UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la susceptibilidad a la anfotericina B de parásitos de *Leishmania spp* expuestos previamente a miltefosina

Marcela Castaño Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública

Ciudad, Colombia

2020

Evaluación de la susceptibilidad a la anfotericina B de parásitos de *Leishmania spp* expuestos previamente a miltefosina

Marcela Castaño Rodríguez

Tesis presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en infecciones y salud en el trópico

Director (a):

MD-Ph.D., Maria Clara Echeverry G.

Codirector (a):

Ph.D., Clemencia Elena Ovalle B.

Línea de Investigación:

Línea de investigación en Leishmaniasis

Grupo de Parasitología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública

Bogota, D. C. Colombia

2020

One, remember to look up at the stars and not down at your feet.
Two, never give up work. Work gives you meaning, and purpose and life is empty without it.
Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don't throw it away.

Stephen Hawking

...A Rosa Tulia Fonseca

Agradecimientos

Dra María Clara Echeverry G, por su invaluable compañía, confianza y apoyo durante la ejecución del presente proyecto.

Dra Clemencia Ovalle B, por la codirección del presente trabajo.

Dr. Jair Alexander Tellez M, por su compañía y apoyo durante la ejecución de este proyecto.

Alejandro Contreras y Catherin Aguilar B.SC., por su amabilidad, generosidad y apoyo en el desarrollo este trabajo.

Dra Carolina Ortiz, Samanda Aponte M. Sc, Marcela Parra M. Sc. por el soporte técnico, la amistad y cariño.

Dra Zulma Alvarado, Andrés Gonzales y Carlos Franco M. Sc por la compañía y el soporte profesional brindado.

Mi familia, a Juan Sebastián Sánchez Ferro, Andrés Álvarez Sánchez, Yuliana Castañeda, Diana Milkes, Angela Pineda. por su compañía, cariño y apoyo incondicional.

Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Hospital Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, especialmente a la Dra. Claudia Colorado y al grupo de investigación en dermatología tropical.

Laboratorio de equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Resumen

Dentro de los fármacos usados como segunda línea de tratamiento para la leishmaniasis están la anfotericina B y la miltefosina. Los dos medicamentos interfieren con la composición de lípidos en la membrana parasitaria y existe evidencia tanto *in vitro* como en aislamientos clínicos de resistencia cruzada entre estos medicamentos en especies pertenecientes al subgénero *Leishmania Leishmania* spp. En Suramérica las especies predominantes pertenecen al subgénero *Leishmania Viannia* spp. El presente estudio evaluó la ocurrencia de disminución de susceptibilidad a anfotericina B *in vitro* en parásitos de *Leishmania Viannia spp* con previa exposición a miltefosina. Los parásitos evaluados correspondían a clones inducidos resistentes y a aislamientos de pacientes tratados con miltefosina. El establecimiento de dosis efectivas 50 (EC50) se hizo por el método de rezarsurina, la cuantificación de mRNA de genes involucrados en la biosíntesis y transporte de lípidos se realizó por RT-qPCR. En los parásitos con inducción experimental de resistencia a miltefosina se observó concomitantemente el aumento en la tolerancia a anfotericina B; acompañado por una disminución en la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de esterol, esterol metil transferasa y latosterol oxidasa; de una proteína de unión endosoma-lisosoma vamp y del transportador de miltefosina. El limitado número de aislamientos clínicos no presentó una correlación entre los valores EC50 calculados para los dos fármacos. Lo anterior permite concluir que es posible generar resistencia cruzada entre miltefosina y anfotericina b en parásitos del subgénero *Leishmania Viannia* y se requiere estudios con mayor número de aislamientos.

Palabras clave: miltefosina, anfotericina B, resistencia cruzada, *Leishmania braziliensis*.

Abstract

Among the second-line drugs used to treat Leishmaniasis are amphotericin B and miltefosine, both drugs interfere with the lipid composition of the parasite membrane, there is cross-resistance evidence *in vitro* and in clinical isolates in species of the *Leishmania* subgenus, *Leishmania leishmania spp.* In South America the predominant species belong to the subgenus *Leishmania viannia spp.* The aim of the study was to evaluate the susceptibility to amphotericin B *in vitro* in parasites of *Leishmania viannia spp* with previous exposition to miltefosine. The evaluated parasites were clones induce resistant to miltefosine and clinical isolates that have been previously expose to miltefosine in *Leishmaniasis* treatment. Resarzurin method was used to stablish the EC50, mRNA quantification of genes involve in sterol biosynthesis was done through a RT-qPCR. It was observed in induce resistant clones to miltefosine a higher tolerance to amphotericin B, accompany by a loss of expression of enzymes involved in the sterol biosynthesis, sterol methyl transferase and lathosterol oxidase, of a protein involve in membrane fusion of endosome-lysosome, vamp and miltefosina transporter. The limit number of clinical isolates did not follow the change in susceptibility observed for the induce resistant clones in both drugs. As a conclusion, is possible to induce cross-resistance between amphotericin B and miltefosina in *Leishmania viannia* parasites and a bigger sample size of clinical isolates is needed to assess cross-resistance.

