



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la susceptibilidad intracelular de  
*Leishmania braziliensis* a antimoniales liposomales  
y Glucantime<sup>®</sup> en macrófagos humanos de línea  
celular U-937 *in vitro***

Andrea Milena Guatibonza Carreño

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de medicina, Departamento de Salud Pública  
Bogotá, D.C., Colombia  
2019



**Evaluación de la susceptibilidad intracelular de  
*Leishmania braziliensis* a antimoniales liposomales  
y Glucantime<sup>®</sup> en macrófagos humanos de línea  
celular U-937 *in vitro***

Andrea Milena Guatibonza Carreño

Tesis presentada como registro para optar al título de:

**Magister en Infecciones y Salud en el Trópico**

Director:

Jair Alexander Téllez Meneses. MSc, Ph.D

Universidad Manuela Beltrán

Codirector:

María Clara Echeverry Gaitán. MD, Ph.D

Laboratorio de Parasitología Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública

Bogotá, D.C., Colombia

2019



*A mi madre por haberme brindado su  
apoyo en todo este proceso.  
Te amo tres millones.*



## **Agradecimientos:**

A mi familia y en especial a mi Madre por haberme apoyado en este proceso y por la paciencia que tuvo durante todos estos años.

A mi Padre, a mis hermanos Giovanni y Diana y a mi sobrina Sofía, que siempre me tendieron su mano para poder salir adelante sin importar las circunstancias.

A la doctora María Clara Echeverry por haberme brindado la posibilidad de trabajar en su grupo de investigación, por su respaldo, paciencia y acompañamiento durante toda mi formación académica.

Al doctor Jair Alexander Téllez por la dirección de este trabajo y acompañamiento durante el desarrollo del mismo.

A todos los integrantes del laboratorio de parasitología de la facultad de medicina, Catherine Aguilar, Samanta Aponte y Alejandro Contreras, por brindarme su apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A la doctora Carolina Ortiz, por brindarme apoyo incondicional y asesorías durante el desarrollo de esta investigación.

A Marcela Parra, por haberme brindado su apoyo incondicional en la culminación de este proyecto.

A Lorena Landazabal, por su paciencia, por ser siempre una persona incondicional y estar ahí para darme ánimos y motivaciones para continuar en todo momento.

Y finalmente a Dios, por haberme permitido vivir esta experiencia como estudiante de maestría en la Universidad Nacional de Colombia.



## Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria tratable y curable, sin embargo, los agentes quimioterapéuticos para su tratamiento son limitados. La información sobre el comportamiento de los posibles sistemas de administración de fármacos para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos clínicos actuales es esencial para proponer su uso como nuevas formulaciones anti-*leishmania*. En el presente estudio, la susceptibilidad de los amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* se evaluó en respuesta a los antimoniales liposomales encapsulados y las formulaciones de Glucantime® no encapsuladas en un modelo de infección de leishmaniasis humana in vitro. Además, se evaluó la citotoxicidad de Glucantime® encapsulada y no encapsulada en la línea celular U-937 de monocitos humanos. El análisis de citotoxicidad indicó que la formulación encapsulada de Glucantime mostró un valor de concentración citotóxica medio máxima de 425.4 µg/ml contra células U-937, mientras que Glucantime no encapsulada demostró no ser tóxica, incluso a concentraciones superiores a 1000 µg/mL en las mismas células U-937 humanas. El análisis de susceptibilidad mostró que la formulación de Glucantime encapsulada tiene un valor de concentración inhibitoria media máxima (IC50) de 78.9 µg/mL y el Glucantime® no encapsulado fue de 31.1 µg/mL. Estos resultados nos permitieron concluir que la formulación liposomal de Glucantime encapsulada puede mejorarse para ser propuesta como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de la leishmaniasis.

**Palabras clave:** Leishmaniasis cutánea, *L. braziliensis*, Antimonio pentavalente, Glucantime®, Liposomas, susceptibilidad.

## Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease treatable and curable, however the chemotherapeutic agents for their treatment are limited. Information on the behavior of potential drug delivery systems to improve the bioavailability of current clinical drugs, is essential to propose their use as anti-*leishmania* new formulations. In the present study, the susceptibility of intracellular *L. braziliensis* amastigotes was evaluated in response to encapsulated liposomal antimonials and not encapsulated Glucantime® formulations in a model of human leishmaniasis infection *in vitro*. In addition, encapsulated and not encapsulated Glucantime® cytotoxicity was assessed in human monocytes U-937 cell line. The cytotoxicity analysis indicated that the encapsulated Glucantime formulation showed a half-maximal cytotoxic concentration value of 425.4 µg/mL against U-937 cells, whereas not encapsulated Glucantime proved not to be toxic, even at concentrations higher than 1000 µg/mL in the same human U-937 cells. The susceptibility analysis showed that the encapsulated Glucantime formulation has a half-maximal inhibitory concentration (IC50) value of 78.9 µg/mL and the not encapsulated Glucantime® was 31.1 µg/mL. These results allowed us to conclude that the encapsulated Glucantime liposomal formulation may be improved to potentially be proposed as new therapeutic alternative for leishmaniasis treatment.

**Key words:** Cutaneous leishmaniasis, *L. braziliensis*, Pentavalent antimony, Glucantime®, Liposomes, Susceptibility.





**Contenido**

<b>Resumen.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico .....</b>	<b>3</b>
1.1 Generalidades de la leishmaniasis.....	3
1.1.1 Definición y características generales.....	3
1.1.2 Epidemiología de leishmaniasis cutánea .....	3
1.1.3 Ciclo de vida de las especies de <i>Leishmania</i> .....	4
1.2 Antimoniales pentavalentes.....	6
1.2.1 Mecanismo de activación y acción del antimonio (Sb) .....	7
1.3 Liposomas y su uso como sistemas de transporte de medicamentos .....	9
1.3.1 Antecedentes .....	9
1.3.2 Producción de liposomas para el encapsulamiento de antimoniales. ....	12
1.3.3 Asociación de compuestos antimoniales a liposomas para el tratamiento de la leishmaniasis.....	15
1.4 Internalización de liposomas a la membrana .....	16
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo general .....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
<b>3. Metodología.....</b>	<b>23</b>
3.1 Descripción general de la estrategia experimental abordada en el estudio .....	23
3.2 Consideraciones éticas .....	23
3.3 Cultivo <i>in vitro</i> de parásitos .....	24
3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de la línea celular U-937.....	24
3.5 Liposomas y Glucantime®.....	24

3.6	Rehidratación de liposomas con Glucantime® .....	24
3.7	Evaluación de citotoxicidad .....	25
3.7.1	Citotoxicidad de Glucantime Liposomal y Convencional en monocitos U-937	25
3.7.2	Citotoxicidad de nanoliposomas en monocitos U-937 .....	25
3.7.3	Evaluación de citotoxicidad mediante ensayos de viabilidad por alamarBlue...	26
3.8	Evaluación de susceptibilidad de <i>L. braziliensis</i> a Glucantime liposomal encapsulado vs Glucantime® convencional no encapsulado .....	27
3.8.1	Diferenciación de monocitos de la línea celular humana U-937 a macrófagos .	27
3.8.2	Infección de macrófagos diferenciados de la línea celular U-937 con <i>L. braziliensis</i> .....	27
3.8.3	Tratamiento con Glucantime convencional y liposomal .....	28
3.8.4	Coloración de Giemsa para ensayos de evaluación de susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>L. braziliensis</i> a antimoniales liposomales vs Glucantime.....	28
3.9	Índice de selectividad .....	29
3.10	Análisis estadístico .....	30
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>
4.1	Evaluación de la citotoxicidad de liposomas .....	31
4.1.1	Citotoxicidad de Glucantime convencional y liposomal en monocitos U-937 .....	31
4.1.2	Citotoxicidad de nanoliposomas de tipo DCP y DPPG con PBS en monocitos U-937 .....	33
4.2	Evaluación de la susceptibilidad intracelular de <i>L. braziliensis</i> a Glucantime® convencional vs Glucantime liposomal.....	35
4.3	Índice de selectividad (IS) de las formulaciones de Glucantime® convencional y Glucantime liposomal .....	38
<b>5</b>	<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>48</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo 1. Susceptibilidad intracelular de <i>L. braziliensis</i> a Glucantime® convencional y liposomal determinada por RT-qPCR.....</b>	<b>49</b>
A.1	Introducción.....	49
A.2	Metodología.....	50
A.2.1	Lisis celular.....	50
A.2.2	Extracción de ARN.....	50

---

A.2.3 Retrotranscripción.....	50
A.2.4 Cuantificación de parásitos intracelulares por RT-qPCR.....	51
A.2.5 Condiciones de la RT-qPCR.....	51
A.2.6 Curvas de eficiencia para <i>L. braziliensis</i> y macrófagos diferenciados de la línea celular U-937 .....	52
A.2.7 Análisis de la RT-qPCR.....	52
A.3 Resultados .....	53
A.3.1 Curvas de eficiencia.....	53
A.3.1.1 Curva de eficiencia para 18S de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	53
A.3.1.2 Curva de eficiencia para $\beta$ – 2M de macrófagos .....	55
A.3.1.3 Comparación de las curvas de eficiencias de la qPCR para 18S y $\beta$ – 2M ....	57
A.3.2 Cuantificación de parásitos y macrófagos por RT-qPCR.....	59
A.3.3 Susceptibilidad de <i>L. braziliensis</i> a Glucantime® convencional no encapsulado vs Glucantime liposomal encapsulado por el método RT-qPCR .....	61
<b>Bibliografía .....</b>	<b>63</b>



## Lista de Figuras

<b>Figura 1-1:</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	5
<b>Figura 1-2:</b> Estructura de los antimonios pentavalentes .....	6
<b>Figura 1-3:</b> Mecanismo de activación y acción del antimonio .....	8
<b>Figura 1-4:</b> Mecanismo de entrada de nanopartículas en macrófagos infectados con parásitos de <i>Leishmania</i> spp. ....	17
<b>Figura 3-5:</b> Diagrama representativo de la estrategia metodológica general utilizada en el estudio.....	22
<b>Figura 4-6:</b> Evaluación de la citotoxicidad de Glucantime convencional vs Glucantime liposomal en monocitos U-937. A. Ensayo de dosis respuesta para la determinación de citotoxicidad de Glucantime convencional vs Glucantime liposomal en monocitos U-937. ....	32
<b>Figura 4-7:</b> Evaluación de la citotoxicidad de nanolipsomas de tipo DCP y DPPG sin medicamento. A. Ensayo de dosis respuesta para la determinación de citotoxicidad de nanolipsomas de tipo DCP y DPPG en monocitos U-937.....	34
<b>Figura 4-8:</b> Comportamiento de la carga parasitaria en número de amastigotes por células contadas.....	35
<b>Figura 4-9:</b> Imágenes representativas del efecto leishmanicida del Glucantime® convencional vs Glucantime liposomal de tipo DCP en macrófagos infectados con <i>L. braziliensis</i> . ....	36
<b>Figura 4-10:</b> Efecto intracelular leishmanicida de Glucantime® convencional y Glucantime liposomal en macrófagos U-937 infectados con <i>L. braziliensis</i> . ....	37

- Figura A.3-11:** Curva de eficiencia de amplificación por RT-qPCR para el gen 18S de *Leishmania braziliensis*. ..... 54
- Figura A.3-12:** Curva de eficiencia de amplificación por RT-qPCR para el gen  $\beta - 2M$  de macrófagos humanos: ..... 56
- Figura A.3-13:** Curvas de eficiencia de 18S para *L. braziliensis* y  $\beta - 2M$  para macrófagos ..... 58
- Figura A.3-14:** Comparación de las curvas de eficiencia para los genes 18S y  $\beta - 2M$ . .. 59
- Figura A.3-15:** Rango de linealidad de las curvas estándar del gen blanco 18S y el gen normalizador  $\beta - 2M$ . ..... 60
- Figura A.3-16:** Susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime convencional vs Glucantime liposomal establecida por el método  $\Delta\Delta CT$  corregido. .... 62
- Figura A.3-17:** Susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime convencional vs Glucantime liposomal establecida por el método  $\Delta\Delta CT$ . .... 64

## Lista de tablas

<b>Tabla 1-1:</b> Ventajas y desventajas de los liposomas como transportadores de medicamentos. .....	10
<b>Tabla 1-2:</b> Beneficios de los fármacos encapsulados en liposomas .....	11
<b>Tabla 1-3:</b> Formulaciones de fármacos antimoniales en liposomas. ....	13
<b>Tabla A.2-4:</b> Secuencias de primers y sondas empleadas en los ensayos de RT-qPCR....	51



## Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Leishmania* spp., que se presenta principalmente en países tropicales y subtropicales y es transmitida al hombre por insectos flebótomos hembra infectados con el parásito (1–3). Los parásitos de *Leishmania* spp. ocasionan diferentes tipos de manifestaciones clínicas, las cuales dependen de la especie infectante del parásito y de la respuesta inmune mediada por las células del hospedero, donde pueden desencadenar condiciones clínicas como leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (4,5). La leishmaniasis hace parte del grupo de enfermedades infecciosas desatendidas, las cuales ocurren en países pobres y afectan a poblaciones vulnerables y con difícil acceso a los servicios de salud. Teniendo en cuenta la distribución global de la enfermedad, la mayoría de los casos ocurren en África, Asia y las Américas (6).

En Colombia, la leishmaniasis se considera un problema de salud pública, debido a los cambios en los patrones epidemiológicos en la transmisión de la enfermedad a los humanos. Esos cambios han sido asociados con el proceso de domiciliación del vector y la urbanización del ciclo de transmisión, lo que facilita la interacción con un mayor número de personas, incrementando el riesgo de infección y desarrollo de la enfermedad (8). En el país se presentan las tres formas clínicas principales de la enfermedad, siendo la más frecuente y la de mayor distribución geográfica, la leishmaniasis cutánea, con una estimación en el número de casos del 98.56%, seguido de la leishmaniasis mucocutánea, con un 1,21% de los casos; y la leishmaniasis visceral con un 0,22% de los casos reportados para el 2018 (7,9).

El tratamiento de primera elección para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis son las sales de antimonio pentavalente, conocidas como: antimonio de meglumina (Glucantime®) y estibogluconato de sodio (Pentostam®) (10). Ambos medicamentos se consideran equivalentes en términos de eficacia clínica, farmacocinética, mecanismos de acción y efectos secundarios (11). En cuanto a las limitaciones del tratamiento con antimoniales, se han reportado efectos severos que pueden generar hepatotoxicidad, pancreatitis y cardiotoxicidad, éste último, como uno de los efectos adversos más graves que llegan a ocasionar la muerte en el paciente (12). El tratamiento con antimoniales también puede presentar falla terapéutica, el cual puede estar relacionado con características inherentes al hospedero como la edad, tasas de depuración del fármaco, etapa inmunológica, activación del fármaco y adherencia al tratamiento (13,14).

La necesidad de desarrollar y descubrir nuevos tratamientos menos tóxicos y más eficientes, que mejoren la vida útil de los medicamentos a base de antimonio y que al mismo tiempo disminuyan la carga parasitaria de *Leishmania* spp en las células, sugiere el desarrollo de alternativas viables, como los liposomas (15). Algunas de las ventajas de usar medicamentos encapsulados en liposomas radican en la baja o nula inmunogénicidad y su biocompatibilidad (16). Otra de las ventajas que tiene el uso de liposomas, es que mejoran la eficacia y reducen la toxicidad sistémica de los fármacos (17). En el contexto de los antimoniales, se ha demostrado que la asociación de antimonio de meglumina con liposomas, aumenta la eficacia del fármaco en modelos *in vivo* (18).

Los estudios realizados en la implementación del uso de liposomas asociados a antimonio de meglumina en modelos *in vivo*, han demostrado que reduce los niveles de toxicidad en las células, aumentan su efecto leishmanicida y pueden ser administrados en una sola dosis, prolongando el tiempo de circulación del fármaco en la sangre (19). Sin embargo, esos estudios se han realizado principalmente en especies como *L. donovani* y *L. infantum*, parásitos que ocasionan la forma clínica de leishmaniasis visceral, y aún no se conocen estudios sobre la susceptibilidad del Glucantime® asociado a liposomas en especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, como *L. braziliensis* en modelos de infección *in vitro*. Por lo anterior, en la presente investigación se pretendió dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la susceptibilidad de *Leishmania braziliensis* a antimoniales liposomales y Glucantime® en un modelo de infección *in vitro* en macrófagos humanos de línea celular U-937?

# 1. Marco teórico

## 1.1 Generalidades de la leishmaniasis

### 1.1.1 Definición y características generales

Las leishmaniasis son infecciones parasitarias protozoarias transmitidas a los mamíferos vertebrados por insectos hembras de la familia flebotominae infectados con el parásito (20). Los parásitos del género *Leishmania* spp., son los agentes etiológicos de distintas manifestaciones clínicas en los humanos, como por ejemplo leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV). La LV, se caracteriza por presentar episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia (1,21). LMC, es una enfermedad mutilante, caracterizada por presentar lesiones que pueden provocar la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y las cavidades de la garganta y los tejidos circundantes (22). La LC, es la forma más común de la enfermedad y por lo general, produce úlceras en las partes expuestas del cuerpo, como la cara, los brazos y las piernas y puede llegar a ser incapacitante cuando las lesiones son múltiples (23). La leishmaniasis cutánea, se caracteriza principalmente por presentar lesiones en la piel que pueden evolucionar de pápulas y nódulos a placas y úlceras, y que en algunos casos esas lesiones pueden auto-sanar en ausencia de tratamiento después de algún tiempo (24).

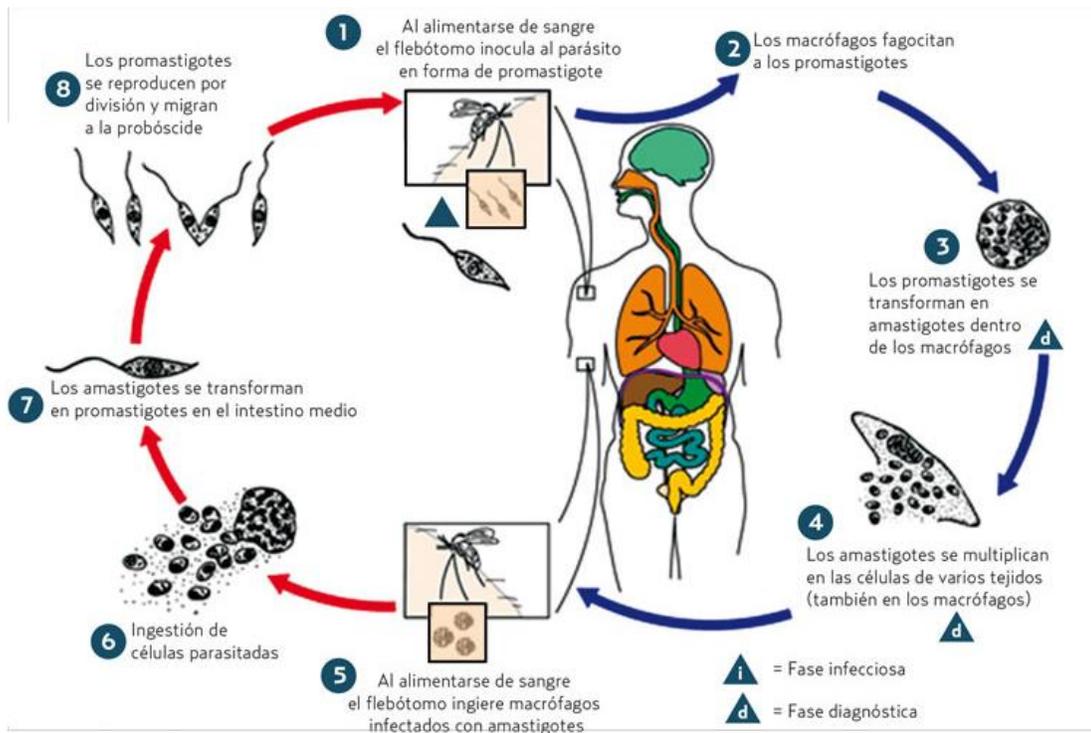
### 1.1.2 Epidemiología de leishmaniasis cutánea

La LC presenta una incidencia mundial de 0,7 a 1,2 millones de casos por año y los países de Brasil, Colombia, Perú, Costa Rica, Argelia, Sudán, Etiopía, Siria, Iran y Afganistan representan aproximadamente el 75 % de la incidencia mundial de la enfermedad (25). En América, la LC es endémica en 18 países, con aproximadamente 1,5 millones de casos nuevos cada año. Colombia, Brasil y Perú, representan el 75 % de los casos de leishmaniasis cutánea en América del sur. Las especies del subgénero *Viannia* son prevalentes en América y están relacionadas a leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea, siendo *L (Viannia) braziliensis*, el principal agente etiológico de esas manifestaciones, parásito transmitido principalmente por insectos del género *Lutzomyia*, en el nuevo mundo (26,27).

