

Descripción del patrón de susceptibilidad *in vitro* de *Leishmania Leishmania amazonensis* a antimoniato de meglumina en pacientes colombianos



Presentado por:

LAURA XIMENA LAMPREA BARRAGÁN

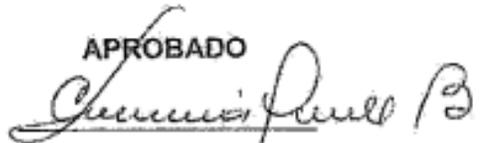
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA
BACTERIOLOGÍA BOGOTÁ D.C.**

Descripción del patrón de susceptibilidad *in vitro* de *Leishmania Leishmania amazonensis* a antimonio de meglumina en pacientes colombianos

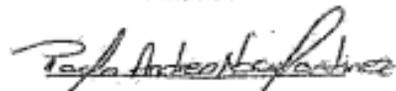


LAURA XIMENA LAMPREA BARRAGÁN

APROBADO


Clemencia Ovalle B.
Director


Claudia Colorado S.
Codirector


Paola Nocua M.
Jurado

Asesor: Claudia L. Cuervo

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA
BACTERIOLOGÍA BOGOTÁ D.C.**

2019

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a mis padres por ser siempre un apoyo y motivación incondicional para lograr cada uno de mis objetivos.
- A Clemencia Ovalle, por darme la confianza, la paciencia y la oportunidad de permitirme realizar este proyecto bajo su dirección, siguiendo sus consejos, lecciones y enseñanzas.
- Quiero agradecer a Daniel Pardo, porque fue una de las personas que contribuyó en mi proceso de formación y además quien me ayudó desde el principio hasta el final de este trabajo.
- A Claudia Cuervo, por su acompañamiento y por darme la oportunidad de ver que puedo seguir escalando.
- A mis compañeros del grupo de investigación de Enfermedades Infecciosas por sus aportes, enseñanzas y acompañamiento.
- A mis hermanos, por sus palabras de aliento y su compañía durante todo este proceso.
- A Claudia Colorado, por su ayuda para este proyecto.

Tabla de Contenido

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Problema de investigación	8
4. Justificación	10
5. Marco Teórico.....	11
Marco Conceptual	11
5.1 Leishmaniasis.....	11
5.2 Epidemiología.....	13
5.3 Especies de <i>Leishmania</i> en Colombia:	14
5.4 Manifestaciones Clínicas.....	14
5.5 Medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis actualmente utilizados en Colombia	16
5.6 Variación de la respuesta clínica a antimoniales pentavalentes:	18
5.7 Evaluación de la susceptibilidad <i>in vitro</i> a medicamentos de las especies de <i>Leishmania</i> circulantes en Colombia:.....	18
6. Objetivos.....	20
7. Metodología.....	20
Diseño del estudio.....	20
8. Resultados	25
8.1 Cálculo de la Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀)	28
9. Discusión.....	30
10. Conclusiones.....	34
11. Perspectivas.....	34
12. Bibliografía.....	35

1. Resumen

Las leishmaniasis es un problema de salud pública que afecta a más de 350.000.000 millones de personas en el mundo, los antimoniales pentavalentes son los medicamentos de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad desde hace 60 años. Se ha demostrado que la susceptibilidad al Glucantime® varía de acuerdo a la especie infectante, así como intra especie. En Colombia se han realizado estudios de susceptibilidad a los antimonios pentavalentes a las especies del subgénero *Viannia* pero no se conoce la línea base de susceptibilidad para especies del subgénero *Leishmania*. En este sentido la presente propuesta tenía como objetivo evaluar la susceptibilidad *in vitro* de *Leishmania Leishmania amazonensis* al Glucantime®.

Por lo cual se determinó la susceptibilidad *in vitro* de 10 aislamientos de pacientes colombianos de *L. (L.) amazonensis* al antimonio de meglumina, en el modelo macrófago-leishmania. La evaluación del efecto del medicamento se realizó con base en el porcentaje de macrófagos infectados posterior a la exposición a diferentes concentraciones del medicamento. Los resultados se analizaron con base en un modelo de regresión no lineal y se expresaron en CI_{50} .

La CI_{50} (es la concentración del medicamento capaz de inhibir el 50 % de los parásitos), para tres de los aislamientos tuvo un rango de 36,92 - 105,5 $\mu\text{g/mL}$ y los otros siete aislamientos presentaron una CI_{50} por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$. En tres de los aislamientos evaluados se evidenció diferencias intra especie en la susceptibilidad al medicamento.

La evaluación de la susceptibilidad *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* al Glucantime® permitió realizar una aproximación al conocimiento de la línea base de susceptibilidad de este grupo de aislamientos de pacientes colombianos al determinar el valor mínimo de susceptibilidad y conocer que el valor máximo de susceptibilidad está por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Este es el primer estudio realizado en especies del subgénero *Leishmania* en Colombia y es un punto de partida para a futuro vigilar el cambio de susceptibilidad de esta especie al Glucantime®.

2. Introducción

La leishmaniasis es un problema de salud pública a nivel mundial, es endémica en 98 países y hay cerca de 350.000.000 de personas en riesgo de transmisión (1). La enfermedad es causada por el parasitismo de un protozoo flagelado del género *Leishmania* y transmitido por un vector hematófago del género *Lutzomyia* (1); esta enfermedad presenta diferentes manifestaciones clínicas: leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral (1). En Colombia en el año 2018 se reportaron 6.319 casos de leishmaniasis cutánea (2), siendo esta forma clínica la de mayor frecuencia en el país (1). El diagnóstico de la enfermedad mediante la comprobación parasitológica y la identificación de la especie infectante es esencial para establecer un tratamiento específico que evite secuelas y en algunos casos la muerte. Los medicamentos más utilizados en Colombia para el tratamiento de esta enfermedad son en su orden: antimoniales pentavalentes, miltefosina, isetionato de pentamidina y anfotericina B. Entre los antimoniales pentavalentes hay dos variantes, estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina, siendo este último el medicamento de primera línea en el país para el tratamiento de esta patología (3). Este ha sido utilizado por más de 60 años (4) y en consecuencia se han reportado fallas en la respuesta terapéutica, la cual es multifactorial y se asocia con: la respuesta inmune del paciente, la cinética de los medicamentos, la adherencia al tratamiento y la susceptibilidad intrínseca a los medicamentos de la especie infectante (5). En Colombia se han realizado estudios para evaluar la línea base de susceptibilidad de las especies del subgénero *Viannia* a los medicamentos en uso (6), sin embargo, no se conoce la línea base de

susceptibilidad de *L. (L.) amazonensis*, especie del subgénero *Leishmania*, lo cual se planteó como el objetivo de este trabajo.

3. Problema de investigación

Las leishmaniasis son enfermedades que afectan la piel, las mucosas y las vísceras, resultante del parasitismo de los macrófagos por un protozoo flagelado del género *Leishmania* (1). A nivel mundial se registran 1,3 millones de casos nuevos de leishmaniasis y de 20.000 a 30.000 muertes cada año (1). En Colombia, en el año 2019 el instituto Nacional de Salud reportó 3.720 casos de leishmaniasis cutánea con una incidencia de 32,5 casos por cada 100.000 habitantes. Es de resaltar que la incidencia en niños menores de 10 años fue de 22,4 casos por cada 100.000 habitantes (2).