Keywords: miltefosine, amphotericin B, cross-resistance, *leishmania braziliensis*

Contenido

1. Marco teórico 17
2. Antecedentes y planteamiento del problema 35
3. Objetivos 36
4. Metodología 37
5. Resultados 44
6. Discusión 68
7. Conclusiones y recomendaciones 77

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Distribución geográfica de las especies pertenecientes al subgénero *Viannia* en Colombia. (10) 18
Figura 1-2: Espectro inmunológico de la Leishmaniasis cutánea y mucocutanea en humanos. Adaptado de (12) 20
Figura 1-3: Ilustración del desarrollo de las especies del Subgénero Viannia (imagen de la izquierda) y Leishmania (imagen de la derecha) en el intestino del vector. Adaptado de (20) 23
Figura 1-4: Estructura química de la anfotericina B: (I) micosamina (II) Región polar del anillo macrolido (III) Cadena polienica constituida por 7 conjugados (C=C).. Adaptado de (32) 29
Figura 5-1: Graficas de dosis-respuesta y EC50 de D11, C2 y C10, clones de *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis*. 45
Figura 5-2: Gráfica de dosis respuesta de los monocitos de la línea U937 a miltefosina. 46
Figura 5-3: Exposición de C10, C2 y D11 de Leishmania spp a miltefosina. 47
Figura 5-4: Figura que ilustra el curso de la inducción de resistencia de los clones *de Leishmania (V.) braziliensis* utilizados en este trabajo. 50
Figura 5-5: Efectividad de variaciones al protocolo de descongelamiento de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis.* 52
Figura 5-6: Susceptibilidad a miltefosina de los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* en primera etapa de inducción de resistencia. 55
Figura 5-7: Susceptibilidad a miltefosina de los clones de *Leishmania braziliensis* con inducción de resistencia a miltefosina. 56
Figura 5-8: Curvas de crecimiento de clones de *Leishmania (V.) braziliensis* resistentes a miltefosina. 58
Figura 5-9: Susceptibilidad a anfotericina b de los clones de *Leishmania braziliensis* con inducción de resistencia a miltefosina. 59
Figura 5-10: Expresión de genes en todos los clones de *Leishmania braziliensis.* 61
Figura 5-11: Curvas de crecimiento de aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis.* 63

Figura 5-12: Susceptibilidad a miltefosina de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina. 64
Figura 5-13: Susceptibilidad a anfotericina b de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina. 66

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Especies del subgénero Viannia asociadas a diferentes patrones de las presentaciones clínicas de Leishmaniasis. Adaptado de (19) 19
Tabla 5-1: Dosis EC50 reportada en la literatura para cepas de referencia de Leishmania (V.) braziliensis y Leishmania (V.) panamensis 45
Tabla 5-2: Resumen de susceptibilidad a miltefosina y anfotericina B, expresión de genes y crecimiento de los clones 1-4 de Leishmania (V.) braziliensis. 62
Tabla 5-3: Resumen de susceptibilidad a miltefosina y anfotericina b de los aislamientos clínicos de Leishmania (V.) braziliensis con previa exposición a miltefosina. 67

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad frecuente en regiones tropicales y subtropicales, generada por parásitos protozoarios del género *Leishmania* transmitidos por un vector de la subfamilia Phlebotominae del género *Fhlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (1)

Existen tres formas clínicas de la enfermedad según la respuesta inmune, especie infectante y efecto tegumentario la enfermedad. La presentación predominante en Colombia es la forma cutánea con un 95% de casos reportados anualmente siendo las especies que pertenecen al subgénero *Viannia* como: *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* las relacionadas con esta forma clínica y adicionalmente *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* están relacionada con la mucocutánea (2)

El tratamiento de primera elección utilizado para la leishmaniasis son las sales de antimonio pentavalente donde el éxito del tratamiento está relacionado con la respuesta inmune del hospedero y factores intrínsecos del parasito como la susceptibilidad. En casos de falla terapéutica se utilizan medicamentos de segunda línea como la miltefosina o la anfotericina B, en la India estos dos se utilizan como tratamientos combinados (3)

La aparición de resistencia a los medicamentos de primera línea contra la leishmaniasis ya se ha registrado en diferentes trabajos (4–9) así mismo también se ha presentado resistencia tanto en campo o generada en laboratorio a la miltefosina y a la anfotericina B, y resistencia cruzada descrita en especies del subgénero *Leishmania* como: *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) donovani, L (L) mexicana* y *Leishmania (L.) infantum.*

Aunque los mecanismos de acción de los medicamentos de segunda línea como la miltefosina o la anfotericina B no están claramente definidos, se ha observado que son medicamentos que afectan los lípidos en las membranas celulares y los mecanismos de resistencia observados tanto en *Leishmania* como en otros organismos donde los medicamentos tienen acción microbicida, involucran cambios en los perfiles de lípidos.

En Colombia el esquema de tratamiento de la Leishmaniasis indica que en falla terapéutica o contraindicaciones a sales de antimonio se recomienda administrar miltefosina o anfotericina B. Sin embargo, hay reportes que sugieren que una de las especies más prevalente en el país, como es *L. (V.) braziliensis,* presenta disminución en la susceptibilidad a la Miltefosina. Adicionalmente se conoce poco sobre la susceptibilidad a la anfotericina B, de las especies del subgénero *Viannia,* que son las más prevalentes en Sur América. En los grupos de investigación del Hospital Universitario Centro Dermatológico y Universidad Nacional se han desarrollado estudios preliminares sobre la susceptibilidad *in vitro* que sugieren la circulación de parásitos de *Leishmania* con disminución en la susceptibilidad a anfotericina B. Dado lo anterior el presente estudio determinó el nivel de susceptibilidad a anfotericina B de parásitos de *Leishmania spp* con exposición previa a la miltefosina.