Colombia, es uno de los tres países con mayor número de especies de *Leishmania* spp. que afectan a los seres humanos, con seis especies del parásito identificadas (28). Alrededor del 95 y 98 % de los casos pertenecen a LC, 4 % a LMC y 1.5 % a LV. La enfermedad predomina en gran parte del país, especialmente en los focos silvestres y en los valles interandinos, donde el trabajo de personas en plantaciones de café y los desplazamientos de las poblaciones humanas pueden ser un factor de riesgo de infección (29). Se han reportado brotes epidémicos de LC causados por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*, con transmisión intra y peridomiciliar, desde 1984 (30). Colombia ocupa el segundo lugar en incidencia de leishmaniasis en América después de Brasil. En 2016, se notificaron alrededor de 11.847 nuevos casos de leishmaniasis en el territorio nacional (2.493 más que el año inmediatamente anterior), de los cuales el 98% correspondían a LC (31). En 2018, se notificaron un total de 2709 casos, teniendo en cuenta los registros de las tres formas clínicas, de los cuales el 98,56 % fueron pertenecientes a la forma cutánea. La tendencia de casos, en los últimos años para el evento de Leishmaniasis cutánea según el Instituto Nacional de Salud, se observa un comportamiento fluctuante, con descenso marcado de casos en los años 2017 y en la actualidad, en comparación con los casos reportados en el 2016, con una disminución del 42 % de los casos en el 2018 (9). Ese comportamiento en la disminución en el número de casos reportados al sistema, se puede atribuir a la epidemiología y el periodo de incubación de la enfermedad, la baja percepción del riesgo por parte de la población, lo que conlleva a una consulta superior a 30 días en algunos casos, y a una notificación tardía de casos (32).

### 1.1.3 Ciclo de vida de las especies de *Leishmania*

Los parásitos de *Leishmania* spp tienen dos formas en su ciclo de vida, los amastigotes y los promastigotes. La forma amastigote es la forma replicativa intracelular que se encuentra en los mamíferos vertebrados como los humanos, mientras que la forma promastigote, es la forma replicativa que se encuentra en el intestino de los insectos vectores (33). Sólo el insecto hembra transmite el protozoario, infectándose con los parásitos de *Leishmania* spp (forma amastigote), contenidos en la sangre que ingiere de su huésped humano o mamíferos vertebrados (34). Durante 4 a 25 días, el parásito continúa desarrollándose dentro del vector, donde sufre una conversión a la forma de promastigote (35). Un gran número de las formas parasitarias se reproducen por fisión binaria. La multiplicación procede en el intestino medio del vector y los promastigotes tienden a migrar a la faringe y a la cavidad bucal (36). Después de una nueva ingesta de los insectos vectores, los promastigotes que se encuentran en la faringe, son regurjitados y entran al torrente sanguíneo del mamífero vertebrado (37). Las formas promastigotes metacíclicas son la forma infectiva de los parásitos, los cuales son fagocitados por los macrófagos del hospedero mamífero vertebrado, donde cambian su forma intracelular a amastigotes dentro de los fagolisosomas (38). Las formas amastigotes también se multiplican por fisión binaria dentro de las células de los mamíferos vertebrados, continuando la multiplicación hasta que la célula huésped se llena de parásitos y se lisa, liberando los amastigotes en la circulación. Los amastigotes libres vuelven a invadir nuevas células y algunos son atraídos por el vector durante la ingesta de sangre, completando de esa manera el ciclo como se ilustra en la figura 1-1.

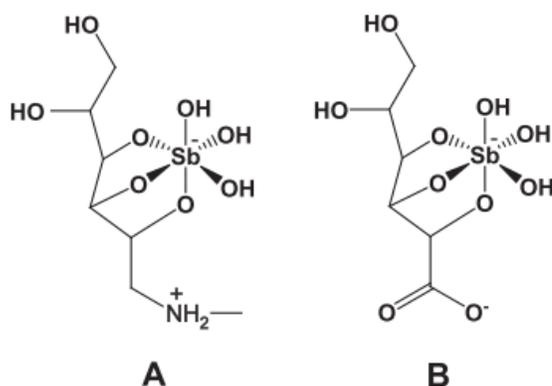


**Figura 1-1: Ciclo biológico de *Leishmania* spp.**

Insectos hembras del género *Lutzomyia*, inyectan los promastigotes de su probóscide durante las comidas de sangre (1). Los promastigotes llegan a la herida por punción y son fagocitados por macrófagos y otros tipos de células fagocíticas mononucleares (2). Una vez dentro de la célula los promastigotes se transforman en amastigotes (3), estos se multiplican por división simple y proceden a infectar otras células (4). Las hembras de *Lutzomyia* se infectan al ingerir células infectadas durante las comidas de sangre (5,6). Dentro del insecto, los amastigotes se transforman en promastigotes y se desarrollan en el intestino (7), seguido de esto migran hacia la probóscide, donde pueden infectar nuevamente (8) (39).

## 1.2 Antimoniales pentavalentes

El tratamiento más común para la leishmaniasis en los últimos 70 años, se basa en antimoniales pentavalentes inyectables. El antimoniato de meglumina (AM), comercializado como Glucantime® y el estibogluconato de sodio conocido como Pentostam®, siendo el primero la medicación más usada (11). Las dos estructuras químicas de los antimonios pentavalentes se pueden observar en la figura 1-2.



**Figura 1-2: Estructura de los antimonios pentavalentes:**

**A** = Antimonio de meglumina (Glucantime) y **B** = Estibogluconato de sodio (Pentostam) tomado de Frezard & Demicheli 2010 (12,40).

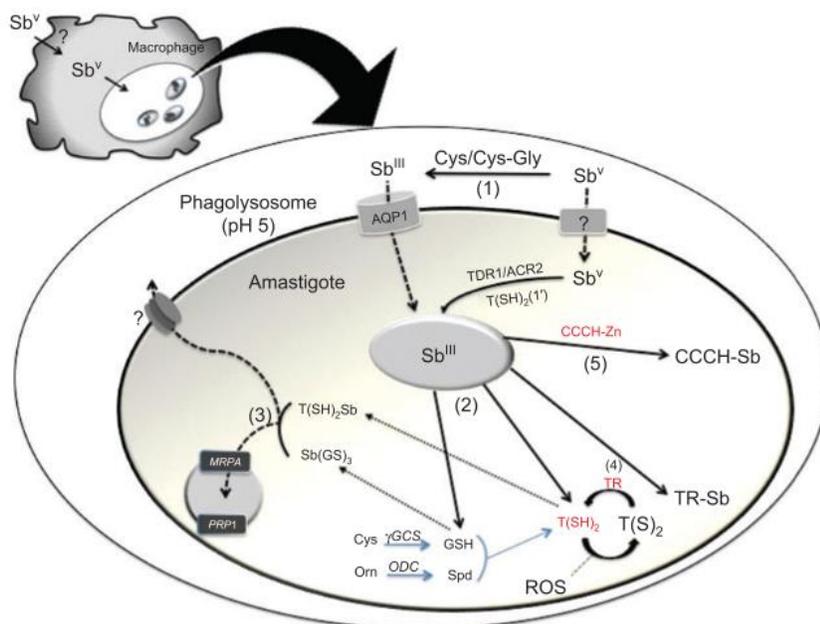
Según la guía para la atención integral del paciente con leishmaniasis de ministerio de la protección social, en Colombia se administra gratuitamente el Glucantime® para el tratamiento de LC (41). El esquema utilizado para su tratamiento es únicamente suministrado cuando se cuenta con confirmación parasitológica de la enfermedad. La dosis indicada es de 20 mg/Kg de peso/día durante 20 días, la cual es suministrada vía intramuscular, lo que garantiza alrededor de un 75% de curación, si el esquema se aplica completamente (8). La terapia con antimonio a menudo se acompaña de dolor local durante las inyecciones intramusculares y de efectos secundarios sistémicos, que requieren una supervisión médica muy cuidadosa (14,42). Los efectos secundarios típicos incluyen náuseas, vómitos, debilidad y mialgias, cólicos abdominales, diarrea, erupciones cutáneas, hepatotoxicidad y pancreatitis, junto con la cardiotoxicidad, como el efecto más grave (43).

La falla terapéutica al tratamiento con antimoniales, se puede presentar de manera temprana o tardía y puede asociarse a múltiples factores como lo son, las condiciones intrínsecas del parásito infectante, la carga parasitaria, la adherencia al tratamiento, el metabolismo del medicamento y la respuesta inmune del huésped (44,45). La falta de respuesta al fármaco representa otro problema importante en el control de la enfermedad, que puede estar relacionado con la resistencia que presentan los parásitos a los fármacos, la sobreexpresión

de moléculas transportadoras de tipo ABC en las células del huésped, o la inmunodepresión del huésped (46). Todas las limitaciones descritas anteriormente, contribuyen al no cumplimiento del esquema de tratamiento y eventualmente, a la falla terapéutica (47).

### 1.2.1 Mecanismo de activación y acción del antimonio (Sb)

El mecanismo de acción descrito para los antimoniales pentavalentes ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ), requiere la reducción a su forma activa  $\text{Sb}^{\text{III}}$ . La forma activa  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , interfiere directamente con el metabolismo de tioles. En parásitos kinetopláctidos, el principal tiol de bajo peso molecular es el tripanotión (TSH), en contraste con la mayoría de los otros organismos, que utilizan glutatión (GSH) como principal molécula antioxidante (48). Las principales funciones del GSH en el parásito incluyen, el mantenimiento de la homeostasis redox y la defensa contra el estrés químico y oxidativo (49). La intervención de los antimoniales en el metabolismo de esos tioles, conlleva al parásito de las especies de *Leishmania* spp. a una disminución de la capacidad de la función de los tioles, induciendo un flujo intracelular rápido de TSH y GSH dentro de la vacuola parasitófora, de igual manera, el  $\text{Sb}^{\text{III}}$  también inhibe la TSH reductasa, resultando en la acumulación de las formas disulfuro, tanto de TSH como de GSH de parásito (50). Estas condiciones actúan sinérgicamente contra los parásitos de *Leishmania* spp., conduciendo a un desequilibrio letal en la homeostasis celular, provocando así la muerte del parásito (42,51). En la figura 1-3, se puede observar el mecanismo de activación y acción que presentan los antimoniales.



### Figura 1-3: Mecanismo de activación y acción del antimonio:

La reducción de  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  puede estar mediada por: (1) los tioles Cys o Cys-Gly como agentes reductores dentro de los fagolisosomas, puede ser  $T(SH)_2$ , como el tiol predominante dentro del parásito o por la reductasa 1 dependiente de tiol (TDR1) o la antimoniato reductasa 2 (ACR2). (2) Formación de complejos entre  $Sb^{III}$  y tioles (GSH,  $T(SH)_2$ ). (3) El secuestro del medicamento puede estar mediado por la proteína A tipo transportador ABC de resistencia múltiple a fármacos (MRPA) o posiblemente por la proteína 1 de resistencia a la pentamidina (PRP1), en orgánulos intracelulares o por la extrusión activa por un transportador de membrana plasmática no identificado. (4) La unión de  $Sb^{III}$  al sitio activo e inhibición de la tripanotona reductasa, se encuentra mayor producción de ROS intracelular. (5) La expulsión de Zinc (Zn) gracias a la proteína de dedos de zinc mediante la competencia con Sb, lo que resulta en la interferencia con la regulación postranscripcional de la expresión génica. (?) Hace referencia a un mecanismo aún no dilucidado. **Convenciones utilizadas en la figura 1-3:** GSH, glutatión;  $\gamma$ GCS, enzima y glutamilcisteína sintasa;  $T(SH)_2$ , tripanotona; Spd, espermidina; ODC, ornitina descarboxilasa; TR, tripanotona reductasa; AQP1, aquagliceroporina; TDR1, reductasa dependiente de tiol 1; ACR2, antimoniato reductasa 2; MRPA, proteína A de resistencia a múltiples fármacos; Orn, ornitina; ROS, especies reactivas del oxígeno (51).

## **1.3 Liposomas y su uso como sistemas de transporte de medicamentos**

### **1.3.1 Antecedentes**

Los liposomas fueron descritos por primera vez por Bangham en 1968, quien demostró que cuando los fosfolípidos se suspenden en una solución acuosa, forman espontáneamente vesículas de doble capa de forma concéntrica multilamelares (52). Actualmente, el término liposoma se refiere a cualquier variedad de vesículas de fosfolípidos, bien sea unilamelar o multilamelar, que pueden variar con respecto a la composición, al tamaño y al método de producción (53).

Una de las aplicaciones que poseen los liposomas, es servir como vehículos portadores de moléculas y fármacos, debido a que son biológicamente activos y permeables en las células (54). En los últimos años las industrias cosméticas, farmacéuticas, alimentarias y agrícolas, han estudiado ampliamente el uso de la encapsulación de liposomas en sistemas de administración que pueden atrapar compuestos inestables como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes y elementos bioactivos (55). Los liposomas pueden atrapar compuestos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, evitar la descomposición de las combinaciones atrapadas y liberar los compuestos atrapados en los objetos designados (56,57). En la tabla 1-1, se pueden apreciar algunas de las ventajas y desventajas de los liposomas y su asociación con fármacos.

**Tabla 1-1: Ventajas y desventajas de los liposomas como transportadores de medicamentos.**

Tomado de Anwekar *et al* 2011 (58).

Ventajas	Desventajas
Los liposomas aumentan la eficacia y el índice terapéutico del fármaco (actinomicina D).	Baja solubilidad
Aumentan de la estabilidad a través de la encapsulación.	Corta vida media
No son tóxicos, son flexibles, biocompatibles, completamente biodegradables y no inmunogénicos para administraciones sistémicas y no sistémicas.	Algunas veces el fosfolípido sufre oxidación y reacción similar a la hidrólisis
Reducen la toxicidad del agente encapsulado (anfotericina B, Taxol).	Fuga y fusión de drogas / moléculas encapsuladas
Ayudan a reducir la exposición de tejidos sensibles a medicamentos tóxicos.	El costo de producción es alto
Flexibilidad para acoplarse con ligandos específicos del sitio para lograr una orientación activa.	Menos estables

La tecnología de encapsulación liposomal (*LET*, por sus siglas en inglés), es la nueva técnica de administración utilizada por los investigadores médicos para incorporar y transportar principios activos de características muy distintas, con el fin de mejorar sus propiedades terapéuticas, principalmente, su eficacia y seguridad (59). *LET*, es un método para generar espumas sub-microscópicas o liposomas, que encapsulan una gran variedad de materiales. Esos "liposomas", forman una barrera alrededor de su contenido, por lo tanto, lo protege de la oxidación y degradación a la que potencialmente se puede ver expuesta su contenido (60). Los liposomas se encuentran conformados por un núcleo acuoso atrapado por una o más bicapas compuestas de lípidos naturales o sintéticos. La composición de fosfolípidos naturales son biológicamente inertes y débilmente inmunogénicos, y tienen una toxicidad inherente baja (61,62).

El encapsulamiento de fármacos en liposomas, frecuentemente resulta en una mejor actividad terapéutica y/o una toxicidad reducida en comparación con el fármaco libre (63). En general, el cambio en la farmacocinética de los fármacos liposomales, puede llevar a una mejor biodisponibilidad del fármaco a células diana particulares que viven en la circulación, o más prominentemente, a sitios de enfermedades extravasculares, como por ejemplo,

tumores (64). Las mejoras recientes que se han realizado con el encapsulamiento de fármacos en liposomas incluyen formulaciones liposómicas de ácido trans-retinoico y daunorubicina, que ha recibido el consentimiento por parte de la agencia para la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (*FDA*, por sus siglas en Inglés), como tratamiento de primera línea para el sarcoma de Kaposi avanzado relacionado con el SIDA (65). Los beneficios que posee encapsular fármacos en liposomas se resumen en diferentes categorías en la tabla 1-2 (66).

**Tabla 1-2: Beneficios de los fármacos encapsulados en liposomas**

<b>Beneficios</b>	<b>Ejemplo</b>
1. Solubilidad mejorada de fármacos lipófilos y anfifílicos.	Anfotericina B, porfirinas, minoxidil, algunos péptidos y antraciclinas, respectivamente; medicamentos hidrófilos, como el agente anticanceroso doxorubicina o aciclovir.
2. Orientación pasiva a las células del sistema inmunológico, especialmente a las células del sistema fagocítico mononuclear	Antimoniales, anfotericina B, porfirinas, vacunas, inmunomoduladores.
3. Sistema de liberación sostenida de liposomas administrados sistémica o localmente.	Doxorubicina, arabinósido de citosina, cortisonas, proteínas biológicas o péptidos como la vasopresina
4. Mecanismo de evitación del sitio	Doxorubicina y anfotericina B
5. Orientación específica del sitio	Medicamentos antiinflamatorios, anticáncer, antiinfección.
6. Transferencia mejorada de moléculas hidrófilas cargadas.	Antibióticos, quelantes, plásmidos y genes.
7. Penetración mejorada en los tejidos.	Corticosteroides, anestésicos e insulina.

Se conoce que los liposomas son digeridos en el cuerpo por las células fagocíticas después de su internalización, por lo cual su característica principal es servir como vehículos ideales para digerir moléculas de fármacos dentro de los macrófagos. Los casos más conocidos de este mecanismo de “caballo de Troya”, son varias enfermedades parasitarias que normalmente usan las células del sistema fagocítico mononuclear como vehículos, dentro de las cuales se destacan las infecciones producidas por las diferentes especies de *Leishmania* spp. (67,68).

En la década de 1970, se produjo un avance importante en el uso de nanopartículas, cuando se descubrió que los fármacos antimoniales encapsulados en liposomas eran más efectivos que los medicamentos libres contra la LV de manera experimental (69). Ese mayor efecto leishmanicida de los antimoniales encapsulados se atribuyó a la propiedad de liberación sostenida del fármaco de los liposomas y a su tendencia natural a eliminarse de la circulación por los macrófagos del hígado y del bazo, los cuales son sitios principales de infección para

las especies de *Leishmania* spp y por lo tanto, inducían una dismunición significativa de parásitos en el hígado (70).

Con el transcurso de los años, se ha venido desarrollando formulaciones liposómicas innovadoras de antimonio de meglumina, las cuales han llevado consigo importantes ventajas farmacéuticas y farmacocinéticas sobre las formulaciones convencionales (40,71). Una de estas ventajas ha sido la reducción en los tamaños de los liposomas, los cuales pasaron de 400 nm a 175 nm, dando como resultado niveles en sangre más sostenidos de antimonio (72). Actualmente, para aumentar la estabilidad y prolongar los liposomas en el tiempo de circulación en la sangre, se ha empleado la PEGilación, que consiste en enlazar covalentemente a los fosfolípidos de los liposomas cadenas de polietilenglicol (PEG) (73). Recientemente, se ha investigado sobre el impacto de la pegilación de los liposomas de antimonio de meglumina, mostrando una eficacia mejorada la eliminación del parásito en el bazo y la médula ósea en modelos de infección con parásitos de especies de *Leishmania* (*Leishmania*) (74). También, se ha observado que la pegilación de liposomas encapsulando antimonio de meglumina mejora la dirección del fármaco a órganos del sistema de fagocitos mononucleares en modelos de infección con diferentes especies de *Leishmania* spp. (75).

### **1.3.2 Producción de liposomas para el encapsulamiento de antimoniales.**

La complejidad de las formulaciones de los fármacos liposomales, en comparación con los fármacos convencionales, implica no solo los problemas farmacológicos, sino también problemas tecnológicos relacionados con su producción, que deben considerarse en el diseño racional de tales formulaciones. En ese sentido, la elección del método de preparación de la formulación basado en liposomas constituye un punto crítico. El nivel de dificultad aumenta considerablemente cuando el fármaco que se va a encapsular es soluble en agua, ya que lograr una alta eficiencia de encapsulación y una estabilidad a largo plazo durante el almacenamiento, resulta ser un gran desafío (12).

En la tabla 1-3, se resume los principales métodos propuestos para la encapsulación de fármacos antimoniales en liposomas. Hasta hace poco, se habían utilizado esencialmente dos métodos diferentes (40). El primero de esos métodos consistió en la hidratación de una película delgada de lípidos con una solución del fármaco, seguida o no por sonicación de la suspensión de liposomas (19). El otro método, conocido como el proceso de evaporación de fase reversa, implica la formación de una emulsión de agua en aceite, utilizando la solución de fármaco como una fase acuosa, seguida de la evaporación del disolvente orgánico, que genera un cambio de fase y la formación de una suspensión vesicular (12).

**Tabla 1-3: Formulaciones de fármacos antimoniales en liposomas.**

Tipo de liposoma (método de preparación)	Composición lipídica (diámetro medio de la vesícula)	Eficiencia de carga	Sb%/relación de lípidos (w/w)	Condición de almacenamiento	Ref
Vesículas multilamelares (hidratación de película delgada)	DPPC/CHOL/DCP PC/CHOL/PA (> 1000 nm)	8%	< 0.5	Suspensión acuosa	(70,76)
Pequeñas vesículas unilamelares (ultrasonidos)	PC/CHOL/DCP (< 150 nm)	< 10%	< 0.1	Suspensión acuosa	(68)
Vesículas oligolamelares (evaporación en fase inversa)	DPPC/CHOL/DCP (500nm)	30 - 50%	3 - 6	Suspensión acuosa	(77)
Niosomas (fusión de lípidos + hidratación + homogeneización)	Surfactante no iónico /CHOL/DCP (100 - 600nm)	10 - 45%	< 2	Suspensión acuosa o liofilizada.	(78,79)
Vesículas oligolamelares de gran tamaño (hidratación de liposomas vacíos liofilizados)	DSPC/CHOL/DCP (> 1000nm)	30 - 50%	3 - 6	Forma liofilizada	(71)
Vesículas oligolamelares de tamaño mediano (hidratación de liposomas vacíos liofilizados con sacarosa)	DSPC/CHOL/DCP (250 - 450nm)	30 - 50%	3 - 6	Forma liofilizada	(15,80)

**Abreviaturas:** DPPC: *dipalmitoylphosphatidylcholine*; CHOL: *colesterol*; DCP: *dicetylphosphate*; PC: *phosphatidylcholine*; DSPC: *Distearoylphosphatidylcholine*; PA: *Phosphatidic acid* (Por sus siglas en inglés).