Las presentaciones clínicas de la enfermedad varían de acuerdo con la especie parasitaria, la respuesta inmune del hospedero y el estado evolutivo de la enfermedad (7). En Colombia circulan nueve especies del parásito las cuales se han asociado a las diferentes formas clínicas, en una revisión reciente se encontró que *L. (L.) amazonensis* es la segunda especie con mayor frecuencia del subgénero *Leishmania* en Colombia (8).

La forma clínica más frecuente de esta enfermedad es la leishmaniasis cutánea (LC), la cual presenta cuatro cuadros clínicos: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea diseminada (LD), leishmaniasis cutánea atípica (LCA) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (1 y 7). Esta última en las Américas ha sido reportada en Brasil, Costa Rica, Ecuador, Venezuela, México, República Dominicana, Perú y Colombia (1). La LCD es producida principalmente por *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana*, es la forma anérgica de la enfermedad, es decir que, por condiciones inmunológicas del paciente, no responde de forma adecuada ante la infección, también la respuesta del hospedero al tratamiento es transitoria con frecuentes recaídas (1). *L. (L.) amazonensis*

también se ha asociado con leishmaniasis mucosa, forma clínica complicada de la enfermedad que puede causar desfiguración y discapacidad grave (1). En Colombia se reportó el primer caso de leishmaniasis mucosa causado por *L. (L.) amazonensis*, esta forma clínica es de difícil tratamiento y genera daños graves en el paciente (7 y 9).

Respecto al tratamiento de las leishmaniasis, actualmente la disponibilidad de medicamentos es reducida, los medicamentos en Colombia son: antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina), miltefosina, isetionato de pentamidina y anfotericina B liposomal (3). Los antimoniales pentavalentes son los medicamentos de primera línea en el tratamiento de esta enfermedad y han sido usados mundialmente como monoterapia por más de seis décadas a pesar de su alto costo, posología desfavorable (administración parenteral por 20 días) y toxicidad. La resistencia de *Leishmania* a antimoniales ha sido documentada en Colombia para especies del subgénero *Viannia* (6), una de las posibles causas de la resistencia de los parásitos a los medicamentos es el uso prolongado de estos para el tratamiento de la enfermedad, es el caso específico del uso prolongado del antimoniato de meglumina para el tratamiento de la leishmaniasis (10).

En Colombia en un trabajo realizado por Fernández OL. y colaboradores (6), se evaluó el perfil de susceptibilidad *in vitro* de especies del subgénero *Viannia*, (*L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*) a la miltefosina y al antimoniato de meglumina, sin embargo, no se ha evaluado la susceptibilidad de las especies del subgénero *Leishmania* como es *L. (L.) amazonensis* y no se conoce el perfil de susceptibilidad de esta especie a antimoniato de meglumina, el cual es el tratamiento de primera línea en Colombia.

4. Justificación

Se reporta que en los últimos 30 años ha sido necesario un incremento de 600% en la dosis de antimonio de meglumina en el mundo para observar efectos terapéuticos, lo que sugiere que los parásitos se vuelven cada vez menos sensibles y que de alguna manera esta característica se podría estar extendiendo (11).

La resistencia a un medicamento se entiende como la disminución en la efectividad del compuesto sobre una población de parásitos que previamente eran susceptibles, con base en esto se considera que el patrón de susceptibilidad intrínseco de la especie del parásito es conocido. La falla terapéutica al tratar a los pacientes es multifactorial y es de resaltar la susceptibilidad intrínseca del parásito al medicamento considerando que la sensibilidad de las especies de *Leishmania* a medicamentos es variable, la determinación del patrón de susceptibilidad intrínseca *L. (L.) amazonensis* al antimonio de meglumina permitiría establecer una primera aproximación a la línea base de susceptibilidad de esta especie al antimonio de meglumina.

Lo anterior permitiría tener el punto de partida para monitorear o confirmar la aparición de resistencia como consecuencia del uso del medicamento. Aunque el problema de resistencia de los parásitos a los medicamentos es global, los desafíos relacionados con susceptibilidad y resistencia deben enfrentarse de manera local teniendo en cuenta la variabilidad genética del parásito dependiendo de la zona geográfica donde circulan. A mediano plazo el conocimiento de la susceptibilidad *in vitro* pre tratamiento y post-tratamiento en pacientes con falla terapéutica daría la posibilidad de aproximarse a la comprobación de resistencia adquirida lo cual podría evitar los segundos ciclos de tratamiento y permitiría la búsqueda de nuevas alternativas disponibles, mejorando así la elección de los procesos de curación que se brindan a los pacientes con esta enfermedad.

5. Marco Teórico

Marco Conceptual

5.1 Leishmaniasis.

Las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas que causan en el humano un conjunto de formas clínicas que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* y se transmiten a los animales y humanos a través de insectos de la subfamilia *Phlebotomus* de la familia *Psychodidae*, y del género *Lutzomyia* en América (1). El parásito perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* del género *Leishmania* comprende alrededor de 22 especies patógenas al hombre, las cuales se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (1).

En el Nuevo Mundo han sido identificadas 15 especies de *Leishmania* con diferente tropismo: visceral, cutáneo y mucoso (1 y 7). El parásito durante su ciclo de vida se encuentra en dos formas o estadios: una forma promastigote (Imagen 1) que mide entre 20 y 30 μm , es extracelular y alargada, y posee un flagelo que le permite la movilidad en el intestino de los insectos vectores y otra forma el amastigote (Imagen 2), la cual mide entre 2 y 5 μm , es redondeada e intracelular, carece de flagelo, y se multiplica en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente macrófagos. Ambas formas del parásito se dividen por fisión binaria y además poseen una única mitocondria modificada conocida como kinetoplasto (1).

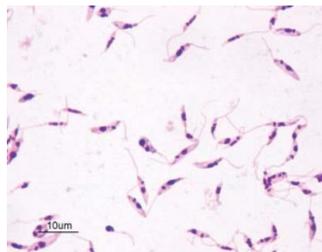


Imagen 1: *Leishmania* - Forma promastigote. Fuente: CLIOC - IOC - Fiocruz, Brasil Tomado de: OPS/OMS (2019): Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (1).



Imagen 2: Leishmania - Forma amastigote. Fuente: Laboratorio de Pesquisa en Leishmaniose IOC - Fiocruz, Brasil
Tomado de: OPS/OMS (2019): Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (1).

El parasito se trasmite a los mamíferos por la picadura de flebótomos hembra infectados, que inyectan el estadio infectivo promastigotes metacíclicos, mientras succiona la sangre los promastigotes son fagocitados por los macrófagos y otro tipo de células fagociticas mononucleares y se diferencian a amastigotes. Los amastigotes infectan otras células fagociticas. El insecto se infecta al ingerir células que contienen amastigotes, en el vector los amastigotes se diferencian a promastigotes en el intestino, las especies del subgénero *Viannia* en la parte posterior y las especies del subgénero *Leishmania* en el intestino medio, los promastigotes metacíclicos migran a la probóscide (Imagen 3) (1).