1. Marco teórico

1.1 Generalidades

1.1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, causada por varias especies de parásitos intracelulares obligados del género *leishmania*, los cuales se caracterizan por tener un ciclo de vida digenético en el cual el estadio presente en el vector es flagelado y se denomina promastigote. El estadio sin flagelo aparente es denominado amastigote y se localiza en el macrófago del hospedero vertebrado. La transmisión es generada por la picadura de un vector perteneciente a la familia Phlebotominae del género *Phlebotomus* (viejo mundo) o *Lutzomyia* (nuevo mundo). (10–12)

La enfermedad es endémica en diferentes lugares del mundo, frecuente en la región tropical y subtropical de África, América y Asia. Se estima que existen más de 350 millones de personas en riesgo de tener la enfermedad en más de 88 países. En las poblaciones humanas la mayoría de infecciones por *leishmania* son asintomáticas, sin embargo, cuando la infección no puede ser controlada por el sistema inmune es expresada en varias formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral, clasificación realizada de acuerdo a sus efectos tegumentarios o viscerales.(10–12)

1.1.2 Epidemiologia

En el mundo la leishmaniasis cutánea es la forma de la enfermedad con mayor prevalencia, con la mayoría de casos en Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán y Arabia Saudita, según el último reporte de la OMS.

En Colombia, el último informe del SIVIGILA del 2019 reportó 4.962 casos de leishmaniasis. (13) Por procedencia Antioquia, Nariño, Norte de Santander y Tolima son los departamentos que más registraron casos de leishmaniasis con forma cutánea, siendo 987, 570, 400, 362 casos respectivamente. Estudios de distribución de especies en el país, asocian principalmente a *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* con esta forma de la enfermedad. (14)

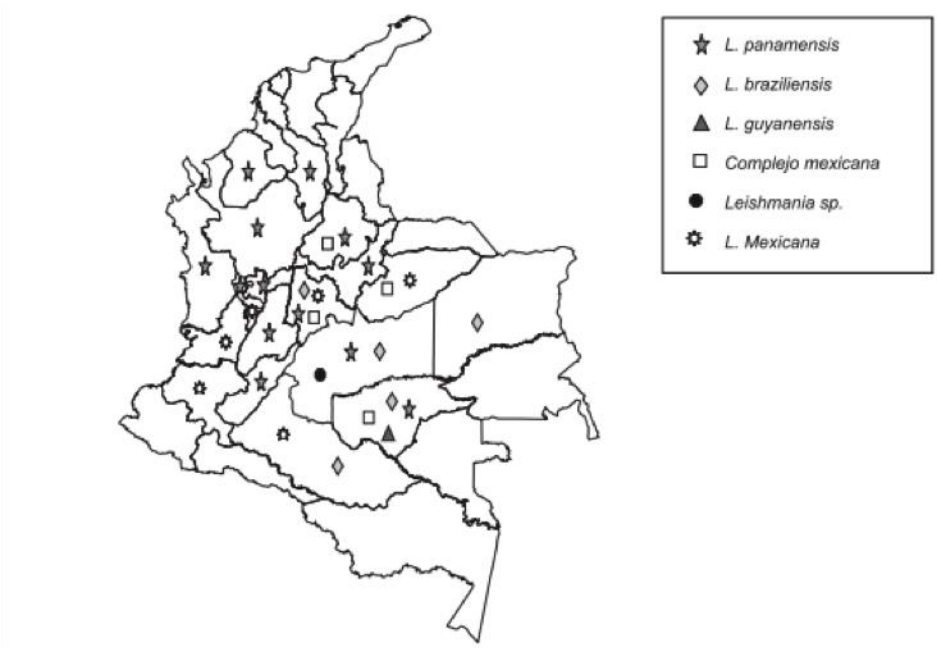


Figura 1-1: Distribución geográfica de las especies pertenecientes al subgénero *Viannia* en Colombia. (10)

En Colombia la distribución de las especies *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis y L (V.) panamensis,* (figura 1) se extiende por la mayoría del territorio, siendo la especie *L (V.) panamensis* la más frecuente con la mayor cantidad de registros distribuidos en diferentes departamentos (14).

1.1.3 Cuadros clínicos asociados a *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis y L. (V.) panamensis*

El espectro de manifestaciones clínicas de las Leishmaniasis puede variar de asintomático a letal y es resultado de la especie infectante de *Leishmania* y la respuesta inmune del hospedero. En Suramérica algunas de las especies tienen características metastásicas y un 10% de los casos de leishmaniasis cutánea progresan a la leishmaniasis mucocutánea que forma lesiones destructivas secundarias en nariz y boca. (15)

Las especies *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis y L (V.) panamensis* pertenecientes al subgénero *Viannia*, están principalmente asociadas a diferentes patrones de la presentación cutánea y adicionalmente *L. (V.) braziliensis* y *L (V.) panamensis* a la presentación mucocutánea de la enfermedad. (Tabla 1)

Patrón de la enfermedad	Especie	Características clínicas
Leishmaniasis cutánea localizada	*L. braziliensis* *L. panamensis* *L. guyanensis*	-Nódulos o ulceras múltiples o únicas. - Puede estar asociado a linfadenopatias/linfadenitis. - Puede propagarse a otras partes de la piel o mucosa. - Lesiones similares a especies del viejo mundo L. infantum
Leishmaniasis mucocutánea	*L. braziliensis* *L. panamensis*	- Metástasis linfática/hematógena a la mucosa de la cavidad oral y el tracto respiratorio alto. - Puede reaparecer meses o años después de curarse las lesiones. - Visto con otras especies en inmunocompromiso
Leishmaniasis cutánea difusa	*L. braziliensis* *L. panamensis* *L. guyanensis*	- Múltiples nódulos o ulceras cutáneas (más de 20 a cientos) con posible compromiso de la mucosa - Puede ser resistente al tratamiento con antimonio - Lesiones múltiples o crónicas recurrentes

Tabla 1-1: Especies del subgénero Viannia asociadas a diferentes patrones de las presentaciones clínicas de Leishmaniasis. Adaptado de (19)

Las diferentes presentaciones clínicas asociadas a la leishmaniasis están en gran parte moduladas por la respuesta inmune del hospedero. En los pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea se observa un espectro inmunológico (16) particular que varía de una intensa respuesta células por parte de las células T, caracterizada por una hipersensibilidad de tipo retardado es decir una respuesta de tipo celular y altos niveles de interferón-γ, a individuos sin respuesta hipersensible, con altos niveles de anticuerpos.