La principal ventaja del método de evaporación de fase reversa, en comparación con el primero, es que produce mayores eficiencias de encapsulación del fármaco y mayores proporciones de fármaco encapsulado en lípidos (51). Esas características significan que se debe inyectar una cantidad menor de lípidos para introducir la misma cantidad de antimonial, lo que hace que el tratamiento sea más seguro y más económico (81). Sin embargo, los liposomas preparados por el proceso de evaporación en fase inversa pueden ser tóxicos a altas dosis, debido a trazas residuales inevitables de disolvente orgánico en la formulación final del liposoma. Además, el método de evaporación de fase inversa no es apropiado para la producción industrial a gran escala (75). Una limitación significativa de ambos métodos es que las preparaciones de liposomas resultantes podrían almacenarse solas como suspensiones acuosas. Sin embargo, en esa condición se presenta fuga significativa del fármaco a lo largo del tiempo, desde la fase acuosa interna a la externa (74).

Las composiciones típicas de las formulaciones de liposomas son mezclas de fosfatidilcolina (PC) natural o sintética (CHOL). Se ha encontrado que la inclusión de fosfolípidos cargados negativamente, como el dicetilfosfato (DCP), mejora la eficiencia de encapsulación del antimonio de meglumina (AM). Las fosfatidilcolinas asociadas a cadenas hidrocarbonadas largas y saturadas, tales como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), han sido preferidas para el transporte de medicamentos, debido a su menor susceptibilidad a la oxidación y menor permeabilidad de la membrana (70). Como se ilustra en la tabla 1-3, el tamaño y los tipos de laminaridad de las vesículas de los liposomas tienen una fuerte influencia en la eficiencia de encapsulación de los fármacos solubles en agua. La tendencia general es que las vesículas con un tamaño más grande o unilamelares, tienen un mayor volumen interno de agua y una mayor eficiencia de carga del fármaco (82).

La vida útil de la suspensión de vesículas, la estabilidad química de los componentes de los liposomas y el costo de los lípidos, impactan directamente la producción industrial de formulaciones basadas en fosfolípidos (78). En ese contexto, se han propuesto tensioactivos o sustancias no iónicas químicamente estables, como los ésteres de monoalquilo o dialquil polioxietileno o ésteres de sorbitán, como una alternativa de bajo costo a los fosfolípidos para la preparación de vesículas llamadas niosomas (83). Otra ventaja potencial de los niosomas es que su método de preparación puede ser más adecuado para la producción a gran escala (84).

Recientemente, se introdujeron nuevos procesos para la preparación de AM liposomal, con importantes ventajas tecnológicas sobre los métodos descritos anteriormente. Esos nuevos procesos se basan en la preparación de liposomas vacíos cargados negativamente en estado liofilizado y la posterior rehidratación de los liposomas liofilizados con una solución acuosa del fármaco antimonial (19). Los liposomas pueden almacenarse como vesículas vacías liofilizadas preformadas y la rehidratación puede realizarse justo antes de su uso. Ese procedimiento evita los problemas de estabilidad que surgen del almacenamiento a largo plazo de los liposomas en presencia del fármaco soluble en agua (15,74).

### 1.3.3 Asociación de compuestos antimoniales a liposomas para el tratamiento de la leishmaniasis

Las quimioterapias actuales para el tratamiento de la leishmaniasis tienen una serie de limitaciones como el alto costo, prescripción parenteral, alta toxicidad, desarrollo de resistencia y efectos secundarios adversos (42). Por lo tanto, la evaluación de otras terapias es importante en el tratamiento de la enfermedad (85).

En los últimos años, los desarrollos en nanotecnología, han proporcionado nuevos enfoques en el tratamiento de la leishmaniasis (86). La nanotecnología ha producido dos tipos de procedimientos: El primero se basa en el diseño de sistemas de entrega de nano-fármacos, para medicamentos comunes y convencionales, como es el caso de la nanomodificación para la optimización y eficacia de la Anfotericina B (87). Ese método ha recibido una notable atención en el campo del desarrollo de fármacos y presenta una de las terapias antileishmania más esperanzadoras, debido a las propiedades farmacocinéticas mejoradas; además, dicho sistema de administración de fármacos, mejora la eficacia y disminuye la toxicidad con efecto sobre el metabolismo del fármaco, incluyendo la absorción, distribución y excreción (88). Por esta razón, los sistemas de administración de nano-fármacos resultan en alta eficacia, alto efecto de liberación, baja toxicidad, alta concentración del medicamento y una vida útil prolongada en circulación sistémica (89).

El segundo procedimiento para mejorar los fármacos usados para el tratamiento de la leishmaniasis es la nanonización del fármaco, aquí los macrófagos fagocitan las nanopartículas como cuerpos extraños, causando una administración específica hacia los parásitos de *Leishmania* spp que residen dentro de los macrófagos (90). Esas nanopartículas se han utilizado con éxito en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades por sus propiedades químicas, físicas y mecánicas especiales en comparación con las formas habituales. Las nanopartículas, las vesículas o niosomas multilamelares, los liposomas y las microesferas son nuevas estrategias para el sistema de administración directa de fármacos en la vacuola parasitófora en el que reside *Leishmania* spp (91,92).

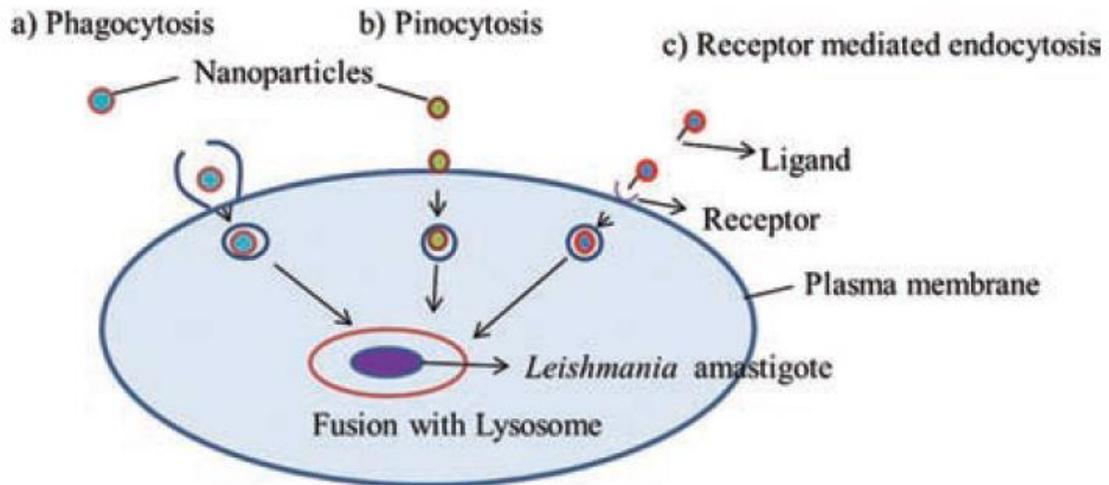
En estudios realizados *in vivo* en modelos murinos, se ha demostrado que la asociación de fármacos anti-leishmania con liposomas reduce los niveles de toxicidad en las células (16). De igual manera se ha demostrado que la asociación con de antimonio pentavalente y liposomas reduce los niveles de toxicidad y disminuye la carga parasitaria en órganos como el hígado y el vaso (74). Por todo lo anterior, se considera importante realizar estudios de caracterización del comportamiento de esas asociaciones para proponer opciones de mejora de la vida útil de los fármacos usados para el tratamiento de la leishmaniasis.

## 1.4 Internalización de liposomas a la membrana

El diseño del sistema de suministro de nanopartículas para medicamentos existentes o nuevos, es un enfoque prometedor contra la leishmaniasis, debido a su mayor eficacia terapéutica, menor toxicidad, menor dosis requerida, liberando los medicamentos de manera sostenible y controlada, como se ha descrito en modelo de leishmaniasis visceral. Además, el sistema de nanopartículas también protege a los fármacos sensibles e inestables de la degradación, lo que permite un tiempo de residencia prolongado en el cuerpo humano y, por lo tanto, prolonga el tiempo entre administraciones (93). Tanto los fármacos hidrófobos, como los hidrófilos pueden disolverse, atraparse, adsorberse, unirse o encapsularse en la matriz de nanopartículas (94). Dependiendo del método de preparación, se pueden obtener nanopartículas, nanoesferas o nanocápsulas con diferentes propiedades y perfil de liberación para los fármacos encapsulados (95).

El diseño del sistema de administración de nano fármacos para medicamentos convencionales es uno de los enfoques alentadores para la terapia antimicrobiana (96). En los últimos años, el uso de sistemas de administración de medicamentos, para dirigir agentes antileishmaniales a las células del sistema reticuloendotelial, se ha considerado como una estrategia eficaz para la prevención y tratamiento de la enfermedad (97). Se pueden emplear dos estrategias para administrar medicamentos antileishmaniales a macrófagos infectados: administración pasiva de medicamentos y administración activa de medicamentos. La administración pasiva de fármacos emplea el uso de nanopartículas convencionales por ejemplo nanopartículas poliméricas o liposómicas sin modificación de la superficie donde la administración activa de fármacos terapéuticos específicos de la célula asociados con las nanopartículas se logra uniendo un ligando específico de la célula en la superficie de un portador, lo que permite la acumulación de fármaco en la célula diana (98).

El suministro de fármaco mediado por nanopartículas utilizado en el tratamiento de la leishmaniasis visceral ha mostrado una eficacia superior a la de los fármacos libres que pueden atribuirse a la captación eficiente por parte de las células del sistema reticuloendotelial. Los factores que influyen principalmente en la eficiencia de la captación de partículas por los macrófagos son el tamaño, las propiedades superficiales de las nanopartículas y la ruta endocítica empleada como se observa en la figura 1-4. Se ha investigado el suministro de fármacos mediado por nanopartículas mediante una estrategia de orientación pasiva y activa de fármacos en modelos de leishmaniasis visceral de manera experimental (99).



**Figura 1-4: Mecanismo de entrada de nanopartículas en macrófagos infectados con parásitos de *Leishmania* spp.**

En el esquema se representa las vías endocíticas potenciales para la entrada de las nanopartículas en los macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania* spp. Tomado de Want *et al* 2016 (100).

Basados en la pregunta de investigación planteada y en los antecedentes del uso de los antimoniales liposomales en otras especies de *Leishmania* spp., la hipótesis de investigación del presente estudio fue que la formulación de Glucantime encapsulado en liposomas puede tener un efecto leishmanicida significativamente mayor al Glucantime no encapsulado sobre los parásitos de *L. braziliensis* y una menor citotoxicidad en las células humanas, eso permitiría abrir el camino a nuevas investigaciones sobre cómo mejorar la biodisponibilidad de los tratamientos de primera línea para uso clínico.



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Determinar la susceptibilidad intracelular de *L. braziliensis* a antimoniales liposomales y Glucantime® en macrófagos humanos de línea celular U-937 *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la citotoxicidad de los antimoniales liposomales y Glucantime® en células de macrófagos humanos U-937 *in vitro*.
- Comparar el efecto de los antimoniales liposomales y Glucantime® convencional en un modelo de infección *in vitro*.



## 3. Metodología

### 3.1 Descripción general de la estrategia experimental abordada en el estudio

La presente investigación, es un estudio de tipo experimental en el que se evaluó la citotoxicidad de las formulaciones de Glucantime liposomal (encapsulado) y Glucantime® convencional (no encapsulado), en macrófagos humanos diferenciados de la línea celular U-937 mediante ensayos de viabilidad *in vitro*. De igual manera, se evaluó el efecto leishmanicida de esas formulaciones mediante ensayos de dosis respuesta de amastigotes intracelulares de *Leishmania Viannia braziliensis* expuestos a Glucantime encapsulado y no encapsulado. Los ensayos de dosis respuesta permitieron evaluar la susceptibilidad intracelular de *L. (Viannia) braziliensis*, determinando la carga parasitaria en los macrófagos humanos U937 infectados con los parásitos y tratados con diferentes concentraciones de las formulaciones de Glucantime, por microscopia. Finalmente, se realizó la comparación del efecto leishmanicida de las formulaciones de Glucantime evaluadas en el modelo de infección *in vitro* mediante la determinación de la susceptibilidad intracelular y del índice de selectividad (Figura 3-5).

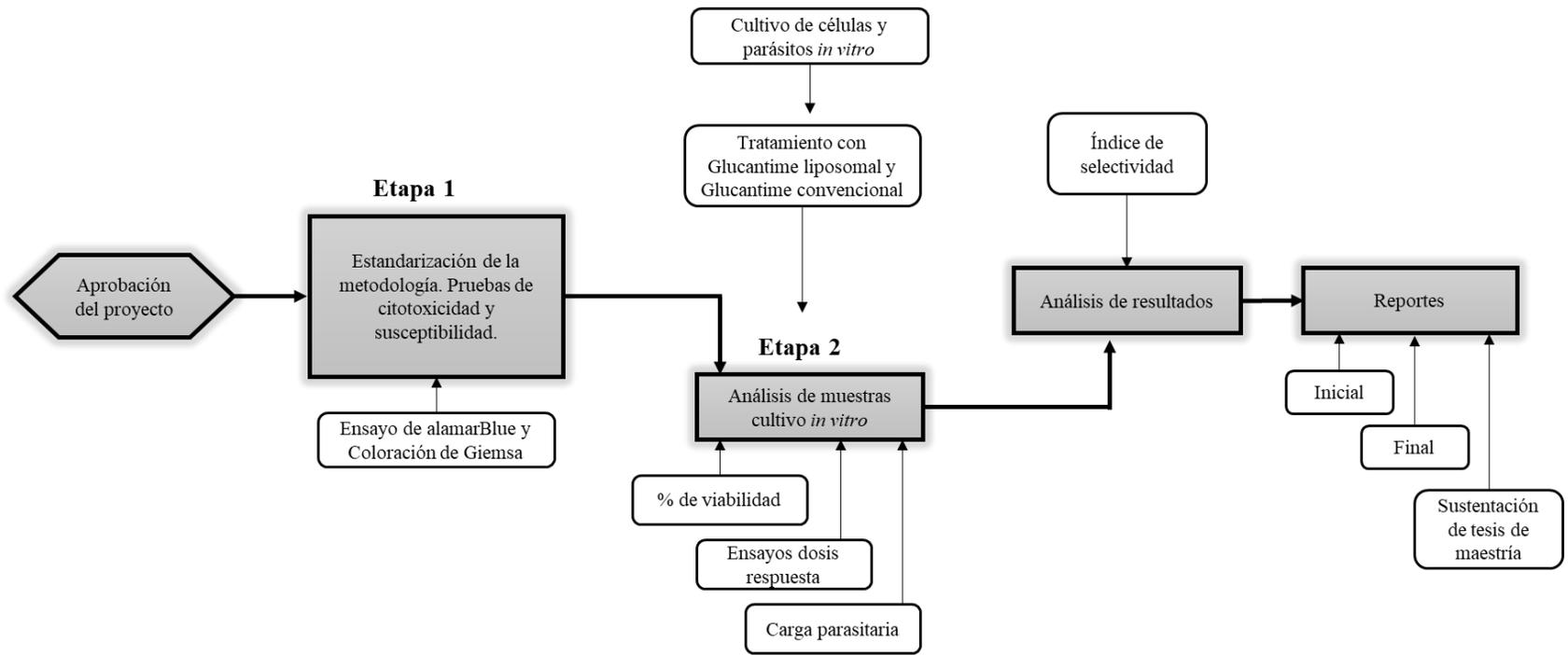


Figura 3-5: Diagrama representativo de la estrategia metodológica general utilizada en el estudio.

### 3.2 Consideraciones éticas

La presente investigación comprendió el desarrollo de técnicas y procedimientos experimentales realizados rutinariamente en el laboratorio de parasitología de la Universidad Nacional de Colombia. La presente investigación contribuyó al conocimiento del comportamiento *in vitro* de una nueva formulación de Glucantime® asociado a liposomas en un modelo de infección experimental, utilizando macrófagos infectados con parásitos de *L. braziliensis*.

A continuación, se detallan aspectos éticos que fueron contemplados para el desarrollo de la presente investigación y que estuvieron en concordancia con los principios de la bioética universales y con la resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. Específicamente al Capítulo I, título IV de dicha resolución, donde se contemplan los aspectos relacionados a la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos y la bioseguridad en las investigaciones biomédicas donde se manipulan ese tipo de patógenos.

- El laboratorio de parasitología de la Universidad Nacional de Colombia, cuenta con las instalaciones y equipos de laboratorio necesarios, que garantizaron el manejo seguro de los microorganismos patógenos utilizados en el desarrollo de la investigación.
- Las personas a cargo de la investigación fueron entrenadas por personal calificado para la manipulación, transporte, utilización, descontaminación y eliminación de los desechos tóxicos que se produjeron en el laboratorio.
- El laboratorio de parasitología, igualmente dispuso y socializó debidamente el manual de bioseguridad, donde se encuentran consignadas las normas, reglamentos y riesgos que enmarcaron la presente investigación.

El presente proyecto fue sometido y aprobado por el comité de ética de investigación de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, con acta de evaluación N°.019-320-17, donde se menciona que el comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos y, por lo tanto, emitió concepto aprobatorio.

### 3.3 Cultivo *in vitro* de parásitos

Se utilizaron promastigotes de *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivados en medio *Schneider's Insect medium* a 27 °C, suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivo (SFB) y 1 % de penicilina-streptomina (100 U/mL penicilina/100 µg/mL estreptomina). Los parásitos fueron sub-cultivados realizando cambio de medio cada tres días y se utilizaron para la infección de macrófagos en fase estacionaria entre 5 o 6 días de cultivo y en un pase no superior a 10 subcultivos.

### 3.4 Cultivo *in vitro* de la línea celular U-937

Los monocitos de la línea celular humana U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de SFB inactivo y 1 % de penicilina-streptomina a 37 °C. Las células U-937 fueron sub-cultivadas realizando cambio de medio cada tres días y para todos los experimentos se utilizaron células en un pase no superior a 8. Los macrófagos de la línea celular U-937, fueron obtenidos por la diferenciación de monocitos utilizando 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

### 3.5 Liposomas y Glucantime®

Los liposomas de tipo DSPC/CHOL/DCP (*Distearoylphosphatidylcholine / cholesterol / Dicaptylphosphate*, por sus siglas en inglés), los cuales son característicos debido a que mejora la eficiencia de encapsulación del AM y DSPC/CHOL/DPPG (*Distearoylphosphatidylcholine / cholesterol / Dipalmitoyl phosphatidyl glycerol*, por sus siglas en inglés), que son característicos debido a su menor susceptibilidad a la oxidación (12), en su forma liofilizada, fueron gentilmente cedidos por el doctor Frédéric Frézard, director del laboratorio de biofísica de sistemas nanoestructurados de la Universidad Federal de Minas Gerais en Brasil. El Glucantime® convencional fue gentilmente proporcionado por la secretaría de salud de Cundinamarca.

### 3.6 Rehidratación de liposomas con Glucantime®

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito por Soares et al 2017, el cuál consistió en emplear una solución de Glucantime® a una concentración de 40 g/L en 1 mL, la cual fue adicionada a los liposomas liofilizados de tipo DCP a concentración lipídica de 55 g/L. La mezcla de liposomas con Glucantime, se homogenizó e incubó durante 45 minutos a 65 °C, empleando vortex para su mejor homogenización cada 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se diluyó la mezcla 1:6 con PBS y se centrifugó a 23.000 gravedades por 40 minutos a 15 °C. El sedimento se resuspendió en 1 mL de NaCl 0,15

mol/L (19,75). En paralelo, una alícuota de los liposomas liofilizados fue rehidratada y caracterizada en el laboratorio del Dr. Frézard con el propósito de determinar el tamaño de las partículas y la concentración de antimonio encapsulado. Los datos de caracterización de las partículas de liposomas rehidratados con Glucantime proporcionados por el laboratorio del Dr. Frézard mostraron que la concentración de antimonio en los liposomas rehidratados fue de 8 µg/mL. Dicha concentración fue la establecida para realizar los cálculos de las concentraciones en los ensayos de citotoxicidad y susceptibilidad.

### **3.7 Evaluación de citotoxicidad**

#### **3.7.1 Citotoxicidad de Glucantime Liposomal y Convencional en monocitos U-937**

Una suspensión de células de la línea celular monocítica humana U-937 fue cultivada a  $1 \times 10^4$  células/pozo, en placas de 96 pozos con medio RPMI 1640 suplementado. Las células fueron incubadas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en presencia de concentraciones crecientes de Glucantime® convencional (no encapsulado) y Glucantime liposomal (encapsulado). Las concentraciones de antimonio evaluadas en los ensayos de citotoxicidad fueron 1024, 512, 256, 128, 64, 32 y 16 µg/mL durante 72 horas de tratamiento, realizando recambio de medio con nueva dosis de antimonio a las mismas concentraciones a las 48 horas. Las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado se diluyeron en medio RPMI suplementado con 10 % de SFB hasta ajustar cada una de las concentraciones establecidas. Para este experimento se utilizó como control positivo monocitos no tratados, los cuales aseguraban que tenían el 100 % de viabilidad. La evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado se realizó como describe en el numeral 3.7.3.