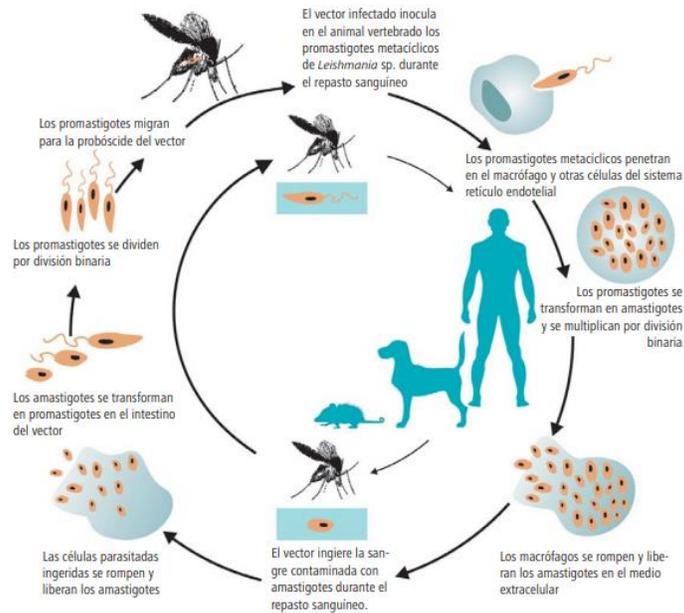


Imagen 3: Ciclo de vida de *Leishmania sp.* en las Américas. Tomado de: OPS/OMS (2019): Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (1).

5.2 Epidemiología.

La leishmaniasis está presente en los cinco continentes y son endémicas en 102 países o territorios. Se estima que cerca de 350.000.000 de personas viven en regiones en las que existe el riesgo de adquirir la infección (1). Se registran 1,3 millones de casos nuevos de leishmaniasis y de 20.000 a 30.000 muertes cada año (1). El 95% de los casos de leishmaniasis cutáneas ocurre entre las Américas, el Mediterráneo y el Centro y Medio Este de Asia (1). Por su parte, la leishmaniasis mucosa ocurre principalmente en la región de las Américas siendo Bolivia, Brasil y Perú los países con mayores registros de esa forma clínica. Durante el período de 2001 al 2017 se registraron 940.396 casos de LC en las Américas (1). En 2017 fueron reportados al Sistema Regional de Informaciones de leishmaniasis de la OPS/WHO 49.959 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa (1), de los cuales el 41,3% se localizaron en los países de la Región Andina (20.636/49.959), 35,9% en el Cono Sur (17.924/49.959), 20,8% en Centro América (10.404/49.959) y los demás

casos en México y países del Caribe No-Latino. Los países que registran el mayor número de casos son Brasil (17.526), seguido por Colombia (7.764) y Perú (6.631) (1 y 7).

En Colombia en el año 2018 el instituto Nacional de Salud reportó 3.720 casos y una incidencia de 32,5 casos de leishmaniasis cutánea por cada 100.000 habitantes, es de resaltar que la incidencia en niños menores de 10 años fue de 22,4 casos por cada 100.000 habitantes (2).

5.3 Especies de *Leishmania* en Colombia:

En Colombia se han descrito 9 especies de *Leishmania*, en su orden de frecuencia: *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (V.) equatorensis* (12 y 13). Se distribuyen en todas las zonas geográficas excepto en la zona insular.

L. (L.) amazonensis, especie objeto de estudio en este trabajo, se ha reportado en Antioquia, Boyacá, Chocó, Meta, Nariño, Norte de Santander, Tolima, Valle del Cauca, Caquetá, Casanare, Cauca, Cundinamarca, y Guaviare (8 y 14).

L. (L.) amazonensis, en Colombia se ha asociado con diferentes cuadros clínicos entre estos leishmaniasis cutánea en su forma clínica variante leishmaniasis cutánea difusa y recientemente, por primera vez se reportó un caso de leishmaniasis mucosa causado por esta especie (1 y 9).

5.4 Manifestaciones Clínicas.

La leishmaniasis puede presentar diversos cuadros clínicos: Leishmaniasis Visceral (LV), Leishmaniasis Mucosa (LM) y Leishmaniasis Cutánea, esta última a su vez tiene cuatro cuadros clínicos: Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL), Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LD), Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) y Leishmaniasis Cutánea Atípica (LCA) (1 y 7).

A continuación, se describen las dos formas clínicas con las que se asocia *L. (L.) amazonensis*:

- **Leishmaniasis mucosa:**

En Colombia las especies principalmente asociadas a esta forma clínica en su orden son *L. (V.) brasilienses*, *L. (V.) panamensis* y un primer caso de *L. (L.) amazonensis* (1 y 9).

Esta forma clínica de la enfermedad generalmente es crónica y afecta las mucosas de la nariz y la boca y, en los casos más serios, la laringe, la tráquea y los bronquios.

La mayoría de las lesiones mucosas aparecen en los dos primeros años después de haber cicatrizado la lesión cutánea. Cuando se afecta la mucosa nasal hay sensación de nariz tapada, prurito o dolor, costras sero-hemáticas, escurrimiento muco-sanguinolento o franca hemorragia. El eritema, el edema y la infiltración producen aumento del volumen de la punta de la nariz y las alas nasales; ocasionalmente puede extenderse más allá del surco nasogeniano hasta las mejillas. La lesión puede progresar hasta perforar el tabique; incluso puede destruir todas las estructuras, causando una grave deformidad, con la punta de la nariz caída y gruesa, simulando la nariz del tapir (1).

- **Leishmaniasis cutánea difusa:**

La LCD es una forma clínica que ha sido reportada en varios países como: Brasil, Venezuela, México, República Dominicana, Perú y Colombia y puede ser causada por *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* y *L. (V.) braziliensis* (1).

Esta se caracteriza por la presencia de abundantes lesiones ricas en parásitos. Al inicio se manifiesta a través de pápulas o placas en un segmento de la superficie corporal, pero en unos meses puede extenderse

a otras partes de la piel. Las lesiones son principalmente de tipo nodular y placas que se asemejan a la lepra lepromatosa (Imagen 4). La respuesta al tratamiento es transitoria con frecuentes recaídas (1 y 7).



Imagen 4: Leishmaniasis cutánea difusa: lesiones nódulo-tumoral localizadas en las piernas, Lesiones con aspecto vegetativo, asociado con exulceraciones. Fuente: J. M. L. Costa Tomado de: OPS/OMS (2019): Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (1).

5.5 Medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis actualmente utilizados en Colombia

Los tratamientos para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis actualmente en Colombia son:

Antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina), miltefosina, isetionato de pentamidina y anfotericina B liposomal (3).

Los antimoniales pentavalentes son de primera elección para todas las formas clínicas, sin embargo, cuando hay falla terapéutica con este medicamento, se recomienda administrar como segunda línea miltefosina vía oral, isetionato de pentamidina por vía intramuscular o endovenosa o anfotericina B liposomal (3).

Antimoniato de meglumina

Este medicamento contiene 81 mg/mL de antimonio pentavalente (SbV), molécula que actúa sobre el parásito. Su aplicación es vía intramuscular por inyección, intravenosa por infusión o inyección lenta con aguja fina para evitar todo riesgo de trombosis debido a su mala absorción y alta irritabilidad que puede afectar el sistema gastrointestinal. Ha sido usado

como medicamento de primera línea para esta enfermedad, la dosis actual de acuerdo a los lineamientos del Ministerio de Salud y Protección Social es de 20 mg/kg/día de SbV, por vía intramuscular o intravenosa, con una duración de 20 días (3 y 7).

Mecanismo de acción

El blanco de los agentes quimioterapéuticos en leishmaniasis es el amastigote intracelular, ya que este al evadir los mecanismos naturales de destrucción del macrófago puede sobrevivir y multiplicarse dentro de la vacuola parasitófora de esta célula (15).