Dado que las especies de *Leishmania* son eliminadas de forma efectiva por macrófagos activados por IFNγ y no son neutralizados por los anticuerpos, los pacientes con una fuerte respuesta celular tienen pocos parásitos en las lesiones, mientras que en los que predomina una respuesta humoral no pueden controlar la carga parasitaria. Adicionalmente en pacientes sin respuesta de células T es observada una forma severa de la enfermedad denominada leishmaniasis cutánea difusa, mientras que en el extremo opuesto de la respuesta inmune una respuesta celular exacerbada desarrolla una leishmaniasis mucosa. (16)

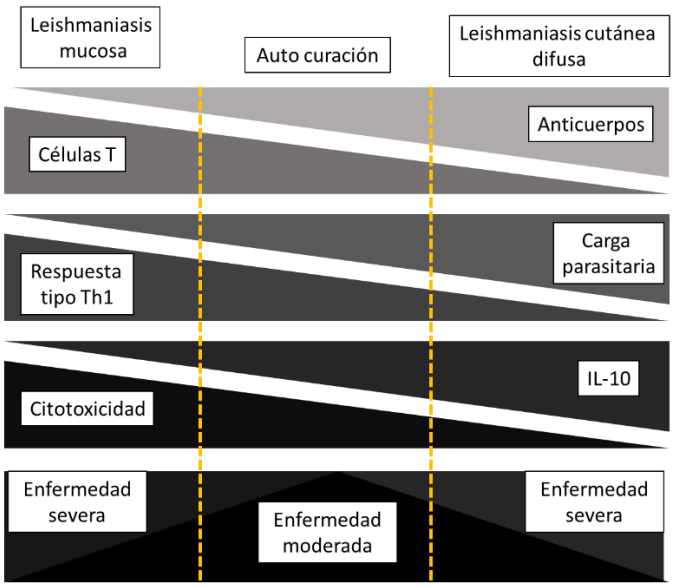


Figura 1-2: Espectro inmunológico de la Leishmaniasis cutánea y mucocutanea en humanos. Adaptado de (12)

La leishmaniasis mucosa (16,17) está caracterizada por un tipo de respuesta inmune hiper-inflamatoria destructiva, causado por numerosas células inmunes activas dentro de estas la inducción de células Th1 que liberan citoquinas como IL-2 TNF e IFNγ (figura 1-2), que están relacionadas con la activación de macrófagos y formas severas de la enfermedad. El IFNγ induce la diferenciación de células T citotóxicas CD8+, activa macrófagos y estimula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS o NOS2) y la producción de

óxido nítrico que es el principal agente microbicida que permite destruir parásitos intracelulares como *Leishmania.*

Sin embargo, la respuesta de tipo Th1 no es contrarrestada por el sistema inmune en términos de magnitud y duración, y se observa una inflamación incontrolada que lleva a una citotoxicidad y daño en el tejido mediado por la respuesta inmune del hospedero. (17)

En contraste la leishmaniasis cutánea difusa (16,17) está caracterizada por bajos niveles de citoquinas liberadas por células Th1, altos niveles de anticuerpos (Figura 1-2) lo que lleva a que no haya una adecuada función microbicida por parte de los macrófagos y una alta carga parasitaria. También se observa una alta liberación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, que está involucrada en la supresión de la respuesta inmune dada la activación de las células T regulatorias.

1.1.4 Tratamiento de primera línea

Para el tratamiento de la enfermedad tradicionalmente se ha utilizado como primera línea las sales de antimonio pentavalente (Sb^{+5}), las cuales han sido el tratamiento principal por más de 70 años para todas las formas de Leishmaniasis, dos formulaciones son utilizadas sodio-estibogluconato (Pentostam ®) y meglumina-antimoniato (Glucantime ®). (18)

Las sales de antimonio pentavalente son administradas vía intravenosa o intramuscular, la dosis recomendada por la organización mundial de la salud es de 20 mg/kg/día por 20 días consecutivos. Sin embargo, su uso tiene varios efectos adversos entre las cuales están los efectos secundarios como dolor, vomito, náuseas, diarrea, fatiga, dolor de cabeza, fiebre, falla del hígado, cardiotoxicidad entre otras. (4)(19)

El antimonio es un profarmaco que para activarse debe sufrir una reducción biológica de antimonio pentavalente a trivalente, sin embargo, la localización de este proceso, en el macrófago o en el parásito permanece como un tema controversial. El glutatión y el tripanotion en el macrófago y en el amastigote, son las moléculas antioxidantes relacionadas con la reducción no enzimática del medicamento. (18)

El modo de acción de los antimoniales involucra varios efectos en el metabolismo del tripanotion y glutatión. Se ha observado que la exposición al Sb(III) causa una rápida desaparición de las moléculas antioxidantes tanto en amastigotes como en promastigotes adicionalmente una proporción significativa de estos tioles son efluxados de la célula en

cantidades aproximadamente equimolares y el remanente de estas moléculas en la célula es transformado a su respectiva forma disulfuro (Tripanotion y Glutation), este proceso asociado a una continua oxidación relacionado con la inhibición de la tripanotion reductasa posiblemente inducido por el Sb(III). (20)

Así mismo se ha reportado que el estibugluconato de sodio en el estado de reducción (Sb^{+5}) inhibe la síntesis de macromoléculas en amastigotes, posiblemente por una perturbación energética dado la inhibición de la glicolisis y la β-oxidación de ácidos grasos. Otros estudios han reportado apoptosis en amastigotes tratados con la forma trivalente del antimonio, donde se ha observado fragmentación del DNA y externalización de la fosfatidilserina. Sin embargo, estos efectos no involucran la vía activación de caspasas. (4)

