biochem Cell Biol 82: 18-26.
90. Luque-Ortega JR, Rivas L (2007) Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 51: 1327-1332.
91. Mukhopadhyay D, Das NK, Roy S, Kundu S, Barbhuiya JN, et al. (2011) Miltefosine effectively modulates the cytokine milieu in Indian post kala-azar dermal leishmaniasis. J Infect Dis 204: 1427-1436.
92. Mukherjee AK, Gupta G, Adhikari A, Majumder S, Kar Mahapatra S, et al. (2012) Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9. Int Immunopharmacol 12: 565-572.
93. Murray HW, Delph-Etienne S (2000) Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. J Infect Dis 181: 795-799.
94. Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, et al. (2003) Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). Int J Antimicrob Agents 22: 380-387.
95. Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S (2003) Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. J Biol Chem 278: 49965-49971.
96. Sanchez-Canete MP, Carvalho L, Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Castanys S (2009) Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. Antimicrob Agents Chemother 53: 1305-1313.
97. Perez-Victoria JM, Cortes-Selva F, Parodi-Talice A, Bavchvarov BI, Perez-Victoria FJ, et al. (2006) Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of

LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3102-3110.

98. Castanys-Munoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, Castanys S (2007) A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol* 64: 1141-1153.
99. Castanys-Munoz E, Perez-Victoria JM, 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. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3573-3579.
100. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67: 2576-2597.
101. Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, et al. (2006) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 9: 26-39.
102. Ashutosh, Sundar S, Goyal N (2007) Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* 56: 143-153.
103. Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimaraes LH, de Jesus AR, et al. (2010) Resistance of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. *BMC Infect Dis* 10: 209.
104. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, et al. (2012) In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet Parasitol* 187: 386-393.
105. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Canton R, Giske CG, et al. (2012) The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect* 18: E37-45.
106. Mesa CV MD, Echeverry M, Velez ID, Robledo SM. (2010) Susceptibilidad in vitro a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. *Rev Univ Ind Santander* 42.
107. Seifert K, Escobar P, Croft SL (2010) In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother* 65: 508-511.
108. WHO-PAHO (2014) Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis Nº 2 <http://newpaho.org/leishmaniasis>.

109. WHO (2010) Control of the leishmaniases. World Health Organ Tech Rep Ser: xii-xiii, 1-186, back cover.
110. Falagas ME, Tansarli GS, Rafailidis PI, Kapaskelis A, Vardakas KZ (2012) Impact of antibiotic MIC on infection outcome in patients with susceptible Gram-negative bacteria: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4214-4222.
111. Bhat SV, Peleg AY, Lodise TP, Jr., Shutt KA, Capitano B, et al. (2007) Failure of current cefepime breakpoints to predict clinical outcomes of bacteremia caused by gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4390-4395.
112. Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF (1992) Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* 165: 528-534.
113. Cojean S, Houze S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, et al. (2012) Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg Infect Dis* 18: 704-706.
114. Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, et al. (2012) Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis* 55: 543-550.
115. Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, et al. (2006) Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis* 194: 503-511.
116. Raman VS, Bhatia A, Picone A, Whittle J, Bailor HR, et al. (2010) Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 185: 1701-1710.
117. Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P (2002) Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun* 70: 2151-2158.
118. Berman JD, Wyler DJ (1980) An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J Infect Dis* 142: 83-86.
119. Vermeersch M, da Luz RI, Tote K, Timmermans JP, Cos P, et al. (2009) In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3855-3859.
120. Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, et al. (2000) Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol* 110: 195-206.

121. Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N (2005) Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3776-3783.
122. Cruz A, Rainey PM, Herwaldt BL, Stagni G, Palacios R, et al. (2007) Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. *J Infect Dis* 195: 602-608.
123. Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, et al. (2003) Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3073-3079.
124. Fernandez O, Diaz-Toro Y, Valderrama L, Ovalle C, Valderrama M, et al. (2012) Novel approach to in vitro drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. *J Clin Microbiol* 50: 2207-2211.
125. Liu MY, Wu MC (1992) Induction of human monocyte cell line U937 differentiation and CSF-1 production by phorbol ester. *Exp Hematol* 20: 974-979.
126. Senekji H (1939) Studies on the culture of *Leishmania tropica*. *Roy Soc Trop Med Hyg* 33: 267-269.
127. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA (1995) Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *J Infect Dis* 172: 1157-1159.
128. Seifert K, Croft SL (2006) In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 73-79.
129. Griewank K, Gazeau C, Eichhorn A, von Stebut E (2010) Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania* major amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 652-659.
130. German Drug Registration Authorities. Impavido 10/50 mg Kapseln— Fachinformation. <http://www.pharmnet-bund.de/dynamic/de/index.html> 2008. (15 February 2010, date last accessed).
131. Kotting J, Marschner NW, Neumuller W, Unger C, Eibl H (1992) Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. *Prog Exp Tumor Res* 34: 131-142.
132. Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG (1999) Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol* 85: 360-366.
133. Gonzalez D, Schmidt S, Derendorf H (2013) Importance of relating efficacy measures to unbound drug concentrations for anti-infective agents. *Clin Microbiol Rev* 26: 274-288.

134. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, et al. (2006) American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 194: 1168-1175.
135. Romero I, Tellez J, Suarez Y, Cardona M, Figueroa R, et al. (2010) Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
136. Berman JD, Neva FA (1981) Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 30: 318-321.
137. Scott P, Sacks D, Sher A (1983) Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 131: 966-971.
138. Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, et al. (1999) Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 180: 564-567.
139. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, et al. (2011) Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84: 255-260.
140. Rodriguez-Barraquer I, Gongora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, et al. (2008) Etiologic agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 78: 276-282.
141. Ferro C, Marin D, Gongora R, Carrasquilla MC, Trujillo JE, et al. (2011) Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 85: 847-856.
142. Oddone R, Schweynoch C, Schonian G, de Sousa Cdos S, Cupolillo E, et al. (2009) Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Clin Microbiol* 47: 2818-2825.
143. Rakotomalala R (2005) "TANAGRA: a free software for research and academic purposes". in *Proceedings of EGC'2005 [in French]* RNTI-E-3 2: 697-702.
144. Shah PM, Schafer V, Ziemen M, Krauskopf S (1992) Comparison of clinical response to ceftiofame treatment and minimum inhibitory concentration of causative isolates. Microbiological and Clinical Study Groups. *J Antimicrob Chemother* 29 Suppl A: 75-80.
145. Crump JA, Kretsinger K, Gay K, Hoekstra RM, Vugia DJ, et al. (2008) Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased

- susceptibility to fluoroquinolones: a United States foodnet multicenter retrospective cohort study. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1278-1284.
146. Vargas-Gonzalez A, Canto-Lara SB, Damian-Centeno AG, Andrade-Narvaez FJ (1999) Response of cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) to treatment with meglumine antimoniate in Southeast Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 61: 960-963.
  147. Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegao de Camargo R, Duarte MI, et al. (2009) Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23: 1026-1034.
  148. Matsumura Y, Sakai H, Sasaki M, Ban N, Inagaki N (2007) ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells. *FEBS Lett* 581: 3139-3144.
  149. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM (2012) Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 3: 301.
  150. Nylen S, Eidsmo L (2012) Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 34: 551-561.
  151. Ansari NA, Ramesh V, Salotra P (2008) Immune response following miltefosine therapy in a patient with post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 1160-1162.
  152. Shivahare R, Vishwakarma P, Parmar N, Yadav PK, Haq W, et al. (2014) Combination of liposomal CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine induces strong cell-mediated immunity during experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9: e94596.
  153. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, et al. (2001) Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65: 87-89.
  154. Mayrink W, Botelho AC, Magalhaes PA, Batista SM, Lima Ade O, et al. (2006) Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 14-21.
  155. Sikora JP (2002) Immunotherapy in the management of sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50: 317-324.
  156. Segal R, Dayan M, Zinger H, Mozes E (2001) Suppression of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) in mice via TNF inhibition by an anti-TNFalpha monoclonal antibody and by pentoxifylline. *Lupus* 10: 23-31.
  157. Machado PRL, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, et al. (2007) Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 44: 788-793.

158. Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, et al. (2014) Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg* 90: 617-620.
159. Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jungerkes F, Endl E, et al. (2006) Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol* 36: 12-20.
160. Waibler Z, Anzaghe M, Konur A, Akira S, Muller W, et al. (2008) Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN-alpha responses by pDC. *Eur J Immunol* 38: 3127-3137.
161. Vollmer J, Krieg AM (2009) Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 195-204.
162. Pourgholaminejad A, Jamali A, Samadi-Foroushani M, Amari A, Mirzaei R, et al. (2011) Reduced efficacy of multiple doses of CpG-matured dendritic cell tumor vaccine in an experimental model. *Cell Immunol* 271: 360-364.
163. Jahrsdorfer B, Weiner GJ (2008) CpG oligodeoxynucleotides as immunotherapy in cancer. *Update Cancer Ther* 3: 27-32.
164. Fonseca DE, Kline JN (2009) Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 256-262.
165. Moreno E, Schwartz J, Fernandez C, Sanmartin C, Nguewa P, et al. (2014) Nanoparticles as multifunctional devices for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv* 11: 579-597.
166. Torchilin V (2009) Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm* 71: 431-444.
167. Song X, Zhao X, Zhou Y, Li S, Ma Q (2010) Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Curr Drug Metab* 11: 859-869.
168. Franca A, Aggarwal P, Barsov EV, Kozlov SV, Dobrovolskaia MA, et al. (2011) Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro. *Nanomedicine (Lond)* 6: 1175-1188.
169. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, et al. (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28: 869-876.
170. Chen W, Meng F, Cheng R, Zhong Z (2010) pH-Sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: a comparative study with micelles. *J Control Release* 142: 40-46.

171. Dorlo TP, Hillebrand MJ, Rosing H, Eggelte TA, de Vries PJ, et al. (2008) Development and validation of a quantitative assay for the measurement of miltefosine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 865: 55-62.
172. Sambor A, Garcia A, Berrong M, Pickeral J, Brown S, et al. (2014) Establishment and maintenance of a PBMC repository for functional cellular studies in support of clinical vaccine trials. *J Immunol Methods* 409: 107-116.
173. Boyum A (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 5: 9-15.
174. Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J (2005) Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* 141: 298-306.
175. Landrigan A, Yiu G, Agarwal K, Utz PJ (2012) Therapeutic Toll-like receptor agonists directly influence mouse and human T cell lymphoma cell viability and cytokine secretion. *Leuk Lymphoma* 53: 166-168.
176. Romero IC, Saravia NG, Walker J (2005) Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis* in vitro. *J Parasitol* 91: 1474-1479.
177. Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G (2000) Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol* 51: 533-541.
178. Rodriguez-Pinto D, Saravia NG, McMahon-Pratt D (2014) CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania (Viannia)* infection. *BMC Infect Dis* 14: 108.
179. Osorio Y, Travi BL, Renslo AR, Peniche AG, Melby PC (2011) Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel ex vivo splenic explant model system. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e962.
180. Brachelente C, Muller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M (2005) Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol* 42: 166-175.
181. Nelson KG, Bishop JV, Ryan RO, Titus R (2006) Nanodisk-associated amphotericin B clears *Leishmania* major cutaneous infection in susceptible BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1238-1244.
182. Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D (1992) An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop* 51: 237-245.

183. Murray HW, Montelibano C, Peterson R, Sypek JP (2000) Interleukin-12 Regulates the Response to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 182: 1497-1502.
184. Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN (2008) Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol* 8: 1633-1638.
185. Fan K, Borden E, Yi T (2009) Interferon-gamma is induced in human peripheral blood immune cells in vitro by sodium stibogluconate/interleukin-2 and mediates its antitumor activity in vivo. *J Interferon Cytokine Res* 29: 451-460.
186. Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S, et al. (2009) Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol* 182: 7146-7154.
187. Salhi A, Rodrigues V, Jr., Santoro F, Dessein H, Romano A, et al. (2008) Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 180: 6139-6148.
188. Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Lozano C, Valderrama L, Saravia NG, et al. (2010) Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: Role of IL-13 in disease. *European Journal of Immunology* 40: 2816-2829.
189. de Assis Souza M, de Castro MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, et al. (2013) Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* 57: 27-32.
190. Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, et al. (2014) Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infect Immun* 82: 2872-2880.
191. Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, et al. (2006) Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1788-1797.
192. Garcia-Cordoba F, Ortuno FJ, Segovia M, Gonzalez Diaz G (2005) Fatal visceral leishmaniasis, with massive bone-marrow infection, in an immunosuppressed but HIV-negative Spanish patient, after the initiation of treatment with meglumine antimoniate. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 125-130.
193. Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, et al. (2006) A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin Infect Dis* 43: 357-364.