El SbV se reduce dentro del amastigote en antimonio trivalente (SbIII), compuesto que es más tóxico para el parásito ejerciendo su acción sobre la enzima reductasa dependiente del tiol (TDR1) y por la inhibición de la tripanotión reductasa. De este modo, se afecta la vía del metabolismo tiol que participa en la síntesis de deoxirribonucleotidos, en la conjugación, secuestro y transporte de metales y medicamentos, y en la depuración de radicales tóxicos del oxígeno; quedando el parásito expuesto intracelularmente a la acción de los radicales reactivos del oxígeno, causando su muerte (Imagen 5) (15 y 16).

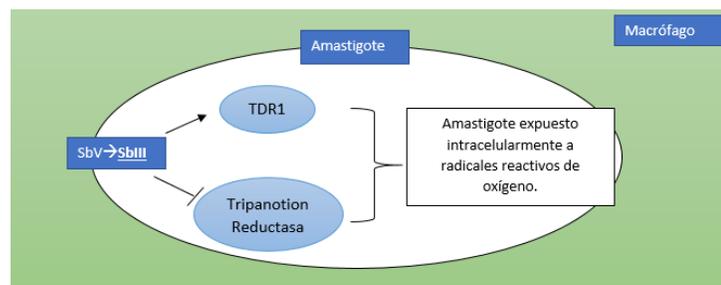


Imagen 5: Realizada por Laura Ximena Lamprea adecuada de Croft SL. Drug Resistance in Leishmaniasis

5.6 Variación de la respuesta clínica a antimoniales pentavalentes:

La variación en la respuesta clínica a los antimoniales pentavalentes tiene múltiples causas, entre ellas, los factores del huésped, del parásito, como la susceptibilidad intrínseca, factores relacionados con los medicamentos dado su uso por más de seis décadas y la dosificación inadecuada, lo cual además puede generar falla terapéutica (5 y 17).

Se han reportado fallas en el tratamiento en zonas endémicas, y se ha reportado la resistencia del parásito tanto en especies del subgénero *Viannia* como del subgénero *Leishmania* a los antimoniales pentavalentes, es importante resaltar que estos parásitos pueden generar esta resistencia a estos medicamentos aun cuando no han sido expuestos y es lo que se denomina resistencia intrínseca (5 y 18).

5.7 Evaluación de la susceptibilidad *in vitro* a medicamentos de las especies de *Leishmania* circulantes en Colombia:

Se han realizado múltiples estudios a nivel mundial de susceptibilidad *in vitro* a medicamentos en especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* y *Leishmania*, principalmente para Glucantime® han realizado diversos reportes en las especies de *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) donovani* (19-24).

En América Latina se han reportado estudios en Brasil de susceptibilidad *in vitro* al antimonio pentavalente, Glucantime®, anfotericina B y miltefosina en las especies de *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* en un trabajo realizado por Rogeria C.ZN. y colaboradores (19) determinaron la CI_{50} , y encontraron que para *L. (V.) braziliensis* el rango de susceptibilidad para el Glucantime® fue de 18,5 µg/mL – 59,8 µg/mL y para *L. (L.) amazonensis* de 112,2 µg/mL -146 µg/mL por lo que sugirieron que *L. (L.) amazonensis* era menos susceptible al medicamento que *L. (V.) braziliensis* (19). En otro

estudio en Brasil reportado por Rugani JN. y colaboradores (25) evaluaron la susceptibilidad *in vitro* de aislados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad a Glucantime®, anfotericina B y miltefosina. Los autores encontraron que las cepas eran susceptibles a anfotericina B y a miltefosina, para el Glucantime® reportaron un rango de CI_{50} entre 2,75 - > 32 μ M. Los autores consideraron que los aislamientos fueron sensibles a anfotericina B y miltefosina, sin embargo, 4 de los 12 aislamientos estudiados los consideraron resistentes al Glucantime®. Los autores resaltan la variabilidad intrínseca en la susceptibilidad a los medicamentos intra especie y el impacto que podría tener en los resultados clínicos en el tratamiento (25).

En Colombia hay publicaciones que reportan estudios en los que evalúan los antimoniales pentavalentes y miltefosina en las especies del subgénero *Viannia*: *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis*, en donde reportaron que la susceptibilidad a cada medicamento difirió entre cepas de la misma especie y entre especies lo cual proporcionó información para monitorear la susceptibilidad a estos medicamentos, dado que demostró diferencias en las especies, la población, y las características epidemiológicas en la susceptibilidad al antimonio de meglumina y la miltefosina (6). También se ha evaluado la susceptibilidad a la anfotericina B en especies del subgénero *Viannia* en donde reportan una CE_{50} para cepas que las clasificaron como sensibles y menos sensibles para la especie de *L.(V.) panamensis* con un valor de 0,2163 μ g/MI y 1,679 μ g / mL respectivamente dado a que presentan una variabilidad en la línea base de susceptibilidad entre especies e intra especies (26).

Si bien se han realizado diversos estudios de susceptibilidad *in vitro* a diferentes medicamentos no es tarea fácil compararlos, dado que la evaluación de susceptibilidad difiere en la metodología utilizada, los modelos de ensayo, la infección de macrófagos y las concentraciones del medicamento entre otros (27).

No se encontraron estudios de susceptibilidad *in vitro* para *L. (L.) amazonensis* a los antimoniales pentavalentes en Colombia.

6. Objetivos

Objetivo General

Describir la susceptibilidad intrínseca *in vitro* al antimonio de meglumina de 10 aislamientos de *L. (L.) amazonensis* procedentes de pacientes que no han recibido tratamiento para leishmaniasis.

Objetivo específico:

Estimar la susceptibilidad intrínseca de 10 aislamientos de *L. (L.) amazonensis* de pacientes que no han recibido tratamiento para la leishmaniasis.

7. Metodología

Diseño del estudio

Este estudio descriptivo fue diseñado para determinar el patrón de susceptibilidad de 10 cepas de *L. (L.) amazonensis* al antimonio de meglumina a partir de aislamientos de pacientes que adquirieron la enfermedad en diferentes zonas del país.

Población de estudio:

Todas las cepas fueron aisladas de pacientes diagnosticados con leishmaniasis cutánea que no habían recibido ningún tipo de tratamiento para la enfermedad, los aislamientos fueron conservados en nitrógeno líquido en el biobanco del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta. La susceptibilidad *in vitro* fue evaluada dentro de máximo 6 pases desde el aislamiento. La identificación de la especie fue realizada por electroforesis

de isoenzymas y PCR del gen miniexon. La procedencia epidemiológica abarcó al menos una muestra de 4 de las 6 regiones naturales del país. Amazonía (San José del Guaviare y San José de Fragua municipios del Guaviare y Caquetá respectivamente), Andina (Villeta y Nimaima, municipios de Cundinamarca), Caribe (Bolívar) y Orinoquía (Monterrey, Tauramena, Casanare).

Aspectos Éticos

Este proyecto fue aprobado y monitoreado por el Comité de Ética en investigación del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta.

Cepa Control

Cepa de referencia sensible de *L. (L.) amazonensis*, IFLA/BR/1967/PH8, la cepa fue aislada del vector *Lutzomyia flaviscutellata* en Brasil. Esta cepa fue incluida en cada experimento para confirmar la calidad del mismo.

Medicamento

Antimoniato de meglumina (Glucantime®) el cual contiene 81 mg/mL de antimonio pentavalente.