Entre las razones para la falla en el tratamiento con antimoniales en la leishmaniasis cutánea americana están la adherencia al tratamiento, la especie de *Leishmania* que está involucrada en la infección y la respuesta inmune del hospedero, esta última es de particular importancia ya que la pérdida significativa de la maquinaria antioxidante en *Leishmania spp* por la acción de los antimoniales hace al parásito susceptible a los daños por radicales libres del macrófago, esto sugiere que es necesario una respuesta eficiente por parte de los macrófagos para que el tratamiento sea exitoso. (18)

1.2 Agente Causal

El agente causal de la enfermedad es un protozoario perteneciente al género *Leishmania* que comprende más de 30 especies, de los cuales 21 son responsables por causar la enfermedad

Durante el desarrollo del parásito en el tracto digestivo del vector se han descrito diferentes cambios morfológicos que están asociados con cambios genéticos y bioquímicos, que conllevan a la transformación de promastigotes no infectivos o poco infectivos (procíclicos) en promastigotes infectivos (metacíclicos), en un proceso denominado metaciclogénesis. (21)

Inicialmente la primera transformación del parásito en el vector es la de amastigote a promastigote procíclico, de 18 a 24 horas después de la ingestión de la comida de sangre.

Seguido a la primera transformación se distinguen otros tipos de promastigotes morfológicamente distintos entre los cuales están: nectomónadas, leptomonadas, haptomónadas y promastigotes metacíclicos.(22)

Los promastigotes procíclicos son el estadio responsable de la expansión inicial de la población de parásitos de tal manera que se multiplican rápidamente y se transforman en nectomonadas las cuales son formas alargadas con flagelos elongados que les confiere una mayor movilidad, estas formas son capaces de salir de la matriz peritrófica y migrar al intestino posterior del vector donde se pueden adherir al epitelio a través de hemidesmosomas flagelares.

La región de adhesión de la forma nectomonada del promastigote es una característica importante que diferencia dos de los principales subgéneros de *Leishmania,* en el subgénero *Viannia* se conserva el desarrollo en el intestino posterior denominándose peripilaria, mientras en las especies del subgénero *Leishmania* hay desarrollo únicamente en la región anterior y media del intestino, denominándose suprapilaria; característica que fue utilizada por Lainson & Shaw en 1979 para la clasificación taxonómica del género. (23)(Figura 3)

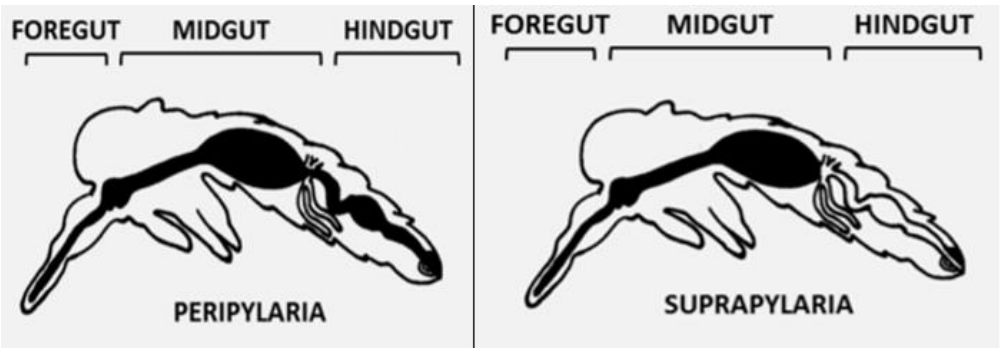


Figura 1-3: Ilustración del desarrollo de las especies del Subgénero Viannia (imagen de la izquierda) y Leishmania (imagen de la derecha) en el intestino del vector. Adaptado de (20)

Ilustración del desarrollo de las especies del Subgénero *Viannia* (imagen de la izquierda) y *Leishmania* (imagen de la derecha) en el intestino del vector. Adaptado de (24)

Posteriormente la forma nectomonada se diferencian en haptomonadas, que es una forma que posee una expansión en la punta del flagelo y se une a la superficie del epitelio intestinal a través de una unión tipo hemidesmosoma, aunque son formas poco comunes

en el subgénero *Viannia.* El siguiente suceso es una migración hacía la parte posterior del intestino donde hay una transformación a promastigotes tipo leptomonada que establecen una segunda ronda de replicación para la población del parásito en el intestino medio anterior, donde se produce el gel secretado por promastigote y la diferenciación a promastigote metacíclico. (25)

La forma metaciclica es la forma infectiva del hospedero vertebrado que no posee ciclos de división y pierde la capacidad de adhesión al epitelio intestinal del vector, asegurando que son formas libres disponibles para transmitirse. Para que la forma metacíclica del promastigote pueda iniciar una infección, primero debe sobrevivir a los mecanismos de defensa microbicida a los que está expuesto en el hospedero vertebrado, los cuales incluyen la lisis mediada por complemento y las actividades dependientes o independientes de oxígeno en el macrófago. Es por esto por lo que en el proceso de metaciclogénesis además de los cambios morfológicos, también existen una serie de cambios moleculares que le confieren a la forma metacíclica del promastigote una mayor probabilidad de supervivencia y de completar su ciclo de vida en el hospedero vertebrado. (26)

Entre los cambios moleculares observados en los promastigotes metacíclicos están el LPG y la glicoproteína gp63. El LPG confiere la protección contra enzimas hidrolíticas en el vector y además funciona como antígeno de superficie. El papel protector del LPG contra las enzimas proteolíticas del vector se demostró empleando mutantes de LPG, las cuales produjeron bajas tasas de infección a las 48 horas después de la ingestión comparadas con la infección producida por la cepa silvestre, apoyando lo evidencia por Schlein y Romano en 1986.(27)