#### **3.7.2 Citotoxicidad de nanoliposomas en monocitos U-937**

Una cantidad de  $1 \times 10^4$  células/pozo en suspensión de la línea celular humana U-937, se cultivaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en el numeral 3.7.1 para determinar la citotoxicidad de los nanoliposomas sin medicamento. Las células U937 fueron expuestas a diferentes concentraciones de nanoliposomas de tipo DCP y DPPG resuspendidos con PBS (la concentración lipídica utilizada fue de 14,08, 7,04, 3,52, 1,76, 0,88, 0,44, 0,22, 0,11 y 0,055 mg/mL). Las células tratadas con los nanoliposomas sin medicamento fueron incubadas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, cumplido el tiempo, se realizó cambio de medio con las mismas concentraciones y se dejó completar hasta las 72 horas de tratamiento. En todos los experimentos se incluyó un control positivo de 100 % de viabilidad que consistió en utilizar células monocíticas U-937 cultivadas únicamente en medio RPMI suplementado con 10 % de SFB al cual no se le añadió ningún tipo de tratamiento.

### 3.7.3 Evaluación de citotoxicidad mediante ensayos de viabilidad por alamarBlue

Al cumplir 66 horas de incubación, a las células U-937 tratadas con Glucantime encapsulado o no encapsulado y a las células tratadas con los nanoliposomas sin medicamento, se les adicionó el reactivo de alamarBlue a una concentración final de 12,5 µg/mL y se incubaron durante 6 horas más. Una vez cumplidas las 72 horas de exposición a las diferentes formulaciones, se realizó la lectura de la placa con las células en el lector de placas Ultramark Microplate Imaging System de Bio-Rad, utilizando los filtros de 570 y 630 nm. Los datos de los ensayos de viabilidad fueron analizados mediante la determinación del porcentaje de viabilidad celular empleando la fórmula extraída del protocolo para análisis de muestras por el método alamarBlue® proporcionado por el fabricante del producto (101) (Ver ecuación 3-1).

#### Fórmula para la determinación del porcentaje de viabilidad (%V)

**Convecciones de la fórmula:** Donde en el numerador se encuentra la diferencia de las absorbancias con cada longitud de onda obtenida para los pozos de prueba y en el numerador la diferencia de las absorbancias obtenidas con cada longitud de onda para los pozos donde se encuentra el control de crecimiento positivo.

$$\%V = \frac{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A \lambda_2 \text{ de la dilución del pozo de prueba}}{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A^\circ \lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A^\circ \lambda_2 \text{ del control de crecimiento positivo no tratado}} \times 100 \quad (3-1)$$

Donde:

$\epsilon_{OX}$  = coeficiente de extinción molar de la forma oxidada de alamarBlue, los cuales cambia el valor dependiendo de la longitud de onda:

$$570\text{nm} = 80,586$$

$$630\text{nm} = 34,798$$

$\epsilon_{RED}$  = coeficiente de extinción molar de la forma reducida de alamarBlue, los cuales cambia el valor dependiendo de la longitud de onda:

$$570\text{nm} = 155,677$$

$$630\text{nm} = 5,494$$

**A** = absorbancia de los pozos de prueba, los cuales indican donde se encuentran las muestras que se quieren analizar.

$A^-$  = absorbancia del pozo de control negativo. El pozo de control negativo debe contener medio RPMI + alamarBlue.

$A^0$  = absorbancia del control positivo, el cual indica el pozo donde se encuentran las células sin tratamiento que aseguran el 100% de viabilidad.

$\lambda 1$  = Longitud de onda a 570nm

$\lambda 2$  = Longitud de onda a 630nm

**Pozo de prueba:** Indica las muestras que se quieren analizar, las cuales pertenecen a células tratadas.

**Control de crecimiento positivo:** Indica las muestras pertenecientes a células sin tratamiento.

### **3.8 Evaluación de susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime liposomal encapsulado vs Glucantime® convencional no encapsulado**

#### **3.8.1 Diferenciación de monocitos de la línea celular humana U-937 a macrófagos**

Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células por pozo en una placa de 24 pozos, a cada pozo se le colocó una laminilla estéril para realizar posteriormente los ensayos de susceptibilidad. Las células fueron diferenciadas con Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) a una concentración de 100 ng/mL, durante 96 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, como descrito en el numeral 3.4 (102).

#### **3.8.2 Infección de macrófagos diferenciados de la línea celular U-937 con *L. braziliensis***

Los promastigotes de *L. (Viannia) braziliensis* en fase estacionaria cultivados en medio *Schenieder* fueron opsonizados con suero AB+ durante 1 hora a 34 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células U-937 diferenciadas a macrófagos se infectaron con los parásitos opsonizados en una relación 10:1 (parásito: célula) durante 2 horas. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS para retirar los parásitos extracelulares y se adicionó medio RPMI fresco suplementado con 10 % de SFB y se incubaron durante 24 horas adicionales para permitir la transformación de los parásitos a amastigotes intracelulares en las células infectadas (103).

### 3.8.3 Tratamiento con Glucantime convencional y liposomal

Se prepararon concentraciones de Glucantime® convencional y liposomal de tipo DCP en las dosis de 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, y 2 µg/mL para tratar los macrófagos diferenciados de la línea celular U-937 que fueron previamente infectados con *L. (Viannia) braziliensis*, dejando un control sin medicamento (102–104). Después de 48 horas en presencia del medicamento, se realizó recambio de medio y se adicionó una segunda dosis de exposición con el medicamento a las células, en las mismas concentraciones indicadas anteriormente y se incubó nuevamente a 34 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta completar 72 horas de tratamiento con las diferentes formulaciones en estudio.

### 3.8.4 Coloración de Giemsa para ensayos de evaluación de susceptibilidad *in vitro* de *L. braziliensis* a antimoniales liposomales vs Glucantime.

Una vez terminadas las 72 horas de tratamiento con las diferentes formulaciones de Glucantime, a las células se les retiró el medio de cultivo y con ayuda de una pinza estéril se retiraron las laminillas que se encontraban dentro de cada uno de los pozos de las placas. Las laminillas conteniendo las células, se fijaron con metanol por 2 minutos y se les adicionó colorante de Giemsa diluido en buffer de fosfatos, dejando las células fijadas en contacto con el colorante durante 10 minutos. Las laminillas se evaluaron por microscopía convencional usando el objetivo de 100X y se utilizaron las siguientes ecuaciones para la determinación del porcentaje de infección en células no tratadas (ecuación (3-2)), en células tratadas (ecuación (3-3)), determinación de la carga parasitaria (ecuación (3-4)) e índice parasitario (ecuación (3-5)).

- **Porcentaje de infección para células infectadas no tratadas:** Este porcentaje se determinó a partir del número de células infectadas por cada 100 células contadas y se realizó por triplicado, realizando un conteo total de 300 células.

$$\% \text{ de infección (células no tratadas)} = \frac{N^{\circ} \text{ de células infectadas}}{N^{\circ} \text{ de células contadas}} \times 100 \quad (3-2)$$

- **Porcentaje de infección para células tratadas:**

$$\begin{aligned} \% \text{ de infección (células tratadas)} \\ = \frac{N^{\circ} \text{ medio de celulas infectadas tratadas}}{N^{\circ} \text{ medio de celulas infectadas NO tratadas}} \times 100 \end{aligned} \quad (3-3)$$

- **Carga parasitaria:**

$$\text{Carga promedio de amastigotes} = \frac{\text{N}^\circ \text{ amastigotes por pozo}}{\text{N}^\circ \text{ de células infectadas por pozo}} \quad (3-4)$$

- **Índice parasitario:**

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ medio de carga parasitaria en células infectadas tratadas} \times \text{N}^\circ \text{ medio de células infectadas tratadas}}{\text{N}^\circ \text{ medio de carga parasitaria en células infectadas NO tratadas} \times \text{N}^\circ \text{ medio de células infectadas NO tratadas}} \times 100 \quad (3-5)$$

### 3.9 Índice de selectividad

El índice de selectividad (IS) es una proporción que mide la relación entre la concentración citotóxica media máxima (CC50), la cual se refiere a la concentración suficiente de un compuesto para causar la muerte al 50 % de las células viables del huésped y la concentración inhibitoria media máxima (IC50) específica de un compuesto, la cual hace referencia a la concentración mínima para inhibir el 50 % del patógeno (105).

En la situación ideal, se desea tener un valor de IC50 por debajo del valor de CC50, lo cual significaría que se está eliminando primero al patógeno antes de eliminar al huésped (106). Para estimar la selectividad del medicamento, se necesita que el IS sea un número de alto valor, lo cual significaría que se está logrando eliminar el parásito antes que su célula hospedera, es decir, el compuesto tendría selectividad hacia el parásito y no hacia las células (107,108). El IS se calculó empleando la ecuación 3-6:

- **Índice de selectividad**

$$IS = \frac{CC50 \text{ macrófagos}}{IC50 \text{ amastigotes de } L \text{ (Viannia) braziliensis}} \quad (3-6)$$

### 3.10 Análisis estadístico

Los análisis de citotoxicidad y susceptibilidad se determinaron hallando el valor de CC50 e IC50 respectivamente, este se calculó utilizando el software Graphpad 7.0 a partir de los valores obtenidos en las absorbancias de los ensayos de alamarBlue mencionados en la sección 3.7.3 y en el conteo por microscopía de Giemsa de los macrófagos infectados con *L. braziliensis* y tratados con los tipos de formulaciones como se mencionó en la sección 3.8.4. Para la determinación de los valores de CC50 e IC50, se empleó un modelo de regresión no lineal, utilizando una curva de dosis respuesta con pendiente variable, donde se evaluaron de 7 a 9 puntos del tratamiento a diferentes concentraciones. Los análisis comparativos de las variables cuantitativas se realizaron utilizando la prueba T de Student y para la comparación de las varianzas de los dos tipos de formulaciones se utilizó la prueba F de Fisher. En todos los experimentos se determinaron coeficientes de variación para la determinación de la variación intra e interensayo. Las diferencias de  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas.

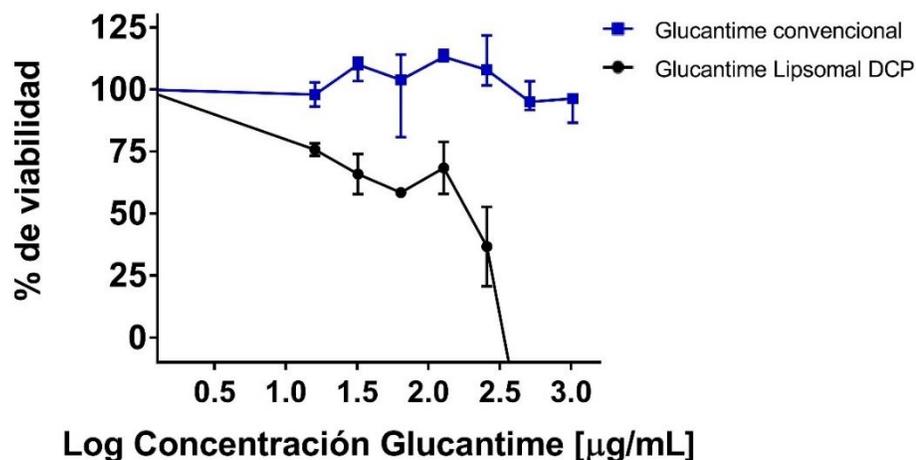
## 4 Resultados

### 4.1 Evaluación de la citotoxicidad de liposomas

#### 4.1.1 Citotoxicidad de Glucantime convencional y liposomal en monocitos U-937

La exposición de los monocitos de la línea celular U-937 a las diferentes formulaciones determinó que el Glucantime® en su formulación convencional no encapsulado, no presenta citotoxicidad en el rango de concentraciones evaluadas, aun en concentraciones superiores a 1024 µg/mL. Por el contrario, las células que fueron expuestas a el Glucantime liposomal de tipo DCP, muestran una reducción en su porcentaje de viabilidad, lo cual indica que este tipo de formulación es tóxica para las células, presentando un valor de CC50 de 425,4 µg/mL. En la figura 4-6, se observa la comparación de las curvas de dosis respuesta de los ensayos de citotoxicidad entre las dos formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado sobre monocitos de la línea celular U-937, en ella se puede evidenciar que las células que fueron tratadas con el Glucantime convencional no encapsulado no presentan una reducción de su viabilidad por lo que la viabilidad tiende a permanecer constante a las diferentes concentraciones, sin embargo, en la figura se presenta con un valor de CC50 > 1000 µg/mL, este resultado es un valor aproximado que da el programa, debido a que el modelo implementado no tiene un ajuste adecuado con las concentraciones utilizadas de Glucantime® convencional, lo que no es suficiente para generar una caída en la curva de porcentaje de viabilidad. Sin embargo, como se observa en la figura 4-6 aún en concentraciones superiores a los 1000 µg/mL siguen presentando porcentajes de viabilidad cercanos al 100 %. Por otro lado, las células tratadas con el Glucantime liposomal encapsulado muestran una evidente caída del porcentaje de viabilidad en las células. En este ensayo se puede observar que entre las formulaciones se encontró diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) del Glucantime liposomal encapsulado comparado con el Glucantime convencional no encapsulado.

A



B

Formulación	CC50 [µg/mL]	Rango de la concentración de Glucantime [µg/mL] (95% IC)	R <sup>2</sup>	Valor de P de Glucantime liposomal comparado con Glucantime convencional
Glucantime convencional	> 1000	Indeterminado	Indeterminado	< 0,0001
Glucantime liposomal DCP	425,5	328,6 a ∞	0,9597	

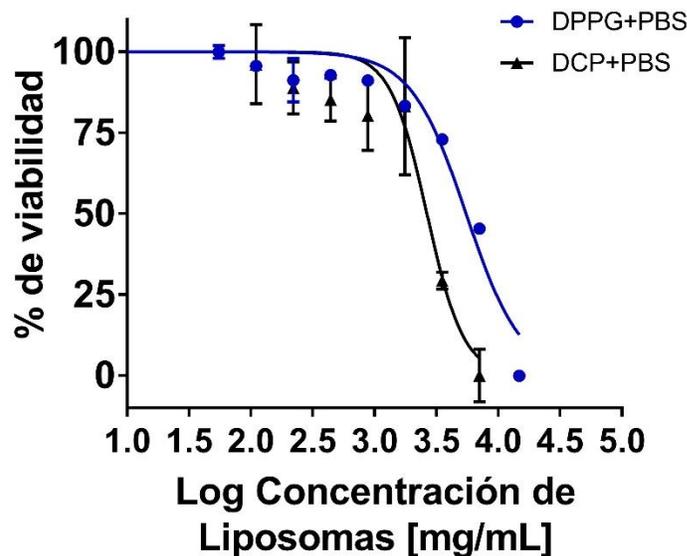
**Figura 4-6: Evaluación de la citotoxicidad de Glucantime convencional vs Glucantime liposomal en monocitos U-937. A. Ensayo de dosis respuesta para la determinación de citotoxicidad de Glucantime convencional vs Glucantime liposomal en monocitos U-937.**

**A.** Se muestran el comportamiento del porcentaje de viabilidad celular de los monocitos de la línea celular U-937 expuestos a distintas concentraciones de Glucantime® convencional y liposomal. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. **B.** Valores de CC50, rango de la concentración de Glucantime, R<sup>2</sup> y valor de significancia obtenidos para las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado en los ensayos de citotoxicidad.

#### **4.1.2 Citotoxicidad de nanoliposomas de tipo DCP y DPPG con PBS en monocitos U-937**

La exposición de monocitos de la línea celular U-937 a los dos tipos de liposomas DCP y DPPG determinó que ambos tipos presentaban un efecto citotóxico para las células, los nanoliposomas de tipo DCP mostraron un CC50 de 2,64 mg/mL y los DPPG de 5,48 mg/mL, mostrando para ambos casos una reducción del porcentaje de viabilidad significativo. En la figura 4-7, se observa la comparación de las curvas dosis respuesta de los ensayos de citotoxicidad entre los dos tipos de liposomas los DCP y los DPPG sobre monocitos de la línea celular U-937, en ella se puede evidenciar que para ambos casos se presenta una reducción en la viabilidad de la células, sin embargo, las células que fueron expuestas a los líposomas de tipo DCP muestran una reducción de la viabilidad utilizando concentraciones más bajas de liposomas en comparación con las que fueron expuestas a los liposomas de tipo DPPG. En este ensayo se puede observar que entre los dos tipos de liposomas se encontró diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) de los liposomas de tipo DPPG comparados con los liposomas de tipo DCP.

A



B

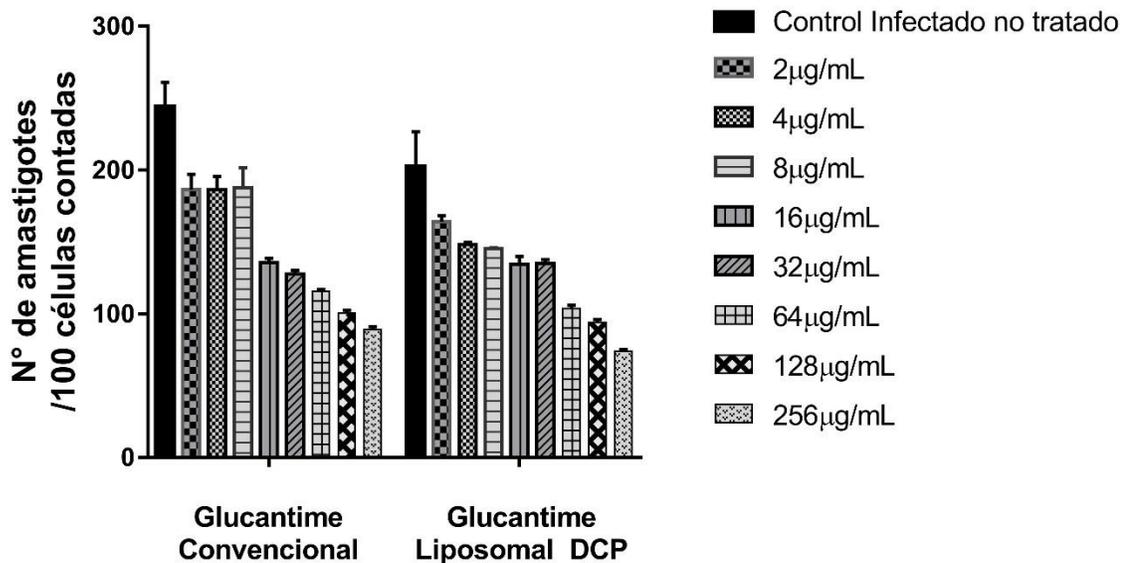
Tipo de liposoma	CC50 [mg/mL]	Rango de la concentración de liposomas [mg/mL] (95% IC)	R <sup>2</sup>	Valor de P de liposomas de tipo DCP comparado con los de tipo DPPG
DPPG + PBS	5,48	4,64 a 6,41	0,9412	< 0,0001
DCP + PBS	2,64	2,11 a 3,18	0,8686	

**Figura 4-7: Evaluación de la citotoxicidad de nanoliposomas de tipo DCP y DPPG sin medicamento. A. Ensayo de dosis respuesta para la determinación de citotoxicidad de nanoliposomas de tipo DCP y DPPG en monocitos U-937.**

**A.** Se muestra el comportamiento del porcentaje de viabilidad celular de monocitos U-937 expuestos a distintas concentraciones de nanoliposomas de tipo DCP y DPPG. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. **B.** Valores de CC50, rango de la concentración de liposomas, R<sup>2</sup> y valor de significancia obtenidos para los dos tipos de liposomas DCP y DPPG en los ensayos de citotoxicidad.