Ensayo *in vitro* en amastigotes intracelulares para evaluar la susceptibilidad al medicamento.

La susceptibilidad fue evaluada en términos de CI_{50} con base en la reducción de macrófagos infectados los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones del medicamento.

- **Cultivo de parásitos**

- Se cultivaron los parásitos en el medio de cultivo medio 199 entre 5 y 6 días, tiempo en el cual alcanzan la fase estacionaria.

- **Obtención de Macrófagos**

- La proliferación de los macrófagos se indujo en ratones (CD-1® Mouse Charles River Ltd, Margate, UK) por la administración peritoneal de almidón soluble (BDH, AnalaR 102713R). Los macrófagos fueron recolectados y colocados en placas de cultivo de 16 pozos (Lab-Tek™ C, Life Technologies, Paisley, UK) se incubaron por 24 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.

- **Infección de macrófagos**

- A las placas conteniendo los macrófagos se les adicionó 10 parásitos en fase estacionaria por macrófago. Los macrófagos infectados se incubaron durante dos horas a 34 °C y posteriormente fueron lavados tres veces con PBS a un pH de 7.4 para remover los parásitos no adheridos. Finalmente, se agregó medio RPMI suplementado con 10% de SFB y se incubaron las placas a 34 °C y a una atmosfera de 5 % de CO₂ por 24 horas.
- Una vez pasadas las 24 horas se realizó una tinción con Giemsa al 10%, en una de las láminas infectadas con el fin de establecer el porcentaje de infección de los macrófagos y verificar la ausencia de contaminación. Se procedió con el experimento siempre y cuando se obtuvieran por lo menos el 70% de los macrófagos infectados.

- **Exposición al medicamento**

- A partir de la solución stock de antimonioato de meglumina se realizaron las diluciones seriadas en RPMI 1640 + SFB 10% del medicamento para

obtener las siguientes concentraciones de trabajo: 3, 10, 30 y 100 µg/mL. Las diferentes concentraciones fueron agregadas a los macrófagos infectados, se realizaron cuatro replicas biológicas para cada una de las concentraciones. Se dejaron en contacto con el medicamento a los macrófagos por 5 días y las láminas fueron coloreadas con Giemsa.

Evaluación de macrófagos infectados

Ciego

Para el estudio de las láminas con macrófagos infectados se aplicó una técnica de enmascaramiento con el fin de mantener en ciego el estudio, cada lámina fue identificada con un número asignado de forma aleatoria por un profesional independiente al estudio.

Recuento de macrófagos infectados y no infectados:

El porcentaje de macrófagos infectados en los 20 pozos (cuatro pozos por cada concentración de medicamento y cuatro pozos sin medicamento ((Imagen 6-7) (Tabla1)) fue determinado por microscopia óptica. En cada una de las unidades experimentales se contaron 100 macrófagos y se clasificaron como macrófagos infectados y no infectados. Se consideró macrófago infectado el que tenía al menos 1 amastigote intracelular y no infectados cuando se evidenció total ausencia de amastigote.

Réplicas biológicas control: Sin medicamento:

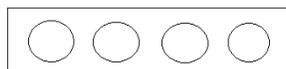


Imagen 6: Lámina control disposición unidades experimentales sin medicamento.

Réplicas biológicas con diferentes concentraciones del medicamento:

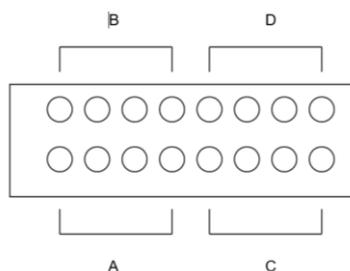


Imagen 7: Disposición unidades experimentales con medicamento.

Tabla 1: Distribución de las concentraciones por unidad experimental.

Distribución	Unidad experimental	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A	1,2,3,4	3
B	5,6,7,8	10
C	9,10,11,12	30
D	13,14,15,16	100

Los resultados se registraron en una base de datos (Tabla 2):

Tabla 2: Registro de resultados para la base de datos * UE: unidades experimentales

Experimento	Medicamento	Aislamiento	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	UE 1	UE 2	UE 3	UE 4
1	SbV	MHOM/CO/00/LL0001	0				
1	SbV	MHOM/CO/00/LL0001	3				
1	SbV	MHOM/CO/00/LL0001	10				
1	SbV	MHOM/CO/00/LL0001	30				
1	SbV	MHOM/CO/00/LL0001	100				

Se estudiaron en total 224 unidades experimentales.

Análisis de datos:

Dispersión de los datos de las réplicas biológicas

Para la aceptación de los datos obtenidos para cada una de las concentraciones de los medicamentos se calculó el CV (coeficiente de variación) entre las réplicas biológicas. Se aceptaron CV hasta del 20%.

Cálculo del CI_{50}

Se calculó la CI_{50} utilizando un modelo de regresión no lineal con el fin de encontrar la relación entre la variable dependiente (porcentaje de células infectadas) y las variables independientes (concentraciones del medicamento). Los R^2 para cada una de los resultados en los que se obtuvieron CI_{50} , estuvieron en un rango de 0,96-0,99.

8. Resultados

Los resultados se calcularon de acuerdo a un modelo de regresión no lineal y para la aceptación de los datos se tuvo en cuenta el coeficiente de variación (CV). A continuación, se describe cada uno de los aislamientos evaluados en este estudio, en donde se presenta la media del porcentaje de inhibición (% inhibición) con su respectiva desviación estándar (DS) y el CV teniendo en cuenta el criterio de aceptación, esto en cada una de las concentraciones utilizadas (Tabla 3-3.1).

Tabla 3: Aislamientos de pacientes por concentraciones, denotándose el CV para la aceptación de los datos. * Es la media del % de inhibición. DS: Desviación Estándar

Aislamiento	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	% inhibición* \pm DS	CV
MHOM/CO/00/LL0001	3	0,52 \pm 1,78	1,79
	10	12,79 \pm 5,01	5,74
	30	31,59 \pm 4,31	6,29
	100	72,06 \pm 5,55	19,87
MHOM/CO/99/LL0003	3	8,10 \pm 6,32	6,87
	10	8,86 \pm 3,41	3,74
	30	28,10 \pm 9,02	12,54
	100	34,68 \pm 3,74	5,73
MHOM/CO/99/LL0004	3	8,52 \pm 1,9	2,07
	10	13,03 \pm 0,96	1,10
	30	27,32 \pm 3,12	4,29
	100	49,62 \pm 5,27	10,45
MHOM/CO/99/LL0005	3	5,5 \pm 1,29	1,37
	10	13,75 \pm 4,57	5,30
	30	27,50 \pm 1,29	1,78
	100	31,50 \pm 1,29	1,88
MHOM/CO/99/LL0006	3	4,01 \pm 3,21	3,34
	10	14,79 \pm 2,95	3,46
	30	48,37 \pm 7,91	15,33
	100	84,46 \pm 2,89	18,62

Tabla 3.1: Aislamientos de pacientes por concentraciones, denotándose el CV para la aceptación de los datos. * Es la media del % de inhibición. DS: Desviación Estándar