Otra función que involucra al LPG en el vector es la adhesión de los parásitos en estadio promastigote al epitelio intestinal proceso que es una característica inherente a los promastigotes procíclicos que es eliminada durante la transformación a promastigote metacíclico o infectivo. Esta característica permite la liberación y migración del parásito infectivo hacia la probóscide del insecto, para luego ser transmitido durante una nueva picadura. (25)

La glicoproteína gp63 es una metaloproteasa de *Leishmania* ampliamente estudiada, de la cual se sabe que presenta polimorfismo entre especies y su expresión es diferencial entre el estadio promastigote y amastigote encontrándose en menor medida en estos últimos. Adicionalmente esta proteína al igual que el LPG funciona como un antígeno de superficie y se ha observado que el incremento en la infectividad en los promastigotes metacíclicos está asociado con un aumento en la expresión de esta metaloproteasa (1)

Cuando el vector inocula el parásito en el hospedero vertebrado se desarrolla una respuesta inmune la cual atrae diferentes células presentadoras de antígeno con capacidad fagocítica, entre estas los macrófagos, células en las cuales el patógeno se desarrollará en un compartimento denominado vacuola parasitofora.

El proceso de endocitosis o unión inicial e internalización de los promastigotes de *Leishmania* en los macrófagos, es mediado por receptores, que involucra factores derivados del suero y moléculas tanto del parásito como de la célula hospedera. Entre las moléculas de la célula hospedera que participan en este proceso están los receptores de las subunidades C3b y C3bi del componente 3 del complemento que se unen a CR1 y CR3 respectivamente, los receptores de lectina que median uniones con moléculas de carbohidratos y las integrinas que reconocen secuencias específicas de aminoácidos. Las principales moléculas de superficie de Leishmania involucradas en la interacción inicial con el macrófago son gp63, los lipofosfoglicanos (LPG) el principal glicoconjugado del promastigote y los glico inosito fosfolípidos (GPIs). (17)

Luego de la unión inicial entre el parásito y el macrófago, este último genera unas prolongaciones tipo pseudópodos para rodear e invaginar al microorganismo. Muchos compartimentos celulares incluyendo el retículo endoplasmático y endosomas maduros, entre otros, contribuyen a la formación del fagosoma a través de eventos de fusión sucesivos regulados por proteínas SNAREs y sinaptotagminas, estas últimas relacionadas con el reclutamiento de proteínas de endosomas reciclados para formar el fagosoma y controlar el proceso fagocítico.(17)

La interacción entre el macrófago y el parásito de *Leishmania* incluye una diversidad de factores que le permiten al parásito sobrevivir y reproducirse, entre estos está el secuestro

o modulación de vías antimicrobianas y el uso de compartimentos como el fagolisosoma. (28)

Dentro de las estrategias que utiliza el parásito hay una colección de mecanismos y moléculas, en las cuales está la proteasa GP63 la cual puede ser secretada o puede estar anclada a la superficie por una unión glicofofatidilinositol, es la proteína más abundante en la superficie de promastigotes y representa el 1% del proteoma total del parasito, es diferentes estudios se ha demostrado que GP63 puede llegar al citosol y núcleo del macrófago y clivar múltiples sustratos como factores de transcripción, proteínas tirosina fosfatasas, y el complejo de rapamicina (mTOR). Adicionalmente otros estudios en GP63 han demostrado que afecta significativamente las proteínas fagosomales Snare Vamp8 involucradas en la presentación cruzada de antígenos de las células con capacidad fagocitica y en el transporte de vesículas hacia el fagolisosoma. (29)

Otras moléculas utilizadas por el parásito que aumentan su sobrevida en la célula hospedera son las fosfatasas acidas las cuales están presentes en la superficie de todas las especies de *Leishmania* estudiadas y poseen una resistencia significativa a la degradación proteolítica, así como una preferencia por niveles de pH ácidos, lo cual es un beneficio importante para la estabilidad del parásito en ambientes como el fagolisosoma del macrófago o intestino del vector.

Para promover la formación de la vacuola parasitofora, los lipofosfoglicanos presentes en membrana de *Leishmania* interfieren con la formación de microdominios lipídicos fagosomales impidiendo el ensamblaje de la NADPH oxidasa, adicionalmente los lipofosfoglicanos pueden inducir la acumulación de F-actina perifagosomal lo cual puede actuar como una barrera física que previene el tráfico vesicular hacia el fagolisosoma. (30)

1.3 Lípidos de membrana en leishmania

Los lípidos son muy importantes para la biología de todas las células y organismos. Son los elementos estructurales principales de las membranas biológicas, anclan glicoconjugados y muchas proteínas a las membranas, también funcionan como moléculas de señalización dentro y entre células.(31)

Son moléculas de particular importancia para los patógenos, ya que en algunos casos estos pueden deliberadamente buscar hospederos con alta concentración de lípidos o desarrollar mecanismos para aprovechar el metabolismo lipídico de las células hospederas. Algunos de los patógenos intracelulares se desarrollan en vacuolas especializadas y el flujo de lípidos entre el hospedero y el patógeno es crítico para la supervivencia del parasito.(31)

Adicionalmente los lípidos también son importantes factores de patogénesis que permiten al patógeno evadir la respuesta inmune, manipular procesos del hospedero y causar enfermedad. Un ejemplo en parásitos protozoarios son los glicosilfosfatidilinositol GPI, los cuales incluyen los lipofosfoglicanos en las especies de *Leishmania* que son cruciales para la especificidad de hospedero y la supervivencia del parásito en el vector. (32)