194. Tuon FF, Sabbaga Amato V, Floeter-Winter LM, de Andrade Zampieri R, Amato Neto V, et al. (2007) Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids - first report. *Int J Dermatol* 46: 628-630.
195. D'Hellencourt CL, Diaw L, Cornillet P, Guenounou M (1996) Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. *Int J Immunopharmacol* 18: 739-748.
196. Gutierrez-Reyes G, Lopez-Ortal P, Sixtos S, Cruz S, Ramirez-Iglesias MT, et al. (2006) Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol* 63: 461-467.
197. Ribeiro de Jesus A, Luna T, Pacheco de Almeida R, Machado PR, Carvalho EM (2008) Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in Leishmania and HTLV-I infections. *Int Immunopharmacol* 8: 1344-1353.
198. Kim SJ, Kim JW, Kim YH, Lee SH, Yoon HK, et al. (2009) Effects of tranilast and pentoxifylline in a mouse model of chronic asthma using house dust mite antigen. *J Asthma* 46: 884-894.
199. Vollmer J, Rankin R, Hartmann H, Jurk M, Samulowicz U, et al. (2004) Immunopharmacology of CpG oligodeoxynucleotides and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2314-2317.
200. Zhou X, Porter AL, Robinson DK, Shim MS, Guo Y (2014) Nano-enabled drug delivery: a research profile. *Nanomedicine* 10: 889-896.
201. Espuelas S (2015) Conventional formulations and emerging delivery systems for the topical treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Ther Deliv* 6: 101-103.
202. Varela JA, Bexiga MG, Aberg C, Simpson JC, Dawson KA (2012) Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *J Nanobiotechnology* 10: 39.
203. Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Arimori A, et al. (2010) Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie* 65: 199-201.
204. Frohlich E (2012) The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7: 5577-5591.
205. Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* 7: 657-663.
206. Akesson A, Lind TK, Barker R, Hughes A, Cardenas M (2012) Unraveling dendrimer translocation across cell membrane mimics. *Langmuir* 28: 13025-13033.

207. Want MY, Islamuddin M, Chouhan G, Ozbak HA, Hemeg HA, et al. (2015) Therapeutic efficacy of artemisinin-loaded nanoparticles in experimental visceral leishmaniasis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 130: 215-221.
208. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, et al. (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 161: 505-522.
209. Papagiannaros A, Bories C, Demetzos C, Loiseau PM (2005) Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomed Pharmacother* 59: 545-550.
210. Borborema SE, Schwendener RA, Osso JA, Jr., de Andrade HF, Jr., do Nascimento N (2011) Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania (Leishmania)* major-infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 38: 341-347.

## Anexos

### Publicaciones derivadas de la investigación:

1. González-Fajardo L, **Fernández OL**, McMahon-Pratt D., Gore Saravia N. 2015. *Ex vivo* host and parasite response to antileishmanial drugs and immunomodulators. PLoS Negl Trop Dis. 9(5):e0003820.
2. **Fernández OL**; Diaz-Toro Y; Ovalle C; Valderrama L; Muvdi S; Rodriguez I; Gomez, MA; Saravia NG. 2014. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 8(5):e2871
3. Obonaga R, **Fernández OL**; Valderrama L; Rubiano LC; Castro MD; Barrera MC; Gomez MA; Saravia NG. 2014. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia* species. Antimicrob Agents Chemother. 58(1):144-152
4. **Fernández OL**; Diaz-Toro Y; Valderrama L; Ovalle C; Valderrama M; Castillo H; Perez M; Saravia NG. 2012. Novel approach to *in vitro* drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. J Clin Microbiol. 50(7):2207-2211

Los artículos se adjuntan al documento.

### **Aporte en la formación de jóvenes investigadores**

Ricardo Obonaga Gómez. Estudio piloto de la sensibilidad de aislados clínicos Colombianos de *Leishmania Viannia* a HePC. Proyecto Joven Investigador Colciencias – CIDEIM.

Actualmente estudiante de Doctorado en Biología Celular y Molecular- Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Laura González Fajardo. Evaluación *in vitro* de la actividad anti-leishmania de combinaciones de medicamentos y compuestos inmunomoduladores con potencial como formulaciones tópicas. Proyecto Joven Investigador Colciencias – CIDEIM. Actualmente estudiante de Doctorado Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Connecticut, Estados Unidos.