Aislamiento	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibición* \pm DS	CV
MHOM/CO/99/LL0008	3	3,8 \pm 0,83	0,86
	10	9,37 \pm 0,58	0,65
	30	13,16 \pm 2,66	3,07
	100	18,48 \pm 1,01	1,24
MHOM/CO/00/LL0009	3	4,51 \pm 1,71	1,79
	10	8,77 \pm 1,83	2,01
	30	14,29 \pm 4,37	5,10
	100	32,83 \pm 6,80	10,12
MHOM/CO/00/LL0012	3	2,00 \pm 1,41	1,44
	10	7,75 \pm 2,22	2,40
	30	13,75 \pm 2,06	2,39
	100	24,00 \pm 5,89	7,75
MHOM/CO/04/LL0092	3	7,50 \pm 1,29	1,40
	10	14,75 \pm 2,75	3,23
	30	17,00 \pm 2,45	2,95
	100	16,50 \pm 2,65	3,17
MHOM/CO/05/LL0109	3	7,51 \pm 14,33	15,50
	10	3,04 \pm 8,61	8,88
	30	-0,25 \pm 0,83	0,82
	100	-0,25 \pm 0,00	0,00
IFLA/BR/1967/PH8	3	-0,25 \pm 2,03	2,02
	10	4,56 \pm 1,73	1,81
	30	22,28 \pm 1,52	1,95
	100	65,06 \pm 2,11	6,03

8.1 Cálculo de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀)

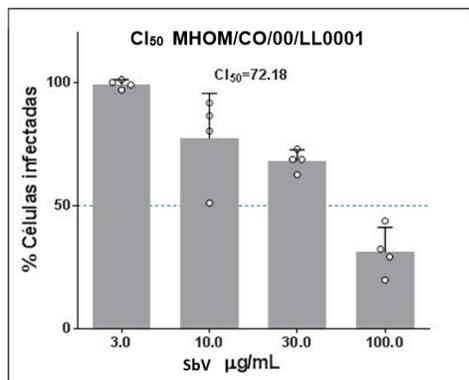
Los resultados obtenidos para cada aislamiento de paciente, se resumen en la Tabla 4. Se calculó el valor de la CI₅₀ para la cepa de referencia IFLA/BR/1967/PH8 y los aislamientos MHOM/CO/00/LL0001, MHOM/CO/99/LL0004, MHOM/CO/99/LL0006, para los 7 aislamientos restantes los resultados de la CI₅₀ se expresan como mayor a 100 µg/mL dado que en esta concentración no se observó la reducción del 50% de los macrófagos infectados.

Aislamiento	CI₅₀ SbV (µg/mL)
MHOM/CO/00/LL0001	72,18
MHOM/CO/99/LL0003	> 100
MHOM/CO/99/LL0004	105,5
MHOM/CO/99/LL0005	> 100
MHOM/CO/99/LL0006	36,92
MHOM/CO/99/LL0008	> 100
MHOM/CO/00/LL0009	> 100
MHOM/CO/00/LL0012	> 100
MHOM/CO/04/LL0092	> 100
MHOM/CO/05/LL0109	> 100
IFLA/BR/1967/PH8	72,9

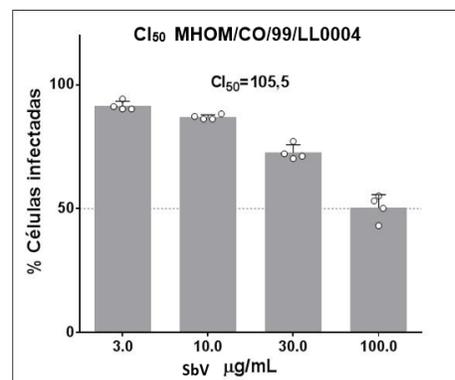
Tabla 4: Actividad del de antimonio pentavalente expresado en CI₅₀ sobre aislamientos de *L. (L.) amazonensis*.

En los resultados obtenidos para este estudio se puede observar que para los aislamientos MHOM/CO/00/LL0001(Gráfica 1), MHOM/CO/99/LL0004

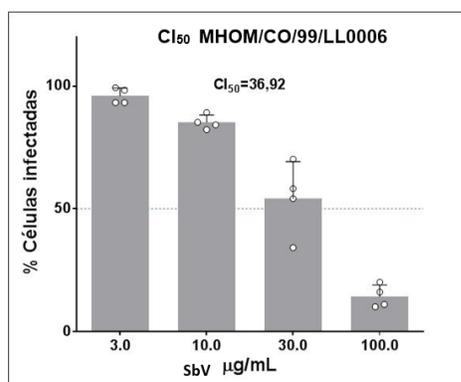
(Gráfica 2), MHOM/CO/99/LL0006 (Gráfica 3) y la cepa de referencia IFLA/BR/1967/PH8 (Gráfica 4), se determinó la CI_{50} obteniéndose un rango de susceptibilidad de 36,92 $\mu\text{g/mL}$ – 105,5 $\mu\text{g/mL}$.



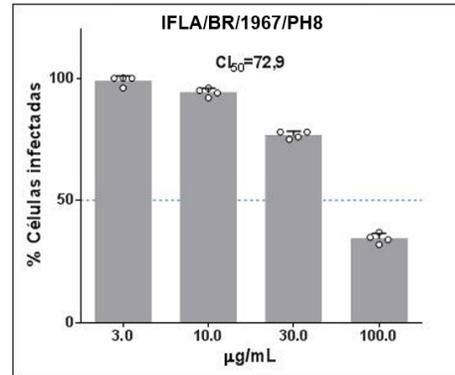
Gráfica 1: Se observó el efecto dosis-respuesta, es decir el porcentaje de células infectadas disminuyó a menos del 50 % con la concentración más alta.



Gráfica 2: Se observó el efecto dosis-respuesta, es decir el porcentaje de células infectadas disminuyó a menos del 50 % con la concentración más alta.

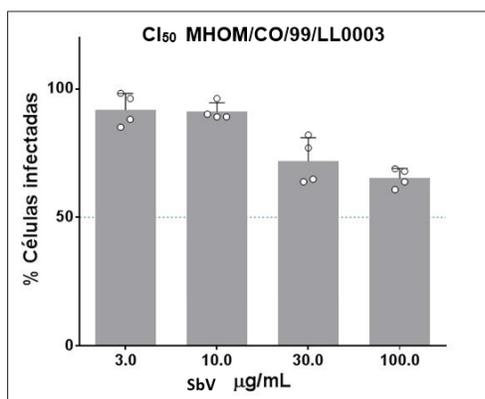


Gráfica 3: Se observó el efecto dosis-respuesta, es decir el porcentaje de células infectadas disminuyó a menos del 50 % con la concentración más alta.

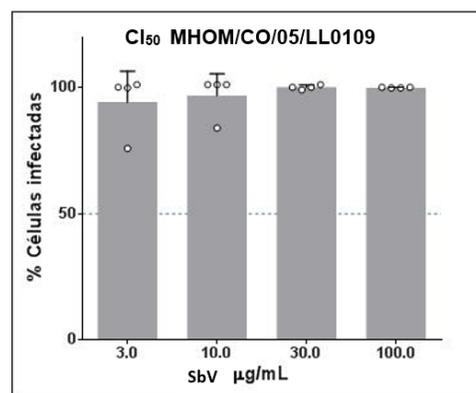


Gráfica 4: En la Cepa control se observó el efecto dosis-respuesta, es decir el porcentaje de células infectadas disminuyó a menos del 50 % con la concentración más alta.

En los resultados de los otros aislamientos de pacientes, se evidenció el efecto dosis-respuesta sin embargo la CI_{50} no se pudo determinar. (Gráficas 5-6) (Anexo 1).