Los fosfolípidos (FL) son los componentes mayoritarios de las membranas plasmáticas con una importancia mayor a solo ser una molécula estructural. La degradación de los glicerofosfolipidos genera un gran grupo de moléculas de señalización que incluyen inositol 1,4,5-trifosfato, 1,2-diacilglicerol, liso-fosfolipidos y ácido fosfatidico. Adicionalmente los fosfolípidos como el fosfatidilinisitol puede ser modificado por un grupo de cinasas (PI3K, PI4K y PIPKs) en fosfoinitositidos activos (PIP, PIP2 y PIP3); PI cinasas son actividad por pequeñas proteínas G monoméricas que regulan distintos procesos celulares incluyendo traficó de membranas y remodelamiento del citoesqueleto. (33)

Los fosfolípidos representan el 70% del total de lípidos celulares en *Leishmania*, las especies con mayor representación, según el grupo de alcohol que presenten, son: la fosfatidilcolina de un 30-40%, fosfatidiletanolamina (~10%) y fosfatidilininositol (~10%). (33)

Los esfingolípidos constituyen otro gran grupo dentro de los componentes de lípidos de la membrana celular de los parásitos del género *Leishmania* donde la mayoría de las especies de este lípido pertenecen al inositol fosfoceramida no glicosilado y la ceramida. Cada metabolito en la biosíntesis o degradación de los esfingolípidos tiene una actividad importante. La ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina, esfingosina-1-fosfato median muchas vías de señalización que regulan la apoptosis, reconocimiento célula-célula, crecimiento y diferenciación. En particular la ceramida es un potente segundo mensajero que es capaz de activar diferentes proteínas. (31)

Adicionalmente los esfingolípidos junto con el colesterol se distribuyen homogéneamente en la membrana plasmática, aunque pueden encontrarse conglomerados en micro dominios denominados balsas lipídicas. Estos micro dominios han demostrado aportar características patogénicas a las formas sanguíneas de *T. brucei.* En el estadio promastigote de *Leishmania* se han aislado moléculas como el LPG o la metaloproteinasa GP63 que también confieren características patogénicas y además hay observaciones donde la composición de las balsas lipídicas cambia entre el promastigote procíclico a metaciclico. (34)

En la transformación de promastigote a amastigote también se han evidenciado cambios en el perfil de lípidos. En *Leishmania donovani* se ha evidenciado cambios en la relación esterol-fosfolípido con un aumento de dos veces en el primero y una disminución moderada en la segunda especie de lípido. Otros cambios observados en la misma especie es el incremento en ácidos grasos saturados y monoinsaturados que asemejan la composición lipídica de la membrana del hospedero, sugiriendo que la remodelación de lípidos en parte depende de los ácidos grasos o de la actividad de desaturasas y/o elongasas que estén disponibles en los macrófagos. (35)

1.4 Medicamentos que actúan sobre las vías lipídicas del parasito

1.4.1 Anfotericina B

La anfotericina B es un antibiótico polienico, es un agente terapéutico natural que se encentra como un metabolito de la bacteria *Streptomyces nodosus* aislado en 1955 en Venezuela, que actúa como un antimicótico de amplio rango y anti-parasitario. Es el tratamiento de elección para las infecciones sistémicas con hongos como *Candida albicans* o *Aspergillus fumigatus* (36)

Figura 1-4: Estructura química de la anfotericina B: (I) micosamina (II) Región polar del anillo macrolido (III) Cadena polienica constituida por 7 conjugados (C=C).. Adaptado de (32)

- **Mecanismo de acción**

La anfotericina B pertenece a la familia de fármacos de macrolidos polienicos los cuales tienen como característica la unión a los esteroles de la membrana celular de eucariotas (ergosterol en hongos y protozoarios como leishmania). La teoría prevalente en torno al mecanismo de acción es la formación de estructuras similares a canales (poros) que se forman sobre la membrana celular generando canales iónicos. Estos canales de membrana formados por anfotericina B incrementan la permeabilidad de la membrana celular a los iones y pequeñas moléculas llevando a un desbalance osmótico de la célula, siendo esencial la presencia de esteroles para que se observe la actividad formadora de canales de la anfotericina B. (36)

Se ha reportado que la habilidad de formar canales iónicos en la membrana celular no es suficiente o al menos no es el principal mecanismo por el cual se genera el efecto citotóxico,(37). Sin embargo, se ha descrito que la deleción sintética del grupo micosamina de la estructura de la anfotericina B (Figura 1-4) elimina completamente la creación de canales y la actividad antifúngica del fármaco atribuyéndole a este elemento estructural y su capacidad de unión a otra molécula del fármaco y al esterol el efecto microbicida. Por otro lado se ha demostrado que la unión de anfotericina B a los esteroles es esencial y es suficiente para generar el efecto citotóxico, excluyendo el proceso de formación de canales como el principal mecanismo de acción, ya que en estos experimentos la formación de

canales fue inhibida al eliminar el grupo hidroxilo del carbono 35 de la estructura de la anfotericina B y aun así se mantiene el efecto toxico (38,39)

Otro mecanismo por el cual la anfotericina puede ejercer su efecto leishmanicida es la de secuestrar el colesterol presente en los macrófagos, dado que el medicamento interactúa específicamente con esta molécula, afectando la interacción macrófago-parasito, esto está apoyado por la observación de que el pre-tratamiento de macrófagos con anfotericina B es suficiente para inhibir la infección por *Leishmania*. (36)

- Sensibilidad diferencial entre especies

Las diferencias en la sensibilidad a la anfotericina B de las diferentes especies del género *Leishmania* deben ser esperadas dada la variación en el tipo y cantidad de esteroles en membrana de diferentes especies. En estudios in vitro de 6 especies de *Leishmania* en un modelo de macrófagos murinos, los amastigotes de *Leishmania mexicana* fueron los menos sensibles al antibiótico. En contraste se ha reportado una alta eficacia de la anfotericina B liposomal contra *L. donovani L.infantum/L. chagasi* (4)**.** También, se ha encontrado que las tasas de respuesta a la anfotericina B liposomal pueden variar según la zona geográfica, ya que en el caso de leishmaniasis visceral en India se observa una mejor respuesta con respecto al este africano (40).