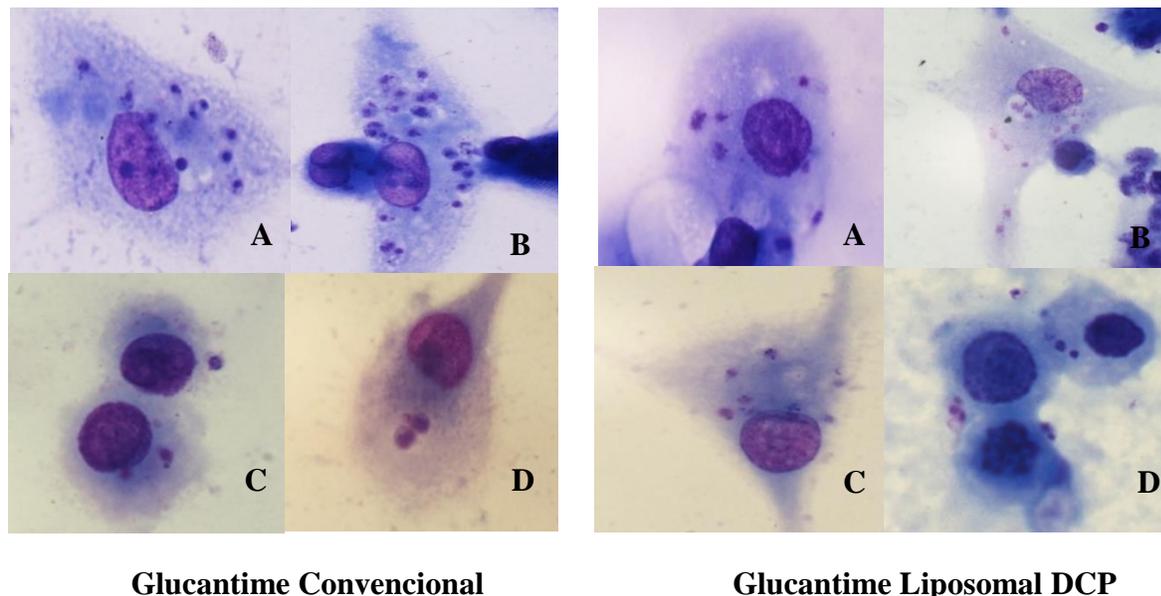
## 4.2 Evaluación de la susceptibilidad intracelular de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional vs Glucantime liposomal

Los macrófagos pertenecientes a la línea celular U-937 que fueron infectados con *L. braziliensis* y tratados con las dos formulaciones de medicamento mostraron que para la formulación de Glucantime® convencional no encapsulado se presentó una reducción de la carga parasitaria superior al 50 % a partir de concentraciones de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que en el Glucantime liposomal encapsulado, se evidenció una reducción de la carga a partir de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto se puede evidenciar en la figura 4-8, donde se muestra la variación de la carga parasitaria de cada una de las muestras tratadas a diferentes concentraciones, comparadas con el control infectado no tratado. En la figura 4-9 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía gracias a la cámara incorporada en el microscopio Nikon Eclipse 501, donde se evidencia la presencia o ausencia del número de amastigotes de las muestras tratadas a diferentes concentraciones comparadas con el control infectado no tratado.



**Figura 4-8: Comportamiento de la carga parasitaria en número de amastigotes por células contadas.**

Se observa la comparación que posee la reducción de la carga parasitaria utilizando las distintas formulaciones de medicamento, en donde se evidencia que existe una reducción más notoria de la carga parasitaria empleando concentraciones más bajas de Glucantime convencional en comparación de la reducción al utilizar Glucantime liposomal. En el eje X se presentan los dos tipos de formulaciones empleadas y en el eje Y se observa la carga parasitaria la cual consiste en el N° de amastigotes / 100 células contadas. Las concentraciones evaluadas están ubicadas de menor a mayor iniciando con el control infectado no tratado hasta la concentración evaluada más alta la cual pertenece a 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; estas se muestran de izquierda a derecha respectivamente.

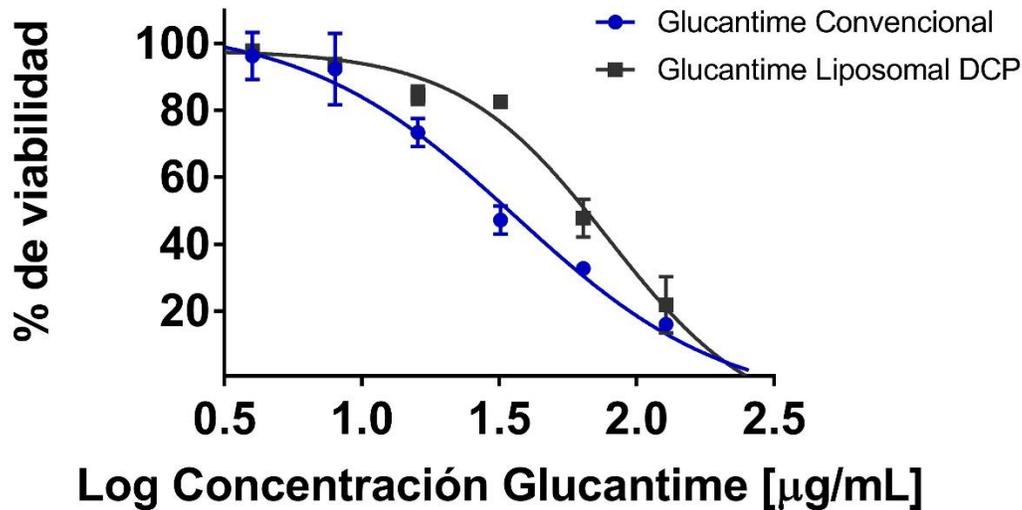


**Figura 4-9: Imágenes representativas del efecto leishmanicida del Glucantime® convencional vs Glucantime liposomal de tipo DCP en macrófagos infectados con *L. braziliensis*.**

**A** Células U-937 infectadas no tratadas. **B** Células U-937 infectadas tratadas con 2 µg/mL. **C** Células U-937 infectadas tratadas con 64 µg/mL. **D** Células U-937 infectadas tratadas con 256 µg/mL.

Los ensayos de macrófagos infectados con *L. braziliensis* y tratados con los dos tipos de formulaciones mostraron que el Glucantime® en su formulación convencional no encapsulado, presentó un mejor efecto leishmanicida a menores concentraciones, mostrando un valor de IC50 de 36,14 µg/mL, comparado con el Glucantime liposomal encapsulado, el cual mostró un valor de IC50 de 78,9 µg/mL. En la figura 4-10 se observa la comparación de las curvas de dosis respuesta de los ensayos de susceptibilidad entre las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado sobre los macrófagos infectados con *L. braziliensis*, en ella se puede evidenciar que la formulación de Glucantime convencional no encapsulado presenta una reducción de la viabilidad de los parásitos empleando menos concentración del medicamento, en comparación con la formulación del Glucantime liposomal encapsulado, el cual muestra una reducción de la viabilidad de los parásitos a una mayor concentración del medicamento. En este ensayo se puede observar que entre las formulaciones se encontró diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) del efecto leishmanicida del Glucantime liposomal encapsulado comparado con el efecto leishmanicida del Glucantime convencional no encapsulado.

A.



B.

Formulación	IC50 [µg/mL]	Rango de la concentración de Glucantime [µg/mL] (95% IC)	R <sup>2</sup>	Valor de P del efecto leishmanicida del Glucantime liposomal comparado con el Glucantime convencional
Glucantime convencional	36,14	24,8 a 106,7	0,9796	< 0,0001
Glucantime liposomal DCP	78,90	60,1 a 166,6	0,9850	

**Figura 4-10: Efecto intracelular leishmanicida de Glucantime® convencional y Glucantime liposomal en macrófagos U-937 infectados con *L. braziliensis*.**

**A.** Se muestra el comportamiento de porcentaje de viabilidad de los parásitos de *L. braziliensis* expuestos a distintas concentraciones del Glucantime® convencional y liposomal. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. **B.** Valores de IC50, rango de la concentración de Glucantime, R<sup>2</sup> y valor de significancia obtenidos para las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado en los ensayos de susceptibilidad.

### **4.3 Índice de selectividad (IS) de las formulaciones de Glucantime® convencional y Glucantime liposomal**

A partir de los valores obtenidos de los ensayos de citotoxicidad evaluados para los monocitos de línea celular U-937 y los ensayos de susceptibilidad intracelular de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional y liposomal, se determinó el valor de índice de selectividad utilizando la ecuación 3-6 descrita en la metodología, numeral 3.9. Pese a que no se obtuvo un valor fijo de citotoxicidad para el Glucantime® convencional, se empleó un valor teórico de CC50 el cual correspondía a  $>1000\mu\text{g/mL}$  (118) y se estimó un valor de IS superior a  $> 27,6$  más efectivo contra el parásito que contra las células hospederas. El valor de IS para el Glucantime liposomal de tipo DCP fue de 5,39. Esos resultados indican que la selectividad de la formulación de Glucantime® convencional no encapsulado es más adecuada que la formulación de Glucantime liposomal encapsulado.

## 5 Discusión de resultados

Los efectos adversos graves que presentan los medicamentos a base de antimonio pentavalente usados para el tratamiento de las formas clínicas de la leishmaniasis, motivan estrategias innovadoras que permitan mitigar esos efectos nocivos de los fármacos de uso clínico. Los avances en nanotecnología han permitido implementar el uso de fármacos antiparasitarios encapsulados en liposomas para reducir los niveles de citotoxicidad en las células humanas y aumentar el efecto leishmanicida (109,110). De acuerdo con esto, en la presente investigación se determinó la susceptibilidad intracelular de *L. braziliensis* a antomoniales liposomales y Glucantime® en macrófagos humanos de línea celular U-937 *in vitro*.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de los monocitos en suspensión de la línea celular U-937 expuestos a dos formulaciones de medicamentos mediante el ensayo de alamarBlue, en donde se observó que el Glucantime® convencional no encapsulado resulta ser no tóxico para las células evaluadas. La no citotoxicidad *in vitro* del Glucantime en líneas celulares ya ha sido reportado en otros estudios realizados por Wyllie y Fairlamb en 2006. En esos estudios, los autores evaluaron la sensibilidad de los macrófagos de la línea celular THP-1 expuestos a  $Sb^{III}$  y  $Sb^V$ , observando que la forma trivalente  $Sb^{III}$  presentó un valor de CC50 de 25  $\mu\text{g/mL}$  en los macrófagos THP-1, en contraste la forma pentavalente  $Sb^V$  no presentó efectos sobre el crecimiento o la viabilidad de las células THP-1 *in vitro* y por lo tanto no fue citotóxico para las células humanas incluso a concentraciones de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (48).

Así mismo, se evaluó la citotoxicidad en monocitos en suspensión de la línea celular U-937 a Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP, en donde se evidenció que ese tipo de formulación presenta mayores niveles de citotoxicidad en las células comparado con el Glucantime no encapsulado, siendo 3 veces más tóxico, lo que sugiere que posiblemente la composición química de los tipos de liposomas esté ocasionando el efecto citotóxico en las células, ya que de acuerdo con los resultados el Glucantime® en su forma libre no encapsulada, no resulta ser tóxico para las células, aun en altas concentraciones. En un estudio realizado por Ferreira y colaboradores en 2014, utilizando un modelo experimental *in vitro* con macrófagos de línea celular J774.A.1 de ratón, empleando Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP para evaluar citotoxicidad, los autores determinaron que la asociación entre Glucantime y liposomas de tipo DCP, igualmente causaban una reducción significativa de la viabilidad celular de la línea J774.A.1, de más del 30% a concentraciones iguales o superiores a los 250  $\mu\text{g/mL}$  (111). Lo anterior concuerda con los

hallazgos en nuestro estudio, debido a que en la línea celular U-937 se observó una reducción de viabilidad celular de más del 50 % a partir de concentraciones iguales o superiores a 425,5 µg/mL, lo que sugiere que ese tipo de liposomas DCP presentan toxicidad cuando se trabaja en modelos experimentales *in vitro*.

Los resultados obtenidos de citotoxicidad del Glucantime® encapsulado en liposomas de tipo DCP, nos llevó a confirmar el posible efecto citotóxico de los nanoliposomas de tipo DCP, realizando ensayos de citotoxicidad con los nanoliposomas vacíos. Con el propósito de buscar alternativas potenciales para encapsular el Glucantime en futuras investigaciones, se evaluó el efecto citotóxico de un nuevo tipo de nanoliposoma (nanoliposoma de tipo DPPG). Los valores de CC50 obtenido para los nanoliposomas de tipo DCP y DPPG sugieren que ambos tipos de liposomas presentan citotoxicidad en las células U-937 *in vitro*, presentando valores CC50 de 2,64 y 5,48 mg/mL respectivamente. A pesar de los resultados, existe evidencia que los liposomas de tipo DPPG, los cuales son derivados a partir de lípidos sintéticos, no interfieren en el metabolismo de las membranas celulares y presentan un alto nivel de absorción, lo que provoca a largo plazo, que el medicamento llegue correctamente a la célula diana (112). Esto sugiere que posiblemente, ese tipo de liposomas DPPG, sea más específicos para el tratamiento de las especies de *Leishmania* spp., en modelos *in vivo* que en modelos *in vitro*.

En segundo lugar, se evaluó la susceptibilidad intracelular de *L. braziliensis* al Glucantime® convencional no encapsulado y el Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP, en un modelo de infección *in vitro* utilizando macrófagos de la línea celular U-937. Los valores de IC50 obtenidos en los ensayos de susceptibilidad, mostraron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ), entre las formulaciones evaluadas. El valor de IC50 para el Glucantime convencional no encapsulado resultó ser dos veces menor con respecto al valor de IC50 de Glucantime liposomal DCP encapsulado 36,14 µg/mL y 78,9 µg/mL respectivamente, lo cual sugiere que la susceptibilidad de *L. braziliensis* expuesta a la formulación de Glucantime liposomal DCP, no resulta ser más efectiva que la formulación no encapsulada en el modelo de infección *in vitro* utilizado. En contraste, en modelos experimentales *in vivo*, en un estudio realizado por Ferreira y colaboradores en 2014, donde se emplea un modelo de infección con ratones BALB/c infectados con *L. infantum* y tratados de igual manera con los dos tipos de formulaciones de antimonio de meglumina encapsulado en liposomas de tipo DCP y antimonio de meglumina no encapsulado, muestran que para la formulación de liposomas DCP encapsulado, se produce un efecto leishmanicida de más del 40 % de la población de parásitos en el bazo e hígado empleando una sola dosis de medicamento, comparado con el AM libre el cual no mostró una reducción en su carga parasitaria en estos órganos (111). El contraste encontrado con nuestros resultados, sugiere que posiblemente el Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP puede ser viable para modelos *in vivo* y no en modelo *in vitro*, donde según estudios anteriores se ha evidenciado una reducción en la toxicidad en las células de los animales tratados y provocan una reducción satisfactoria de la carga parasitaria en comparación con el fármaco convencional.

En otros estudios realizados en modelos *in vivo* que utilizan liposomas de tipo DCP, como el realizado por Schettini y colaboradores en 2003, realizando ensayos para evaluar la biodisponibilidad del Glucantime encapsulado en liposomas DCP en un modelo de infección en perros para el tratamiento de leishmaniasis visceral, se evidenció que una sola dosis de la formulación encapsulada de Glucantime, suministrada por vía intravenosa, no era suficiente para la eliminación del parásito, debido a una posible disminución de la biodisponibilidad del fármaco dentro del organismo, especialmente por órganos como el hígado y el vaso, los cuales poseen mecanismos de excreción eficaces para la eliminación del Sb<sup>v</sup>, (113,114). Así mismo, en otro estudio realizado en un modelo de infección *in vivo* para la especie *L. chagasi*, los resultados demostraron que el Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP generaron una recuperación parcial de las lesiones ocasionadas por la infección y una reducción significativa de la carga parasitaria en los órganos afectados. Sin embargo, los autores sugieren que se debe utilizar más de una dosis del medicamento, debido a que la biodisponibilidad del fármaco en el organismo no resulta ser suficiente para poder eliminar el parásito en su totalidad (115). En contraste con nuestro estudio, esto posiblemente sugiere que en modelos *in vitro* la biodisponibilidad del Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP al interior de la célula no sea la adecuada, lo cual provocaría que el medicamento no llegue a causar daños suficientes sobre el parásito, lo que explicaría un efecto leishmanicida menor en comparación con el Glucantime convencional no encapsulado.

Por otro lado, en modelos de infección *in vitro* se han realizado estudios que involucran otro tipo de liposomas para el encapsulamiento de los antimoniales, tal es el caso de los realizados por Treiger y colaboradores en 2011, los cuales emplean un modelo de infección *in vitro* con macrófagos murinos RAW 264.7 (TIB-71) infectados con *L. major* y utilizan para el tratamiento de las células, Glucantime encapsulado en liposomas de tipo PC (*Soy phosphatidylcholine*, por sus siglas en Inglés). En ese estudio, los autores evidenciaron que el Glucantime encapsulado en ese tipo de liposomas, tenían un efecto citotóxico en los amastigotes de *L. major* 10 veces más efectivo en comparación con el Glucantime® en su forma convencional, a concentraciones alrededor de 25  $\mu\text{M}$  (17). Esos resultados y los resultados derivados de la presente investigación, sugieren que los diferentes tipos de modelos experimentales, en conjunto con los diferentes tipos de liposomas, pueden generar resultados contrastantes que limitan la adecuada optimización y desarrollo de nuevas formulaciones del Glucantime. Por lo tanto, es necesario estandarizar y homogenizar procedimientos experimentales adecuados a los diferentes modelos para potenciar eficientemente el uso de la nanotecnología en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Los liposomas de tipo PC han sido usados igualmente en otros modelos de infección *in vivo* utilizando ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L. major* tal y como lo reportan Momeni y colaboradores en 2013. En esos estudios, se evidencia una reducción exitosa del tamaño de la lesión luego del tratamiento con una dosis de 124 mg/mL de Glucantime encapsulado en liposomas, administrado por vía subcutánea alrededor del sitio de lesión, con una frecuencia de dos veces por semana en los ratones tratados (116). Esos resultados

indican que los liposomas de tipo PC, también pueden ser una alternativa efectiva para aumentar el efecto leishmanicida del Glucantime, por lo que se podrían implementar en modelos *in vitro* para el tratamiento de *L. braziliensis* en macrófagos de la línea U-937.

Los resultados contrastantes de nuestro estudio, igualmente pueden ser explicados por la forma de internalización de los liposomas a través de la membrana celular, puede explicar porque el fármaco no esté siendo correctamente liberado dentro de la célula y por el contrario cause un efecto citotóxico en la célula humana. En la investigación realizada por Want y colaboradores en 2016, menciona que las estrategias de internalización de liposomas al interior de la célula, se basan en la administración pasiva y activa de fármacos, donde la administración pasiva consiste en emplear el uso de nanopartículas como liposomas sin modificación de su superficie y la administración activa se logra uniendo un ligando específico de la célula en la superficie de los liposomas, lo que permite la internalización del fármaco en la célula. Los factores que influyen principalmente en la eficiencia de la captación de partículas por los macrófagos son: el tamaño, las propiedades superficiales de las nanopartículas y la ruta endocítica empleada (100). Lo anterior sugiere que las características de los liposomas empleados en nuestro estudio, no son las ideales para poder transportar el medicamento al interior de la célula en el modelo *in vitro* experimentado, por lo cual causó efectos secundarios como toxicidad en las células en suspensión y un bajo efecto leishmanicida en los macrófagos infectados.

La presente investigación es uno de los primeros estudios en utilizar un modelo de infección *in vitro* con macrófagos de línea celular U-937 infectados con *L. braziliensis* para evaluar el efecto leishmanicida de formulaciones liposomales de antimonio pentavalente. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que el Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP no presentan un efecto leishmanicida superior al observado por la formulación del Glucantime no encapsulado en amastigotes intracelulares de *L. (Viannia) braziliensis* en el modelo de infección utilizado. Según los resultados, habría que utilizar una concentración de medicamento superior a los 78,9 µg/mL, la cual es incluso 2,5 veces más alta que la utilizada en su forma convencional (31,1 µg/mL), para poder causar un efecto leishmanicida satisfactorio en los amastigotes intracelulares. Sin embargo, se sugiere implementar nuevas estrategias en estudios posteriores, que mejoren el tratamiento de *L. braziliensis* en modelos *in vitro* basadas en la encapsulación del Glucantime con otro tipo de liposomas.

Este estudio demostró que el Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP no podía eliminar de manera eficaz los amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* en comparación con el Glucantime® convencional no encapsulado. La formulación de Glucantime® convencional no encapsulado es aproximadamente tres veces más efectiva que el Glucantime liposomal para reducir la carga de parásitos de *L. braziliensis* en los macrófagos de la línea celular U-937. Sin embargo, en otros estudios utilizando macrófagos peritoneales obtenidos de ratones BALB/c, los cuales fueron infectados con *L. infantum* y tratados con antimonio de meglumina en su forma convencional y encapsulado en liposomas de tipo PC,

se demostró que la formulación liposomal fue 63 veces más eficaz al momento de eliminar parásitos intracelulares en contraste con el fármaco libre, y no mostró citotoxicidad para las células (118). Eso sugiere, la posibilidad de implementar otro tipo de liposomas diferentes a los DCP en el tratamiento de *L. braziliensis* en modelos *in vitro*.

Con el fin de dar sustento a los resultados obtenidos a partir de datos analizados por procedimientos experimentales convencionales, se propuso evaluar la susceptibilidad de *L. braziliensis* a antimoniales liposomales y Glucantime® por un método de biología molecular mediante RT-qPCR. Los métodos moleculares han demostrado ser altamente sensibles, específicos y además ser cuantitativos, en comparación con los métodos convencionales como los ensayos de evaluación de la susceptibilidad mediante microscopía (119). Los resultados se pueden ver en el Anexo 1 sección A.3, donde se demuestra que la susceptibilidad de *L. braziliensis* presenta el mismo comportamiento que en los análisis realizados por microscopía, donde la formulación de Glucantime® convencional no encapsulado resulta tener mejor efecto leishmanicida con valores de IC50 de 1,87 µg/mL, en comparación con el Glucantime liposomal encapsulado, el cual mostró un valor de IC50 superior a > 607 µg/mL. Estudios de susceptibilidad empleando técnicas de biología molecular, como el realizado por Romero y colaboradores en 2010, han permitido proponer los métodos moleculares como alternativas de análisis robustos de la susceptibilidad y viabilidad intracelular de *Leishmania (Viannia) panamensis* a Glucantime® convencional en un modelo de infección *in vitro* utilizando macrófagos humanos de línea celular U-937 mediante RT-qPCR. En ese estudio, se determinó un valor de IC50 de 2 µg/mL, similar al obtenido en la presente investigación para los parásitos intracelulares en el modelo usado (102). De acuerdo con esos resultados, y los resultados derivados de la implementación del método molecular para la evaluación de la susceptibilidad intracelular de *Leishmania* en el presente estudio, reafirman la pertinencia del uso de esos métodos moleculares en ensayos de susceptibilidad.