Gráfica 5: Se observa que en la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ no se reducen las células infectadas al 50 %.



Gráfica 6: Se observa que en la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ no se reducen las células infectadas al 50 %, y el porcentaje de células infectadas no difiere con el aumento de las concentraciones del SbV.

9. Discusión

Los resultados obtenidos respecto a la susceptibilidad *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* al antimonio pentavalente de este estudio constituye la primera aproximación en Colombia para conocer la línea base de susceptibilidad de esta especie del parásito a este medicamento.

El efecto dosis-respuesta es decir la reducción del porcentaje de células infectadas expresada en la CI_{50} , se logró determinar en tres de los diez aislamientos analizados, se obtuvo un rango de 36,92 - 105,5 $\mu\text{g/mL}$ y para los otros siete aislamientos presentaron una CI_{50} por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$. Estas diferencias entre los resultados se podrían explicar por la variabilidad en la susceptibilidad intrínseca intra especie que se ha reportado para

varias especies del género *Leishmania*. En un estudio realizado por Fernández OL. y colaboradores se evaluó la susceptibilidad *in vitro* al antimonio de meglumina y la miltefosina de 245 aislamientos colombianos de especies del subgénero *Viannia*, los autores evidenciaron diferencias en el perfil de susceptibilidad entre cepas de la misma especie y entre especies de tal forma que se encontraron aislamientos sensibles y resistentes (6).

Los resultados de los aislamientos a los cuales no se les determinó el valor preciso de CI_{50} , plantean la necesidad de un estudio posterior en el cual se amplíe el rango de concentraciones del medicamento para tener un mayor acercamiento de la línea base de susceptibilidad de esta especie circulante en Colombia al antimonio pentavalente, con el fin de monitorear el comportamiento en el tiempo de este parásito al medicamento.

En cuanto a los tres aislamientos a los cuales se les determinó la CI_{50} uno de ellos tuvo una CI_{50} por debajo de la cepa de referencia incluida en el estudio, en contraste, dos aislamientos tuvieron una CI_{50} por encima. Estos resultados refuerzan los hallazgos de variabilidad intrínseca reportada. La cepa de referencia utilizada fue aislada del vector *Lutzomyia flaviscutellata* y no ha estado en contacto con el medicamento, también según la literatura revisada se observó que en el presente estudio obtuvo una CI_{50} de 72,9 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se obtuvo un resultado esperado de esta cepa.

Por otra parte, se ha discutido que la respuesta clínica a los antimoniales tiene diferencias dependiendo de las zonas geográficas y de la especie infectante. En Colombia este hallazgo fue demostrado para especies del subgénero *Viannia* a las que se les evaluó el perfil base de susceptibilidad al antimonio pentavalente y a la miltefosina y se encontraron estas diferencias, es así como las cepas de *L. (V.) braziliensis* aisladas de pacientes de la región del Pacífico mostraron una mayor susceptibilidad a SbV en comparación con otras regiones, pero fueron menos susceptibles a la miltefosina en comparación con las cepas de esta especie de otras

regiones, además las cepas que presentaron resistencia a la miltefosina y SbV eran de las regiones de los Andes, Orinoquia y Amazonia (6).

Si bien en este estudio se analizaron 10 aislamientos, es de resaltar que estos provenían de diferentes regiones naturales del país, entre las cuales se ha reportado diferencias en susceptibilidad en otras especies del subgénero *Viannia* (6) con los resultados obtenidos en este estudio no se puede concluir al respecto, sin embargo, sería deseable ampliar el número de aislamientos representativos de diferentes zonas geográficas del país.

Son pocos los estudios reportados de susceptibilidad *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* al antimonio de meglumina, en la literatura revisada se encontró un trabajo realizado en Brasil por Rogeria C. ZN. y colaboradores (19) con el cual podríamos hacer una aproximación para contrastar los resultados obtenidos en este estudio, dado que las condiciones del modelo tenían algunas similitudes en cuanto al uso de macrófagos de ratones, aunque de diferente especie, la proporción parásito-macróforo y la metodología de recuento de macrófagos infectados y no infectados. Los autores reportaron para los tres aislamientos de *L. (L.) amazonensis* incluidas en el estudio un rango de susceptibilidad al Glucantime® expresado en CI_{50} de 112,2 $\mu\text{g/mL}$ -146 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (L.) amazonensis*, mientras que en este trabajo se obtuvo una CI_{50} entre 36,92 $\mu\text{g/mL}$ - 105.5 $\mu\text{g/mL}$ valores inferiores a los encontrados por Rogeria C.ZN. y colaboradores, esto en parte se podría explicar por las diferencias entre las zonas geográficas de donde proceden las muestras y en la metodología. (19).

El estudio de por Rogeria C. ZN. y colaboradores (19), utilizaron concentraciones de 13,5, 40,5, 135 y 405 $\mu\text{g/mL}$ de Glucantime®, mientras que en este trabajo las concentraciones utilizadas son 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{g/mL}$, las cuales se escogieron por la farmacocinética del medicamento dado que la concentración que se alcanza en tejido es de 25,5 $\mu\text{g/mL}$.

De acuerdo a los estudios publicados que se han realizado para evaluar la susceptibilidad *in vitro* a medicamentos se evidencian diferentes

condiciones de ensayos en cuanto concentración de parásitos, tipo de células utilizadas como son macrófagos peritoneales de ratón (BALB/c) (27), macrófagos de linajes J774 A.1 y THP-1 y macrófagos derivados de línea celular U-937 (26); el número de parásitos por macrófago, el modelo de ensayo tales como macrófago-*Leishmania* o estudio en cultivo axénico de amastigotes y el medicamento utilizado dado que en algunos trabajos utilizan el medicamento comercial (Glucantime®), la molécula SbV o SbIII (27).

Es posible que dadas las diferentes condiciones de ensayo que se mencionan anteriormente generen variaciones en los valores de actividad y esto genere diferencias en la susceptibilidad al medicamento.

Conocer la línea base de susceptibilidad de *L.(L.) amazonensis* permitiría hacer una monitorización del comportamiento de esta especie al tratamiento de la leishmaniasis a través del tiempo.

10. Conclusiones

La evaluación de la susceptibilidad *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* al Glucantime® permitió realizar una aproximación al conocimiento de la línea base de susceptibilidad de este grupo de aislamientos colombianos al determinar el valor mínimo de susceptibilidad expresado en CI₅₀ y conocer que el valor máximo de susceptibilidad está por encima de 100 µg/mL.

En tres de los aislamientos evaluados se evidenció diferencias intra especie en la susceptibilidad al medicamento.

11. Perspectivas

Con el fin de establecer precisión el valor máximo en las CI₅₀ para estos aislamientos se sugiere hacer otro estudio en el que se aumenten las concentraciones del medicamento.

Dado que en Colombia ha sido demostrado que hay diferencias en la susceptibilidad de especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* asociadas a la región geográfica, podría esperarse resultados similares en *L. (L.) amazonensis* que harían objeto de un nuevo estudio.