Finalmente, para mejorar el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, el uso de liposomas se considera una alternativa viable para mejorar la administración de Glucantime® y evitar los efectos secundarios que ocasiona el tratamiento. Uno de los principales problemas que presentan las formulaciones liposomales, es el tiempo que el medicamento permanece en circulación, debido a que el sistema fagocítico tiende a eliminarlo fácilmente (120). Como alternativa, se ha evidenciado que la inclusión de fosfolípidos como el polietilenglicol (PEG), en la composición de liposomas, ha minimizado ese potencial problema. La presencia de PEG en los liposomas reduce su captación por el sistema fagocítico humano, lo cual provoca un aumento en la circulación sanguínea de la formulación y de esta manera aumenta la biodisponibilidad del fármaco durante el tratamiento (121). Esto se ha evidenciado en estudios realizados por Azevedo y colaboradores en 2014 y Soares y colaboradores en 2017, donde ambos estudios utilizando el mismo tipo de modelo de infección *in vivo*, ratones de tipo BALB/c infectados con *L. infantum* y tratados con antimonio de meglumina encapsulado en liposomas de tipo PEG, demostraron una disminución de la carga parasitaria de más del 40 % en hígado y en bazo y una disminución en cuando a los niveles de toxicidad en las células. La utilización de liposomas de tipo PEG

podría ser una alternativa como estrategia para el encapsulamiento del Glucantime y su potencial uso como tratamiento para infecciones causadas por parásitos de la especie *L. braziliensis*.

En conclusión, se logró identificar a los parásitos de *L. braziliensis* presentan menor susceptibilidad al Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP en comparación con la susceptibilidad registrada al Glucantime® convencional. Se propone mejorar la encapsulación del Glucantime utilizando otros tipos de liposomas que efectivamente reduzcan la carga parasitaria y no causen efectos citotóxicos en las células hospederas.

## 6 Conclusiones

- Los amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* en células U-937 presentan menor susceptibilidad al Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP en comparación con la susceptibilidad registrada al Glucantime convencional.
- La formulación de Glucantime encapsulado en liposomas de tipo DCP presentó citotoxicidad en células U-937, en comparación con el Glucantime convencional no encapsulado.
- Tanto los liposomas de tipo DCP como los de tipo DPPG rehidratados con PBS, resultaron ser tóxicos para los monocitos en suspensión de la línea celular U-937.

## 7 Recomendaciones

- Se recomienda replicar los ensayos de susceptibilidad de *L. braziliensis* en modelos *in vitro* empleando liposomas funcionales como los de tipo PEG.
- Se recomienda evaluar la susceptibilidad de *L. braziliensis* a las formulaciones de Glucantime liposomal encapsulado en modelos *in vitro* por métodos moleculares.

## **A. Anexo 1. Susceptibilidad intracelular de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional y liposomal determinada por RT-qPCR**

### **A.1 Introducción**

Los métodos convencionales para determinar la susceptibilidad del parásito se han caracterizado por presentar baja sensibilidad y en ocasiones ser inespecíficos al momento de su cuantificación, tal es el caso de la visualización de los amastigotes por el método de microscopía con Giemsa, sin embargo este ensayo se caracteriza por determinar de manera directa la presencia o ausencia de parásitos correspondientes al género *Leishmania* spp., dentro de los macrófagos (122). En cuanto a los métodos no convencionales, se han establecido diferentes métodos de amplificación de ADN y ARN para la detección y cuantificación de parásitos de *Leishmanis* spp., los cuales incluyen la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y la amplificación cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos (QT-NASBA) (123). Como método de amplificación de ARN cuantitativo, se ha empleado el uso de la PCR de transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR), este ensayo combina las ventajas de la qPCR y la QT-NASBA y ha demostrado ser altamente eficaz para el diagnóstico de leishmaniasis a partir de material clínico humano (124,125). En el presente estudio se quiso evaluar la susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional vs Glucantime liposomal DCP, en un modelo de infección *in vitro* en macrófagos humanos de línea celular U-937, por el método de RT-qPCR.

## A.2 Metodología

### A.2.1 Lisis celular

La lisis celular se realizó para los cultivos *in vitro* que correspondían a los macrófagos infectados con *Leishmania (Viannia) braziliensis* y tratados con el Glucantime® convencional no encapsulado y el Glucantime liposomal encapsulado. Una vez cumplidas las 72 horas de tratamiento, se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos con ayuda de una bomba de vacío y pipetas de vidrio de 1 mL. Una vez retirado el medio por completo se añadieron 600 µL de reactivo Tri-Reagent® en cada uno de los pozos de prueba, este volumen se homogenizó suavemente con ayuda de una micropipeta con el fin de desprender todas las células que se encontraban adheridas al fondo de la placa, seguido de esto se retiró todo el volumen del reactivo de cada uno de los pozos de prueba correspondientes a las distintas concentraciones del tratamiento y se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Las lisis celulares de cada uno de los tratamientos fueron guardadas a -70 °C hasta su uso.

### A.2.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de los cultivos *in vitro* de macrófagos infectados con *L. braziliensis* y tratados con los dos tipos de formulaciones, se utilizó el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). La extracción se realizó con la lisis celular obtenida anteriormente y se siguieron las recomendaciones del kit. Una vez obtenido el ARN, este se cuantificó en el equipo NanoDrop 2000c para determinar la cantidad de ARN obtenido durante la extracción y así mismo observar que este no presentara ningún tipo de contaminación por proteínas o ADN. Una vez cuantificado el ARN, se mantuvo guardado a -70°C hasta su uso.

### A.2.3 Retrotranscripción

De las células infectadas y tratadas con el Glucantime® convencional no encapsulado, se hizo la retrotranscripción de 250 ng de ARN, mientras que para las células infectadas y tratadas con el Glucantime liposomal encapsulado se retrotranscribieron 75,2 ng, esto debido a la baja concentración de ARN obtenido durante la extracción. Para realizar la retrotranscripción se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems el cual contenía 10X RT Buffer, 10X RT Random Primers, 25X dNTP Mix (100mM) y MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/µL. Se sintetizaron las muestras a las cuales se les realizó extracción de RNA, empleando un volumen final de 20µL y utilizando las condiciones del perfil térmico específicas del kit 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos y finalmente 85° durante 5 minutos. El cDNA obtenido fue conservado a -20 °C hasta su uso.

### A.2.4 Cuantificación de parásitos intracelulares por RT-qPCR

Para la evaluación de la susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional y glucantime liposomal, se realizó una RT-qPCR Duplex con sondas TaqMan® para medir la presencia de cDNA sintetizado a partir de la extracción de ARN de *Leishmania braziliensis* y macrófagos. Para los parásitos se empleó como blanco la subunidad pequeña de RNA ribosomal 18s (SSU) el cual se encuentra conservado para todas las especies de *Leishmania* spp., el cual se utilizó como gen de interés y para los macrófagos se empleó el ARN mensajero del gen  $\beta$ -2Microglobulina ( $\beta$ -2M), como gen de referencia (126). Los primers y sondas diseñadas para el gen  $\beta$ -2M amplifican un fragmento de 82pb, mientras que los 18s amplifican un fragmento de 171pb, las secuencias de los primers y sondas se encuentran en la tabla A.2-4.

**Tabla A.2-4: Secuencias de primers y sondas empleadas en los ensayos de RT-qPCR.**

Secuencias primers y sondas			
	Forward 5' – 3'	Reverse 5' – 3'	Sonda 5' – 3'
Subunidad 18s rRNA de <i>Leishmania</i>	CCAAAGTGTGG AGATCGAAG	GGCCGGTAAAGGCC GAATAG	ACCATTGTAGTCCA CACTGC Marcada con FAM y BHQ2
mRNA $\beta$ - 2M de células humanas	GCTCGCGTACT CTCTCTTT	CTCTGCTGGATGAC GTGAGT	CGCTGGATAGCCTC CAGGCC Marcada con VIC y MGB

### A.2.5 Condiciones de la RT-qPCR

La RT-qPCR se llevó a cabo utilizando un volumen final de 15  $\mu$ L los cuales contenían 800 nM de cada primer para la subunidad 18S, 400 nM de cada primer para  $\beta$ 2M, 200 nM de la sonda marcada con FAM y BHQ2, 100nM de la sonda marcada con VIC y MGB, 1X de Taqman® Master Mix de Applied Biosystem, 1 $\mu$ L de la muestra de cDNA y agua free. El perfil térmico de reacción fue de un ciclo de 50 °C por 2 minutos, un ciclo a 95 °C por 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto, empleando el equipo 7500 de Applied Biosystem.

### A.2.6 Curvas de eficiencia para *L. braziliensis* y macrófagos diferenciados de la línea celular U-937

Una vez ajustadas las condiciones óptimas de los primers, las sondas y las muestras, se realizó una validación de la reacción para cada gen evaluado con su muestra correspondiente de cDNA blanco; para el caso de los macrófagos se realizó una extracción de ARN de macrófagos diferenciados sin infectar como se describió anteriormente y para *L. braziliensis* se realizó una extracción de ADN genómico de los cultivos de promastigotes *in vitro*, empleando el método de fenol-cloroformo. Ambas extracciones se cuantificaron de igual forma en el equipo Nanodrop 2000c para calcular su concentración y verificar que no presentaran contaminación. Este cDNA y DNA se obtuvo a partir de una concentración de células conocida que se diluyó en base 10, hasta generar de 6 a 7 puntos utilizados para hacer un análisis de amplificación, generando de esta manera una curva estándar para determinar la eficiencia y sensibilidad del ensayo. Finalmente, se realizó un ensayo de curva estándar dúplex para ambas muestras de interés.

### A.2.7 Análisis de la RT-qPCR

Para analizar los datos obtenidos en la RT-qPCR para las curvas de eficiencia, se utilizó la ecuación obtenida en la recta para cada uno de las curvas y se realizó su respectiva comparación, lo cual facilitaba el análisis preliminar de los datos obtenidos en cada experimento.

Por el contrario, para estimar el porcentaje de viabilidad de *L. braziliensis* a Glucantime convencional y liposomal, los resultados se analizaron por el método Delta – Delta CT. Este método expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores de CT de la muestra y los valores CT del control. Para emplear este método se utiliza la ecuación 8:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \left[ \frac{(Ct \text{ gen de interes} - Ct \text{ control interno (tratados)})}{(Ct \text{ gen de interes} - Ct \text{ control interno (no tratados)})} \right] \quad (8)$$

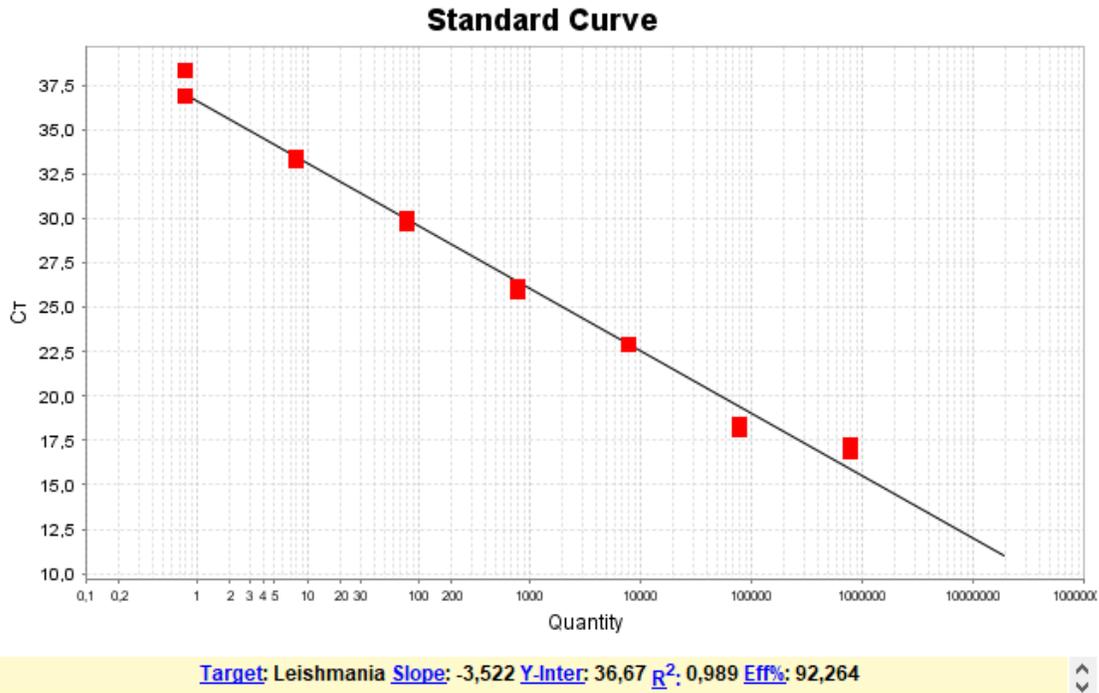
## **A.3 Resultados**

### **A.3.1 Curvas de eficiencia**

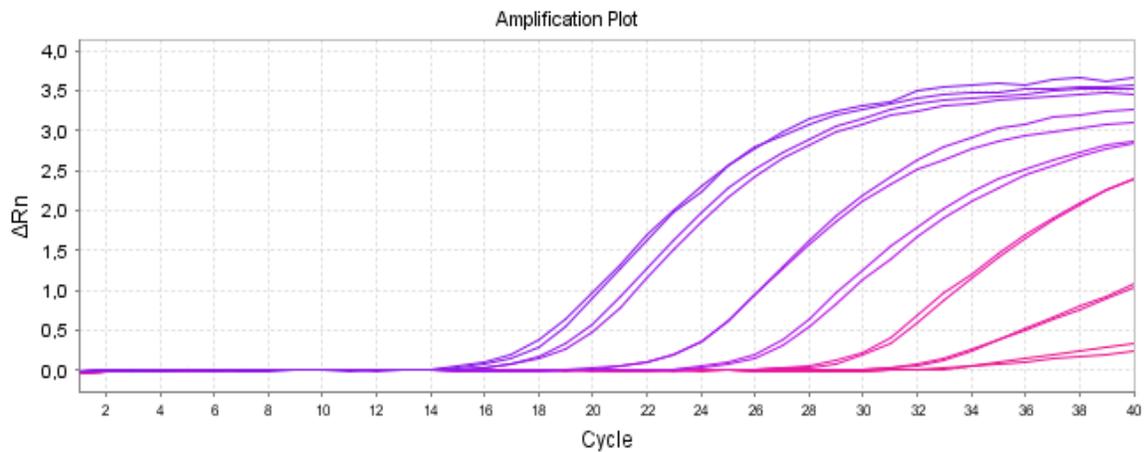
#### **A.3.1.1 Curva de eficiencia para 18S de *Leishmania braziliensis***

Se utilizó una curva que constaba de siete puntos de ADN genómico de *L. braziliensis* los cuales estaban comprendidos en un rango de  $8 \times 10^5$  parásitos hasta  $8 \times 10^{-1}$  parásitos. La dilución empleada para curva se realizó en base 10. Lo anterior permitió una eficiencia para la curva de 92,28 %, con un  $R^2$  de 0,98 y una pendiente de -3,522; esta curva muestra que en las condiciones utilizadas en la qPCR se logra una amplificación de 1,92 copias por cada ciclo. Estos resultados se pueden observar en la figura A.3-11.

A.



B.



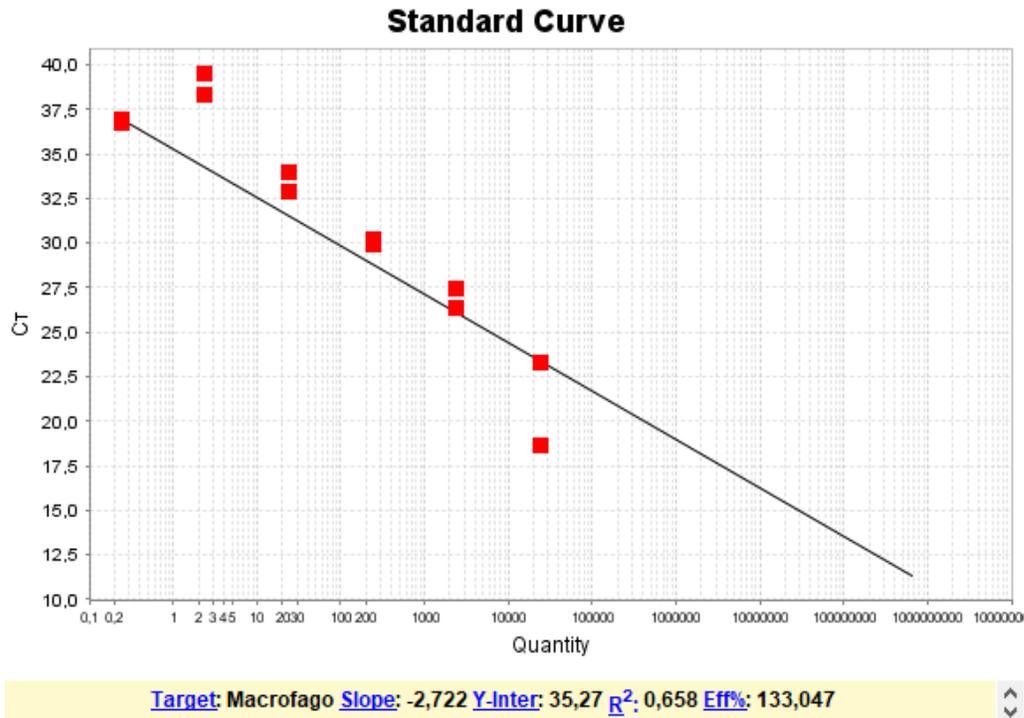
**Figura A.3-11: Curva de eficiencia de amplificación por RT-qPCR para el gen 18S de *Leishmania braziliensis*.**

**A.** Se observa una adecuada linealidad de la curva estándar para *L. braziliensis*, esto indica que la qPCR se encuentra dentro de la eficiencia esperada la cual corresponde a un rango de 90 a 110% (127). **B.** Plot de amplificación en RT-qPCR para la curva de eficiencia del gen 18S.

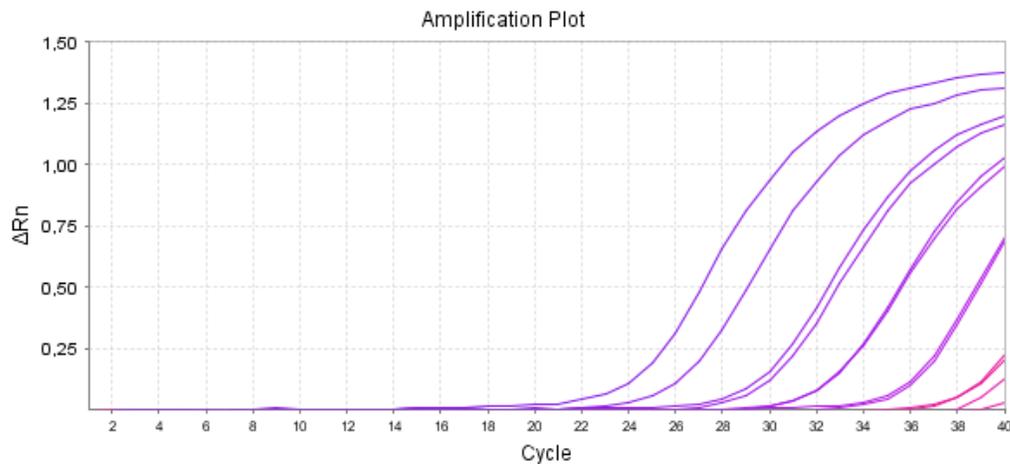
### **A.3.1.2 Curva de eficiencia para $\beta$ – 2M de macrófagos**

Se utilizó una curva que constaba de seis puntos de ADNc de macrófagos pertenecientes a la línea celular U-937 los cuales estaban comprendidos en un rango de  $2,4 \times 10^4$  células hasta  $2,4 \times 10^{-1}$  células. La dilución empleada para curva se realizó en base 10. Lo anterior permitió una eficiencia para la curva de 133,04 %, con un  $R^2$  de 0,658 y una pendiente de -2,722; esta curva muestra que en las condiciones utilizadas en la qPCR se logra una amplificación de 2,33 copias por cada ciclo. Estos resultados se pueden observar en la figura A.3-12.

A.



B.



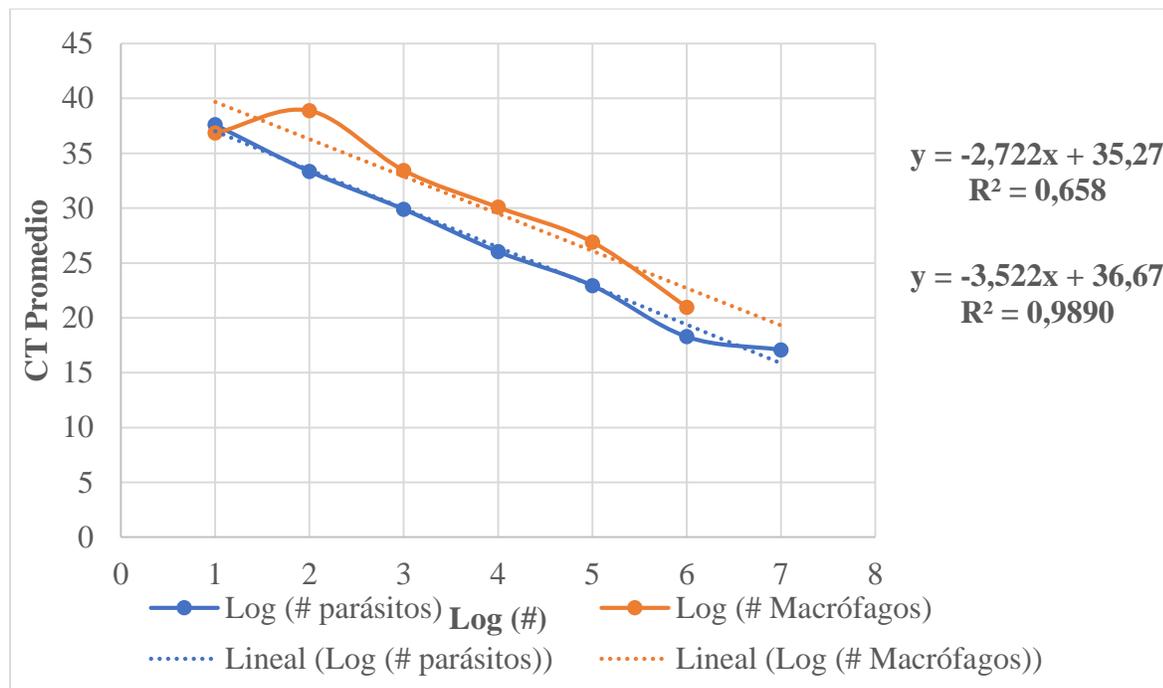
**Figura A.3-12: Curva de eficiencia de amplificación por RT-qPCR para el gen  $\beta$  – 2M de macrófagos humanos:**

**A.** Se observa que la curva no presenta una adecuada linealidad para los macrófagos de la línea celular U-937, esto indica que la qPCR se encuentra fuera de la eficiencia esperada la cual corresponde a un rango de 90 a 110 % (127). **B.** Plot de amplificación en RT-qPCR para la curva de eficiencia del gen  $\beta$  – 2M.

### **A.3.1.3 Comparación de las curvas de eficiencias de la qPCR para 18S y $\beta$ – 2M.**

Tanto la curva de parásitos, como la curva de macrófagos fueron analizadas en ensayos individuales y no de forma simultánea. Sin embargo, se realizaron dos tipos de análisis comparativo a partir de las rectas obtenidas. El primero de estos análisis consiste en realizar una comparación de las dos curvas de 18S y  $\beta$  – 2M de manera individual, donde se logra observar la diferencia que poseen en sus eficiencias, este análisis nos indica que las curvas no son comparables y por tanto no se podrían tener en cuenta para el análisis de la cuantificación de parásitos intracelulares, esto se puede apreciar en la figura A.3-13. El segundo análisis de comparación nos permite observar el comportamiento de las curvas de manera simultánea utilizando cada una de las diluciones evaluadas homogéneas que se encuentran dentro del rango de detección, donde para que sean comparables el valor de la pendiente tiene que ser  $< 0,1$ , de igual manera este análisis indica que las curvas tampoco son comparables, debido a que el valor de la pendiente obtenido es de 0,5269, esto se puede evidenciar en la figura A.3-14.

A.

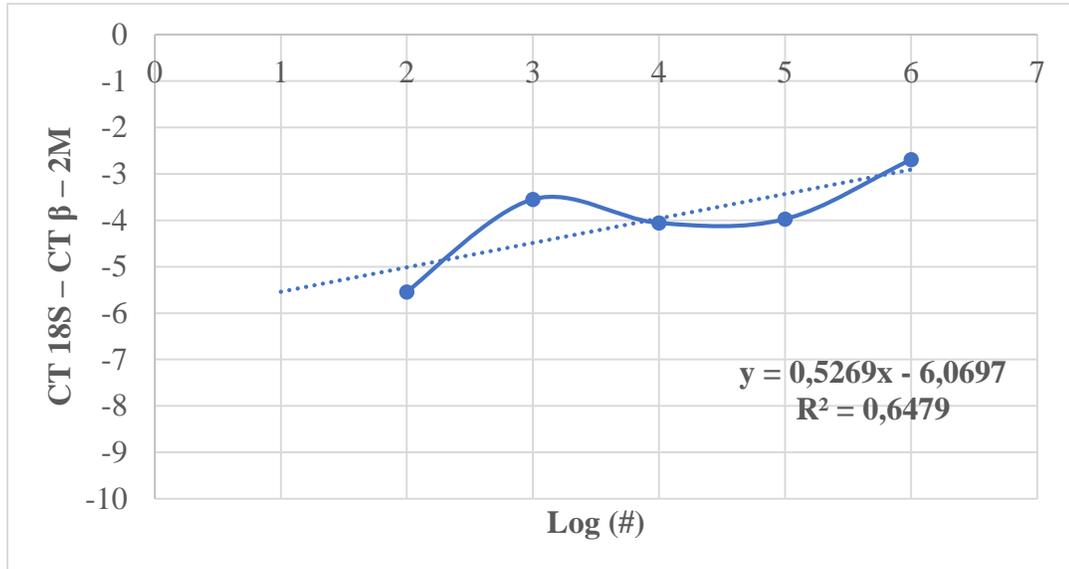


B.

	Log # Parásitos	Log # Macrófagos
<b>Pendiente</b>	-3,522	-2,722
<b>R<sup>2</sup></b>	0,989	0,658
<b>Y-intercepto</b>	36,67	35,27
<b>Eficiencia</b>	0,92	1,33
<b>% Eficiencia</b>	92,28	133,04
<b>Amplificación</b>	1,922	2,330

**Figura A.3-13:** Curvas de eficiencia de 18S para *L. braziliensis* y  $\beta - 2M$  para macrófagos

**A.** Comparación de las curvas de eficiencia de 18S para *L. braziliensis* y  $\beta - 2M$  para macrófagos. **B.** Comparación de los valores obtenidos de porcentaje de eficiencia y amplificación para las curvas de 18S y  $\beta-2M$ .

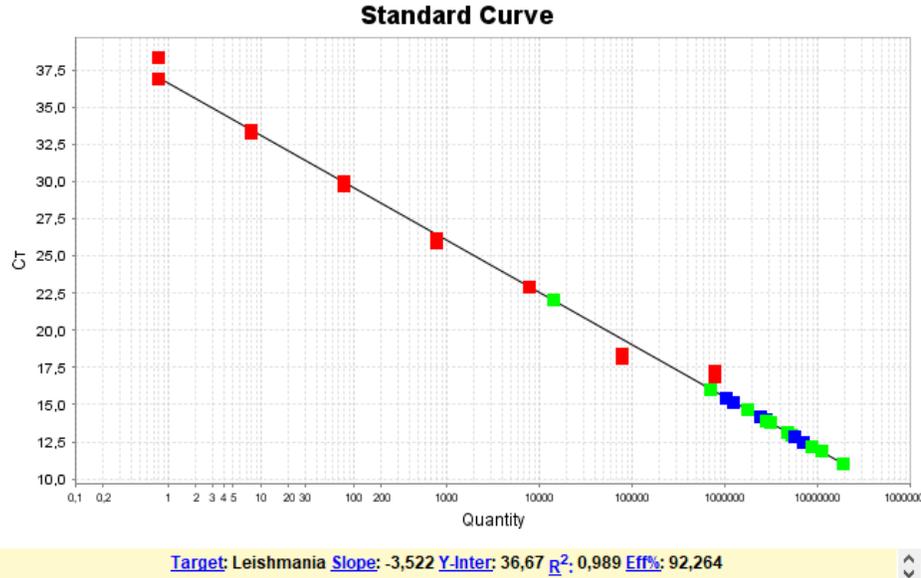


**Figura A.3-14: Comparación de las curvas de eficiencia para los genes 18S y β - 2M.**

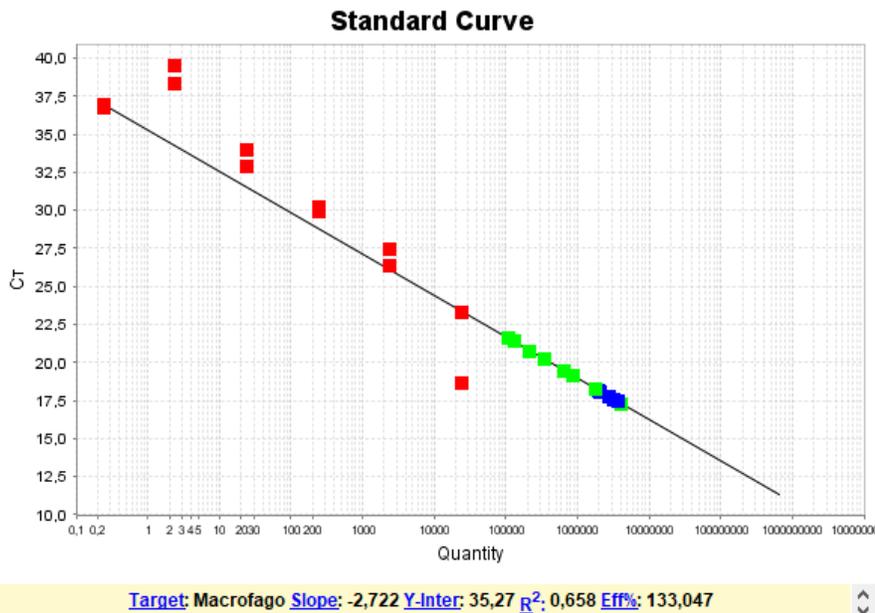
### A.3.2 Cuantificación de parásitos y macrófagos por RT-qPCR

Para poder realizar una cuantificación de los ensayos de infección, se deben realizar por cada prueba de susceptibilidad una curva estándar igual a las realizadas en la evaluación de la eficiencia de la reacción, tanto para *L. braziliensis* como para células U-937. Sin embargo, en los experimentos realizados, únicamente se montó una curva por ensayo, lo que provocó que no se lograra establecer una relación parásito-célula adecuada. Aun así, con estos resultados, se intentó extrapolar los datos obtenidos de cada una de las pruebas de susceptibilidad y ajustarlos en cada una de las curvas para calcular la cantidad de parásitos presente en cada muestra con la ecuación obtenida en la recta. Los resultados que se obtuvieron, fue que ninguna de las pruebas de susceptibilidad realizadas se podía ajustar a las curvas, debido a que los datos de CT obtenidos se encontraban por fuera del rango de linealidad de cada una de estas (Figura A.3-15), por lo cual al no poder ser ajustados en la curva no se puede determinar una cuantificación de parásitos por número de células.

A.



B.



**Figura A.3-15: Rango de linealidad de las curvas estándar del gen blanco 18S y el gen normalizador  $\beta - 2M$ .**

**A.** Curva estándar 18S para *L. braziliensis*: Se puede observar que los valores de CT obtenidos durante el ensayo de susceptibilidad utilizando Glucantime® convencional no encapsulado tanto para *L. braziliensis* como para macrófagos U-937 se encuentran por debajo del rango de la curva. **B.** Curva estándar  $\beta - 2M$  para macrófagos U-937: Se puede observar que los valores de CT obtenidos durante en ensayo de susceptibilidad para el Glucantime liposomal encapsulado tanto para *L. braziliensis* como para macrófagos U-937 se encuentran por debajo del rango de la curva.

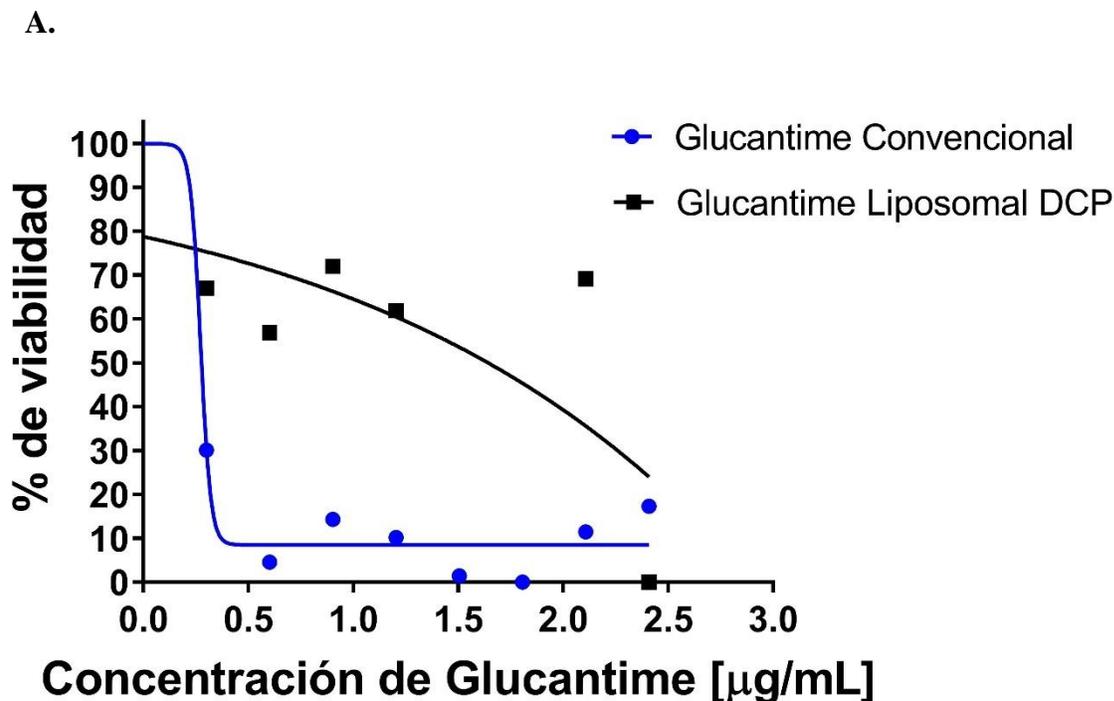
### A.3.3 Susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional no encapsulado vs Glucantime liposomal encapsulado por el método RT-qPCR

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las curvas de eficiencia, se pudo determinar que estas no son comparables, por lo tanto, no se pueden ajustar a la ecuación del método  $\Delta\Delta CT$ . Sin embargo, este método puede corregirse para trabajar en ensayos que no tengan necesariamente un 100 % de eficiencia (128), lo cual permite estimar la viabilidad de *L. braziliensis* haciendo uso de cada una de las eficiencias obtenidas en las curvas 18S y  $\beta - 2M$ . Este  $\Delta\Delta CT$  corregido se realiza siguiendo la ecuación A-9.

$$\Delta\Delta CT \text{ corregido} = \frac{E_{18S}^{(CT \text{ medio control interno (tratados)} - CT \text{ medio gen de interez})}}{E_{\beta - 2M}^{(CT \text{ medio control interno (no tratados)} - CT \text{ medio gen de interez})}} \quad (A-9)$$

Una vez determinado el valor del  $\Delta\Delta CT$  corregido para cada una de las muestras evaluadas, se estimó un porcentaje de viabilidad de *L. braziliensis* frente al tratamiento de Glucantime® convencional no encapsulado vs el Glucantime liposomal encapsulado, con el cual se determinó un valor de IC50 utilizando el programa Graph-Pad.

En la figura A.3-16 se puede evidenciar el comportamiento dosis – respuesta del porcentaje de viabilidad de los parásitos intracelulares de *L. braziliensis* en las diferentes concentraciones de las formulaciones empleadas, donde se observa que el IC50 determinado para el Glucantime convencional no encapsulado presenta un valor mayor o igual a 1,873  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para el Glucantime® convencional no encapsulado presenta un valor mayor o igual a 607  $\mu\text{g/mL}$ . Lo cual indica que al igual que en los resultados obtenidos por microscopía, este tipo de formulación liposomal es menos efectiva contra *L. braziliensis* en modelos *in vitro* en comparación con su fórmula libre convencional.



B.

Formulación	IC50 [µg/mL]	Rango de la concentración de Glucantime [µg/mL] (95% IC)	R <sup>2</sup>	Valor de P del efecto leishmanicida del Glucantime liposomal comparado con el Glucantime convencional
Glucantime convencional	1,87	Indeterminado	0,9659	< 0,0001
Glucantime liposomal DCP	≥ 607	Indeterminado	0,6262	

**Figura A.3-16: Susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime convencional vs Glucantime liposomal establecida por el método  $\Delta\Delta\text{CT}$  corregido.**

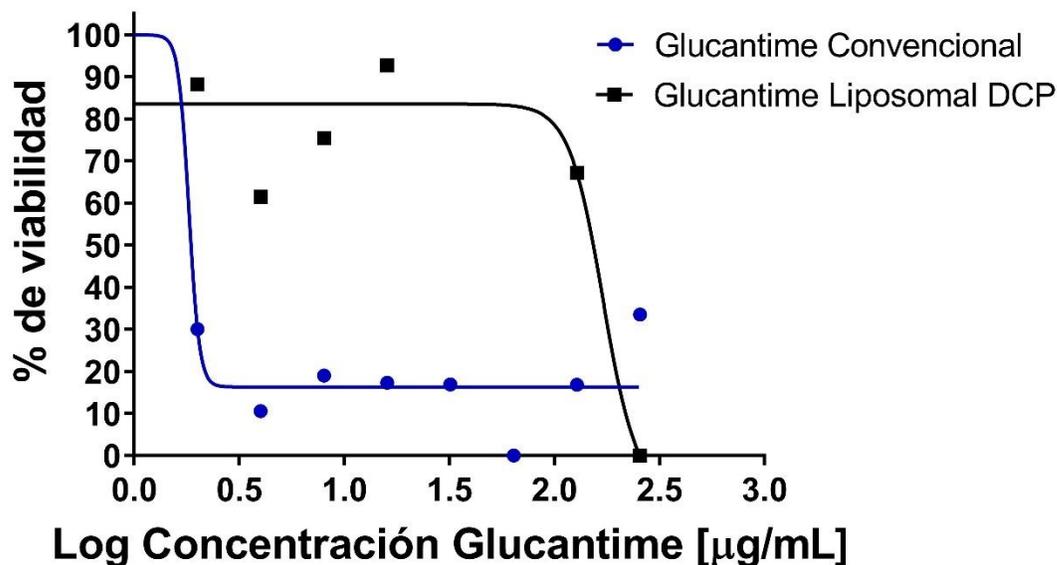
A. Se puede observar el porcentaje de viabilidad a las diferentes concentraciones de Glucantime convencional y liposomal. B. Valores de IC50, rango de la concentración de Glucantime, R<sup>2</sup> y valor de significancia obtenidos para las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado en los ensayos de susceptibilidad por RT-qPCR.

Con el fin de estimar un mejor resultado para evaluar la susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime® convencional no encapsulado vs Glucantime liposomal encapsulado, se asumió que las curvas de eficiencia fuesen comparativas para poder realizar el análisis por el método  $\Delta\Delta CT$ , el cual se calcula como se menciona en la ecuación 8.

Una vez determinado el valor del  $\Delta\Delta CT$  para cada una de las muestras evaluadas, se estimó un porcentaje de viabilidad de *L. braziliensis* frente al tratamiento de Glucantime® convencional no encapsulado vs el Glucantime liposomal encapsulado, con el cual se determinó un valor de IC50 utilizando el programa Graph-Pad.

En la figura A.3-17 se puede evidenciar el comportamiento dosis - respuesta del porcentaje de viabilidad de los parásitos intracelulares de *L. braziliensis* en las diferentes concentraciones de las formulaciones empleadas, donde se observa que el IC50 determinado para el Glucantime convencional no encapsulado presenta un valor mayor o igual a 1,82  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para el Glucantime® convencional no encapsulado presenta un valor mayor o igual a 170  $\mu\text{g/mL}$ . Lo cual indica que al igual que en los resultados obtenidos por microscopía, este tipo de formulación liposomal es menos efectiva contra *L. braziliensis* en modelos *in vitro* en comparación con su fórmula libre convencional.

A.



B.

Formulación	IC50 [µg/mL]	Rango de la concentración de Glucantime [µg/mL] (95% IC)	R <sup>2</sup>	Valor de P del efecto leishmanicida del Glucantime liposomal comparado con el Glucantime convencional
Glucantime convencional	1,82	Indeterminado	0,9102	< 0,0001
Glucantime liposomal DCP	≥ 170	Indeterminado	0,8625	

**Figura A.3-17: Susceptibilidad de *L. braziliensis* a Glucantime convencional vs Glucantime liposomal establecida por el método  $\Delta\Delta\text{CT}$ .**

**A.** Se puede observar el porcentaje de viabilidad a las diferentes concentraciones de Glucantime convencional y liposomal. **B.** Valores de IC50, rango de la concentración de Glucantime, R<sup>2</sup> y valor de significancia obtenidos para las formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado en los ensayos de susceptibilidad por RT-qPCR.