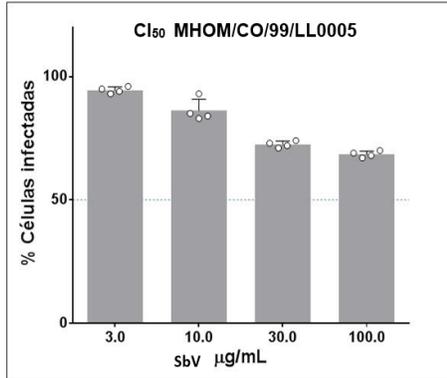
12. Bibliografía

1. Organización Panamericana de la Salud - Organización Mundial de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas [Internet]. 2019. 183 p. Available from: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631_spa.pdf1.
2. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Informe de evento leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral, Colombia, 2019. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS%20CUT%C3%81NEA%20PE%20X%202019.pdf>
3. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN. Integral De Leishmaniasis En Colombia [Internet]. 2018. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf>
4. Croft SL. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2013;19(1):111–26.
5. Ponte-Sucre Alicia, Gamarro F. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl Trop Dis 2017 11(12).
6. Fernández OL, Diaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5).
7. WHO. The control of leishmaniasis. [Internet]. Vol. 58, Bulletin of the World Health Organization. Geneva; 2010. 807–818 p. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=53D21FABD18850479185F80F4E84B8?sequence=1
8. Ovalle-Bracho C, Londoño-Barbosa D, Salgado-Almarino J, González C. Evaluating the spatial distribution of *Leishmania* parasites in Colombia from clinical samples and human isolates (1999 to 2016). PLoS One. 2019;14(3):1–16.
9. Muvdi-Arenas S O-BC. Mucosal leishmaniasis: a forgotten disease. Description and identification of species in 50 Colombian cases. Rev Biomed. 2019;8(5):55.
10. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human *Leishmania (Viannia)* Infection. J Infect Dis [Internet]. 2006;193(10):1375–83.
11. Soto J, Soto P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. Biomédica [Internet]. 2006;26(1):194–206.

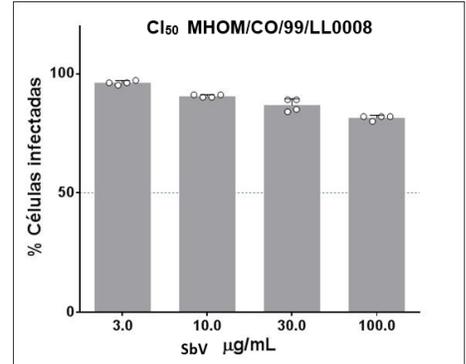
12. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(June):1–10.
13. Patino LH, Mendez C, Rodriguez O, Romero Y, Velandia D, Alvarado M, et al. Spatial distribution, *Leishmania* species and clinical traits of Cutaneous Leishmaniasis cases in the Colombian army. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8):1–15.
14. Salgado-Almarino J, Hernández C.A, Ovalle C.E, Evaluating the spatial distribution of *Leishmania* parasites in Colombia from clinical samples and human isolates (1999 to 2017). 2019. *PLoS One*.
15. Gutiérrez, J. C. Evaluación de la citotoxicidad y eficacia *in vitro* de los componentes para un sistema farmacéutico tipo película, con antimonio de meglumina como principio activo [tesis de Maestría en Internet]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2012,93 p.
16. Osorio, Edison J., Sara M. Robledo, Gabriel J. Arango, and Carlos E. Muskus. 2005. "Leishmania: Papel de La Glicoproteína P En La Mediación de Resistencia a Medicamentos Y Estrategias de Reversión." *Biomédica* 25 (2): 242.
17. Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001;6(11):899-905. doi:754 [pii]. resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001;6(11):899–905.
18. Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, Ponte-Sucré A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(6):637–42.
19. Rogeria C. ZN, Danilo C. M, Jenicer K. U. Y-Y, Ledice I. A. P, Pelli de Oliveira M A., Ribeiro-Dias F, L. Dorta M, S R. B. Uliana S. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B, *Tropical Medicine and International Health*.2010;(Jan), (15):68-76.
20. Vera A. Casadiego O, EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DE KETOCONAZOL PARA USO TÓPICO EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA POR *Leishmania (Viannia)*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(3)
21. Regli Ivo B. Resistance of *Leishmania (Viannia) Panamensis* to Meglumine Antimoniate or Miltefosine Modulates Neutrophil Effector Functions. *Front. Immunol* 2018.
22. Fernandez OL. Novel Approach to *In Vitro* Drug Susceptibility Assessment of Clinical Strains of *Leishmania* spp. *JCM*.2012.

23. Perez-Franco J. E, Cruz-Barrera M. L, Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. PLoS Negl Trop Dis. 2016.
24. Vermeersch M., da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L, *In Vitro* Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. Antimicrob Agents Chemother. 2009.
25. Rugani Jeronimo N, Quaresma P. F, Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018.
26. Muñoz Carlos Franco, Manjarre´s-Estremor Merab. Intraspecies differences in natural susceptibility to amphotericine B of clinical isolates of *Leishmania* subgenus *Viannia*. PLoS ONE; 2017.
27. Mesa CV, Muñoz DL, Echeverry M, Velez ID, Robledo SM. The susceptibility to infection by *Leishmania panamensis* and the sensitivity to drugs differ according to the macrophage type, Scielo. 2010;10 (Dec): 200-2011.

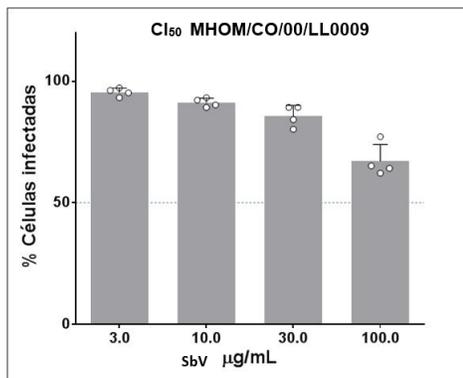
Anexo 1:



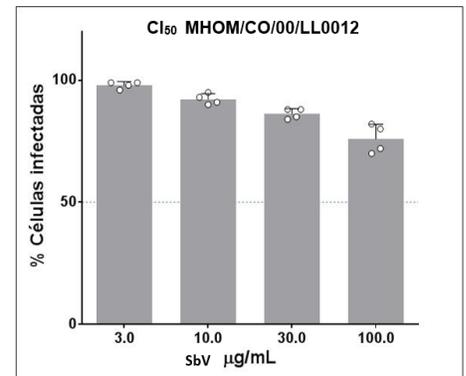
Gráfica 7: Se observa que en la concentración de 100 no se reducen las células infectadas al 50 %.



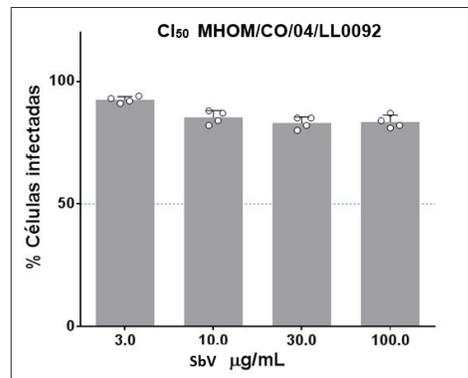
Gráfica 8: Se observa que en la concentración de 100 µg/mL no se reducen las células infectadas al 50 %.



Gráfica 9: Se observa que en la concentración de 100 µg/mL no se reducen las células infectadas al 50 %.



Gráfica 10: Se observa que en la concentración de 100 µg/mL no se reducen las células infectadas al 50 %.



Gráfica 11: Se observa que en la concentración de 100 µg/mL no se reducen las células infectadas al 50 %.