Tanto en el método  $\Delta\Delta\text{CT}$  corregido, como en el estimado se puede observar que la comparación de las curvas de dosis respuesta de los ensayos de susceptibilidad entre las dos formulaciones de Glucantime encapsulado y no encapsulado sobre los macrófagos infectados con *L. braziliensis*, se evidencia que en la formulación de Glucantime® convencional no encapsulado presenta una reducción más temprana de la viabilidad de los parásitos empleando menos concentración del medicamento, en comparación con la formulación del Glucantime liposomal encapsulado, el cual muestra una reducción de la viabilidad de los parásitos a mayor concentración del medicamento. En los dos tipos de análisis realizados, se logra observar que las curvas para el Glucantime liposomal encapsulado presentan valores de IC50 los cuales son estimados por el programa, esto debido a que el modelo evaluado no se ajusta con el comportamiento de los datos, lo cual provoca que no se observen efectos visibles. Ambos análisis utilizados para los valores obtenidos por la RT-qPCR, presentaron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) del efecto leishmanicida del Glucantime liposomal encapsulado comparado con el efecto leishmanicida del Glucantime convencional no encapsulado.

En conclusión, la susceptibilidad determinada por el método de qRT-PCR presenta un comportamiento igual a la susceptibilidad determinada por microscopía, debido a que, la formulación de Glucantime liposomal encapsulado resulta ser menos susceptible a *L. braziliensis* en comparación con el Glucantime® convencional encapsulado, el cual resulta ser 100 veces más efectiva para el tratamiento de *L. braziliensis* en modelos *in vitro*.



## Bibliografía

1. World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Rougeron V, De Meesus T, Hide M, Waleckx E, Bermudez H, Arevalo J, et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. PNAS. 2009;106(25):10224–9.
3. Montalvo A, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, et al. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp 70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. Parasitol Res. 2017;116(7):1843–8.
4. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo C, Carvalho L, Almeida R, et al. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. Clin Infect Dis. 2002;34(11):54–8.
5. Perez J, Cruz M, Robayo M, Lopez M, Daza C, Bedoya A, et al. Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(5):1–13.
6. Panamerican Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas [Internet]. PAHO/WHO. 2019. p. 2–8. Available from: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/Leishreport2019\\_eng.pdf?sequence=9&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/Leishreport2019_eng.pdf?sequence=9&isAllowed=y)
7. Zambrano P, de la Hoz F, Martínez M, Pacheco O, Quijada H, Mercado M. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública - Leishmaniasis [Internet]. Instituto Nacional de Salud. 2013. p. 3–10. Available from: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos SIVIGILA/PRO Leishmaniasis.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Leishmaniasis.pdf)
8. Ministerio de la Protección Social. Guía de atención de la leishmaniasis [Internet]. Instituto Nacional de Salud. 2011. p. 553–80. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2011/myl11111-12d.pdf>
9. Instituto Nacional de Salud. Leishmaniasis Colombia Semestre I de 2018 [Internet]. MINSALUD. Colombia; 2018. p. 6–10. Disponible en: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS SEMESTRE I 2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS%20SEMESTRE%20I%202018.pdf)
10. Papadopoulou B, Kundig C, Singh A, Ouellette M. Drug resistance in *Leishmania*:

- similarities and differences to other organisms. *Drug Resist Updat.* 1998;1(4):266–78.
11. Henao H, Osorio Y, Saravia N, Gómez A, Travi B. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes ( Glucantime ® y Pentostam ® ) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomedica.* 2004;24(4):393–402.
  12. Frézard F, Demicheli C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(12):1343–58.
  13. Cruz M, Ovalle C, Ortegón V, Pérez J, Echeverry MC. Improving Leishmania Species Identification in Different Types of Samples from Cutaneous Lesions. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1339–41.
  14. Llanos A, Tulliano G, Araujo R, Miranda C, Santamaria G, Ramirez L, et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):223–31.
  15. Schettini D, Ribeiro R, Demicheli C, Rocha O, Melo M, Michalick M, et al. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm.* 2006;315(1–2):140–7.
  16. Voak A, Harris A, Qaiser Z, Croft S, Seifert K. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with single-dose liposomal amphotericin B-pharmacodynamics and biodistribution at different stages of disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):1–13.
  17. Treiger S, Schwendener R, Osso J, Franco de Andrade H, Do Nascimento N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in Leishmania (Leishmania) major-infected macrophages. *Int J Antimicrobial Agents.* 2011;38(4):341–7.
  18. Castro R, Silva N, Licio C, Souza J, Souza M, Ferreira F, et al. Association of Liposome-Encapsulated Trivalent Antimonial with Ascorbic Acid: An Effective and Safe Strategy in the Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS One.* 2014;9(8):1–9.
  19. Frézard F, Demicheli C, Da Silva S, Azevedo E, Ribeiro R. Nanostructures for Improved Antimonial Therapy of Leishmaniasis. In: *Nano and Microscale Drug Delivery Systems.* 2017. p. 419–37.
  20. Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis : new insights from an old and neglected disease. *Eur Soc Clin Microbiol.* 2012;31(2):109–18.
  21. Harhay M, Olliaro P, Costa D, Nery C. Urban parasitology : visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011;27(9):403–9.
  22. González U, Pinart M, Macaya A, Alvar J, Ja T. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). *Cochrane database Syst Rev.* 2009;(2):7–20.

23. Conceiç J, Davis R, Carneiro P, Giudice A, Muniz A, Wilson M, et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):1–19.
24. Bailey F, Mondragon K, Hotez P, Ruiz J, Al-Salem W, Acosta Á, et al. A new perspective on cutaneous leishmaniasis — Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8):2–6.
25. Guimarães L, Queiroz A, Silva J, Silva S, Magalhães V, Lago E, et al. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis* : Clinical , Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):1–14.
26. Ovalle C, Franco C, Londoño D, Restrepo D, Clavijo C. Changes in Macrophage Gene Expression Associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *PLoS One*. 2015;10(6):1–13.
27. Gomes R, Cavalcanti K, Teixeira C, Carvalho A, Miranda C, De C, et al. Immunity to *Lutzomyia whitmani* Saliva Protects against Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(11):1–15.
28. Ovalle C, Porras L, Rey M, Rios M, Camargo Y. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomedica*. 2006;26(1):145–51.
29. Ramírez J, Hernández C, León C, Ayala M, Flórez C, González C. Taxonomy , diversity , temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia : A retrospective study. *Nat Publ Gr*. 2016;(6):1–10.
30. Alvar J, Velez I, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):1–12.
31. Patino L, Mendez C, Rodriguez O, Romero Y, Velandia D, Duque 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.
32. Gobierno de Colombia. Boletín Clima y Salud [Internet]. Gobierno de Colombia. 2018. p. 6–10. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS SEMESTRE I 2018.pdf>
33. Kumar N, Gupta S, Dube A, Vyas S. Emerging Role of Vesicular Carriers for Therapy of Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Novel. *Ter Drug Carr Syst*. 2010;27(6):461–500.
34. Borghi S, Fattori V, Conchon I, Pinge P, Pavanelli W, Verri W. *Leishmania* infection : painful or painless ? *Parasitol Res*. 2016;116(12):465–75.
35. Center Disease Control and Prevention. Leishmaniasis - Biology [Internet]. CDC. 2019. p. 2. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
36. Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunol*.

- 2014;3(3):1–6.
37. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. *Nat Publ Gr.* 2011;9(8):604–15.
  38. Muskus C, Marín M. Metaciclologénesis : un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomedica.* 2002;22(2):167–77.
  39. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Leishmaniasis [Internet]. CDC. 2019. p. 2–5. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
  40. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules.* 2009;14(7):2317–36.
  41. Ministerio de la Protección Social. Guía para la atención clínica integral del paciente con leishmaniasis [Internet]. Plan Nacional de Salud Pública. 2010. p. 23–36. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud Pública/Ola invernal/Clinica Leishmaniasis.pdf>
  42. Kumar A, Sen P, Roy S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis : Current Status and Future Directions. *Mol Biol Int.* 2011;2(1):1–23.
  43. Verdugo M, Ogra Y, Quiroz W. Mechanisms underlying the toxic effects of antimony species in human embryonic kidney cells (HEK-293) and their comparison with arsenic species. *J Toxicol Sci.* 2016;41(6):783–92.
  44. Tuon F, Amato V, Graf M, Siqueira M, Nicodemo A, Neto V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* 2008;47(2):109–24.
  45. Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, Lazo M, et al. Influence of *Leishmania* (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1846–51.
  46. Mookerjee J, Mookerjee A, Banerjee R, Saha M, Singh S, Naskar K, et al. Inhibition of ABC Transporters Abolishes Antimony Resistance in *Leishmania* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1080–93.
  47. Dohmen L, Navas A, Vargas D, Gregory D, Kip A, Dorlo T, et al. Functional Validation of ABCA3 as a Miltefosine Transporter in Human Macrophages. *J Biol Chem.* 2016;291(18):9638–47.
  48. Wyllie S, Fairlamb A. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(3):257–67.
  49. Leroux A, Krauth L. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. Elsevier BV. 2015;206(1–2):67–74.
  50. Wyllie S, Vickers T, Fairlamb A. Roles of Trypanothione S -Transferase and Tryparedoxin Peroxidase in Resistance to Antimonials. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2008;52(4):1359–65.
51. Frézard F, Demicheli C, Kato K, Reis P, Lizarazo E. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. *Rev Inorg Chem.* 2013;33(1):1–12.
  52. Bangham A. Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol.* 1968;18:29–95.
  53. Schaeffer H, Krohn D. Liposomes in topical drug delivery. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22(2):220–7.
  54. Stano P, Bufali S, Pisano C, Bucci F, Barbarino M, Carminati P, et al. Novel Camptothecin Analogue (Gimatecan)-Containing Liposomes Prepared by the Ethanol Injection Method. *J Liposome Res.* 2004;14(1–2):87–109.
  55. Johnston M, Semple S, Klimuk S, Ansell S, Maurer N, Cullis P. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(5):1121–7.
  56. Atrooz O. Effects of Alkylresorcinolic Lipids Obtained from Acetonic Extract of Jordanian Wheat Grains on Liposome Properties. *Int J Biol Chem.* 2011;5(5):314–21.
  57. Shehata T, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 2008;359(1–2):272–9.
  58. Anwekar H, Patel S, Singhai A. Liposome as drug carriers. *Int J Pharm Life Sci.* 2011;2(7):945–51.
  59. Hofheinz R, Gnad S, Beyer U, Hochhaus A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs.* 2005;16(7):691–707.
  60. Hermanth M, Spandana V. Liposomal encapsulation technology a novel drug delivery system designed for Ayurvedic drug preparation. *J Pharm Sci.* 2011;2(10):4–6.
  61. Immordino M, Dosio F, Cattell L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):297–315.
  62. Akbarzadeh A, Rezaei R, Davaran S, Woo S, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):1–9.
  63. Banerjee R, Tyagi P, Li S, Huang L. Anisamide-targeted stealth liposomes: A potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2004;112(4):693–700.
  64. Mehta K, Sadeghi T, McQueen T, Lopez G. Liposome encapsulation circumvents the hepatic clearance mechanisms of all-Trans-Retinoic Acid. *Pergamon Lukemia Res.*

- 1994;18(8):587–96.
65. Gill P, Espina B, Muggia F, Cabriaes S, Tulpule A, Esplin J, et al. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J Clin Oncol.* 1995;13(4):996–1003.
  66. Kunisawa J, Masuda T, Katayama K, Yoshikawa T, Tsutsumi Y, Akashi M, et al. Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J Control Release.* 2005;105(3):344–53.
  67. Shaheen S, Shakil F, Hossen N, Ahmed M, Amran S, Islam A. Liposome as a Carrier for Advanced Drug Delivery. *Pakistan J Biol Sci.* 2006;9(6):1181–91.
  68. Chance M, Thomas S, Peters W. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature.* 1978;272(5648):55–6.
  69. Black C, Watson G. The use of Pentostam Liposomes in the chemotherapy experimental leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(6):550.
  70. Alving C. Liposomes as Drug Carriers in Leishmaniasis and Malaria. *Parasitol Today.* 1986;2(4):536–8.
  71. Frézard F, Michalick M, Soares C, Demicheli C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *J Med Biol Res.* 2000;33(7):841–6.
  72. Azevedo E, Ribeiro R, Ferreira S, Magno S, Schettini D. Prolonged Blood Circulation Time of Antimony in Dogs with Visceral Leishmaniasis from Liposomes with 175-nm Diameter. *J Nanomedicine Biotherapeutic Discov.* 2011;1(2):2–6.
  73. Harris J, Chess R. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature.* 2003;2(3):214–21.
  74. Azevedo E, Riveiro R, da Silva S, Ferreira C, de Souza L, Ferreira A, et al. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11(10):1–10.
  75. Soares L, Fortes de Brito R, de Oliveira J, Siqueira F, Oliveira R, Martins C, et al. Mixed formulation of conventional and pegylated meglumine antimoniate-containing liposomes reduces inflammatory process and parasite burden in *L. infantum* infected BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):1–13.
  76. Black C, Watson G, Ward R. The use of pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(6):550–2.
  77. Rao L, Hardy J, Wilson C. Tissue distribution and fate of free and liposome-encapsulated [<sup>125</sup>Sb]sodium stibogluconate by gamma scintigraphy. *Int J Pharm.* 1983;17(2–3):283–90.
  78. Baillie A, Coombs G, Dolan T, Laurie J. Non-ionic surfactant vesicles, niosomes, as a delivery system for the anti-leishmanial drug, sodium stibogluconate. *J Pharm Pharmacol.* 1986;38(7):502–5.

79. Nieto J, Alvar J, Mullen A, Carter K, Rodríguez C, San Andrés M, et al. Pharmacokinetic, toxicities and efficacies of sodium stiboglyconate formulation after Intravenous administration in animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2781–7.
80. de Souza L. Mistura de lipossomas convencionais e furtivos: estudos farmacocinéticos em camundongos e otimizacao do processo de encapsulacao do antimoniato de meglumina. Universidad Federal de Minas Gerais; 2013.
81. Frezard F, Monte R, Gomes P. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites Antimony. *Biophys Rev.* 2014;6(1):119–32.
82. Baille A, Florence A, Hume L, Muirhead G, Rogerson A. The preparation and properties of niosomes—non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol.* 1985;37(12):863–8.
83. Barry B. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14(2):101–14.
84. Hu C, Rhodes D. Proniosomes : A Novel Drug Carrier System. *Int J Pharm.* 1999;185(1):23–35.
85. Kumar A, Raju V, Sundar S, Kumar A, Dube A. Identification of genetic markers in Sodium Antimony Gluconate (SAG) sensitive and resistant Indian clinical isolates of *Leishmania donovani* through amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Acta Trop.* 2009;110(1):80–5.
86. Alves da Costa T, Jimenez A, Lauletta J, Barbosa L, Tempone A. Nanoliposomal Buparvaquone Immunomodulates *Leishmania (L.) infantum* infected Macrophages and is Highly Effective in Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4):1–15.
87. Vyas S, Gupta S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(4):417–32.
88. Fontoura R, Ferreira I, Miranda A, de Souza J, Paschoal O, de Oliveira D, et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA – DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp Parasitol.* 2013;135(2):217–22.
89. Kumara R, Sahoo G, Pandeya K, Dasa V, Ansaria Y, Rana S, et al. PLGA-PEG Encapsulated sitamaquine nanoparticles drug delivery system against *Leishmania donovani*. *J Sci Innov Res.* 2014;3(1):85–90.
90. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today.* 2011;16(7–8):354–60.
91. Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Trop.* 2017;172(1):86–90.
92. Qasim M, Lim D-J, Park H, Na D. Nanotechnology for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(10):7374–87.

93. das Neves J, Amiji M, Bahia M, Sarmiento B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(4–5):458–77.
94. Merisko E, Liversidge G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):43–8.
95. Laquintana V, Denora N, Lopalco A, Lopedota A, Cutrignelli A, Lasorsa F, et al. Translocator Protein Ligand–PLGA Conjugated Nanoparticles for 5-fluorouracil Delivery to Glioma Cancer Cells. *Mol Pharm.* 2014;11(3):859–71.
96. Zhang L, Pornpattananankul D, Hu C, Huang C. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Curr Med Chem.* 2010;17(6):585–94.
97. Chiang C, Hu S, Liao B, Chang Y, Chen S. Enhancement of cancer therapy efficacy by trastuzumab-conjugated and pH-sensitive nanocapsules with the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2014;10(1):99–107.
98. Perez J, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward TRanslocation of the Drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2397–403.
99. Pérez J, Sánchez M, Seifert K, Croft S, Sundar S, Castanys S, et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat.* 2006;9(1–2):26–39.
100. Want M, Yadav P, Afrin F. Nanomedicines for Therapy of Visceral Leishmaniasis. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016;16(3):2143–51.
101. ThermoFisher Scientific. alamarBlue® Cell Viability Assay Protocol [Internet]. Protocols. 2017. p. 2. Available from: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-profiliteration-assay-protocols/cell-viability-with-alarblue.html>
102. Romero I, Téllez J, Suárez Y, Cardona M, Figueroa R, Zelazny A, et al. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(9):1–5.
103. Tellez J, Romero I, Soares M, Steindel M, Romanha A. Knockdown of host antioxidant defense genes enhances the effect of Glucantime on intracellular *Leishmania braziliensis* in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):1–16.
104. Romero I, Téllez J, Romanha A, Steindel M, Grisard E. Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4770–81.
105. Loiseau P, Gupta S, Verma A, Srivastava S, Puri S, Sliman F, et al. In Vitro Activities of New 2-Substituted Quinolines against *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1777–80.
106. Pritchett J, Naesens L, Montoya J. Treating HHV-6 Infections. In: *Human*

- Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B. 2014. p. 311–32.
107. Romero I, Saravia N, Walker J. Selective Action of Fluoroquinolones Against Intracellular Amastigotes of *Leishmania (Viannia) Panamensis* in Vitro. *J Parasitol.* 2005;91(6):1474–9.
  108. Junaid M, Ud Din F, Majid G. Sodium stibogluconate loaded nano-deformable liposomes for topical treatment of leishmaniasis : macrophage as a target cell. *Drug Deliv.* 2018;25(1):1595–606.
  109. Obonaga R, Fernández O, Rubiano L, Castro M, Barrera M, Gomez M, et al. Treatment Failure and Miltefosine Susceptibility in Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* Subgenus *Viannia* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):144–52.
  110. Carvalho S, Frézard F, Pereira N, Moura A, Ramos L, Carvalho G, et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. *Trop Med Int Heal.* 2019;24(4):1–26.
  111. Ferreira F, Castro R, Batista M, Rossi F, Silveira D, Frézard F, et al. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2014;113(2):533–43.
  112. van Meer G, Voelker D, Feigenson G. Membrane lipids : where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;9(2):112–24.
  113. Schettini D, Costa Val A, Souza L, Demicheli C, Rocha O, Melo M, et al. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(2):269–72.
  114. Schettini D, Costa Val A, Souza L, Demicheli C, Rocha O, Melo M, et al. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(12):1879–83.
  115. Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel V, Sampaio W, Silva S, Schettini D, et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2564–72.
  116. Momeni A, Rasoolian M, Momeni A, Navaei A, Emami S, Shaker Z, et al. Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Liposome Res.* 2013;23(2):134–44.
  117. Roberts W, Berman J, Rainey P. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1234–9.
  118. Treiger S, Osso J, Franco de Andrade H, Do Nascimento N. Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine liposomes: physicochemical evaluation and

- antileishmanial activity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(2):196–203.
119. van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Coelho L, Faber W, Peekel I, et al. Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification , Real-Time Reverse Transcriptase PCR , and Real-Time PCR for Quantification of Leishmania Parasites. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):73–8.
  120. Monteiro N, Martins A, Reis R, Neves N. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface.* 2014;11(1):1–24.
  121. Drummond D, Meyer O, Hong K, Kirpotin D, Papahadjopoulos D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Am Soc Pharmacol Exp Ther.* 1999;51(4):691–743.
  122. de Oliveira J, Santana J, de Aguiar L, das Gracas M, Gomes M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João , Manaus , Amazonas , Brasil Epidemiology of tegumentary leishmaniasis. *Salud Pública, Rio Janeiro.* 2006;22(11):2319–27.
  123. van der Meide W, Schoone G, Faber W, Zeegelarr J, de Vries H, Ozbel Y, et al. Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay as a New Molecular Tool for Detection and Quantification of Leishmania Parasites in Skin Biopsy Samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5560–6.
  124. Gomes L, Gonzaga F, de Moraes E, Souza B, Freire V, Rabello A. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. *Exp Parasitol.* 2012;131(2):175–9.
  125. Jara M, Aduai V, Valencia B, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Leishmania (Viannia) Organisms in Skin and Mucosal Lesions : Exploratory Study. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1826–33.
  126. van den Bogaart E, Schoone G, Adams E, Schallig H. Duplex quantitative Reverse-Transcriptase PCR for simultaneous assessment of drug activity against Leishmania intracellular amastigotes and their host cells. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014;4(1):14–9.
  127. Qiagen. Critical Factors for Successful Real-Time PCR [Internet]. Sample & Assay Technologies. 2010. p. 15–24. Disponible en: <https://www.gene-quantification.de/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf>
  128. ThermoFisher Scientific. Efficiency of Real - Time PCR [Internet]. Real -Time PCR. 2019. p. 5. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html>