En cultivos de promastigotes con anfotericina B se ha visto que esta fue 8 veces más activa en contra de *L. pifanoi* proveniente de una Leishmaniasis cutánea difusa que de L. *braziliensis* o *L. tropica*. (41)

- Mecanismo de resistencia

Es escasa la evidencia que se ha producido en cuantos a los mecanismos que median la resistencia a anfotecina B. Dentro de la evidencia que se ha encontrado la unión a los esteroles de membrana por parte de la anfotericina B no es suficiente para generar la muerte celular, el mecanismo actual de acción del medicamento puede ser más complejo y multifactorial. (42) Existen reportes en hongos en donde el tratamiento con anfotericina B bajo condiciones sub-terapéuticas lleva a la perdida de iones monovalentes pero no provoca muerte celular (43)

En promastigotes de *Leishmania donovani* resistentes a anfotericina B se ha encontrado que el ergosterol es reemplazado por el precursor cholesta-5,7,24-trien-3β-ol, esto resultado de un defecto en la transmetilación de C-24 por la pérdida de función SCMT, lo cual conferiría a la cepa resistente una alta fluidez en la membrana bajando la afinidad de la anfotericina por la membrana pues esta necesita de una baja fluidez. (42,44)

1.4.2 Miltefosina

La miltefosina es otra opción terapéutica dentro de los medicamentos de segunda línea utilizados contra la leishmaniasis, la cual es utilizada desde 1998 contra la leishmaniasis visceral en India y en 1999 se iniciaron los estudios clínicos en Colombia en pacientes con leishmaniasis cutánea, para ser finalmente aceptada en el esquema de tratamiento de la enfermedad desde el 2005. (45)

La miltefosina es un análogo de fosfolípido que pertenece al grupo de las alquil-fosfocolinas, las cuales en su estructura no tienen el esqueleto de glicerol típico de los fosfolípidos y son esteres de fosfocolina de cadenas largas alifáticas de alcoholes, que estructuralmente están relacionadas al grupo de los alquil lisofosfolípidos (ALPs) que son análogos sintéticos de las lisofosfatidilcolinas o lisolecitinas, (46), Son una clase de drogas anti-cancerígenas que actúan a nivel de la membrana celular modulado la homeostasis lipídica. También se ha encontrado que este medicamento tiene actividad contra especies del género *Leishmania* y tiene la ventaja de que puede ser administrado de manera oral. Tiene una eficiencia muy baja con *L. (V.) braziliensis*. (46)

- Mecanismo de acción

El mecanismo leishmanicida de la miltefosina se cree que está relacionado con la interferencia con el funcionamiento de los lípidos, principalmente de aquellos que se encuentran en la membrana celular y tienen una función estructural como la fosfatidilcolina o la fosfatidiletanolamina produciendo una alteración de los diferentes procesos de transducción de señal mediados por lípidos con una alteración de la fosfolipasa C, A2 o D.

Así mismo también se ha observado una inhibición de la Citocromo C oxidasa, despolarización mitocondrial y muerte celular (45,47).

Una de las condiciones requeridas para el efecto leishmanicida de la miltefosina es la acumulación del medicamento dentro de la célula. Para los análogos de fosfolípidos como la miltefosina se ha observado que una de las formas de internalización es por su afinidad a raft-lipidicos ricos en colesterol y se ha evidenciado previamente que los ALPs son internalizados en células de carcinoma humano y linfoma de ratón por endocitosis mediada por raft lipídicos. Sin embargo, también hay evidencia que soporta la translocación de ALP por un mecanismo dependiente de ATP asociado a dos proteínas que forman un complejo en la membrana plasmática, el transportador de Miltefosina LdMT y la subunidad β LdRos3. (48)

Una vez la miltefosina es internalizada en el parásito o en la célula cancerígena se ha observado la inhibición de la síntesis de fosfaditilcolina adicional a la síntesis de lípidos por vías secundarias como la fosfatidiletanolamina. En células cancerígenas también se ha observado que inhibe el transporte de colesterol de membrana al retículo plasmático y dada la naturaleza anfipática son fácilmente insertados en la membrana celular. (49)

- Sensibilidad entre especies

Se ha reportado que tanto el estadio promastigote como amastigote de *L. (V.) panamensis, L. (L.) mexicana* y *L. (L.) major* tienen baja sensibilidad a la miltefosina siendo la última especie la de menor sensibilidad, adicionalmente el medicamento mostro una acción de 2 a 10 veces más alta en promastigotes que en amastigotes (41)
Adicionalmente también se ha encontrado resistencia en campo en *L. (L.) tropica* y *L. (V.) braziliensis* y generada en laboratorio en *L. (L.) infantum, L. (L.) major y L. (L.) donovani.* (50)
En un estudio realizado en regiones de alta transmisión en Colombia se observó que *L. (V.) panamensis y L. (V.) braziliensis* son poco sensibles a miltefosina con el 68% de cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes a 16µM (6.5µg/mL) una concentración que diferencia las cepas silvestres de las líneas seleccionadas experimentalmente. Resultados que coinciden

con la baja respuesta clínica de pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis* a miltefosina en algunas áreas geográficas. Además, en parásitos aislados de *L. (V.) panamensis* de la Amazonia y la Orinoquia fueron significativamente menos susceptibles a la miltefosina.(51)

Adicionalmente se ha sugerido que la miltefosina puede interferir con el metabolismo de lípidos y éteres de *L. (L.) mexicana* por la inhibición del metabolismo de lípidos. (41)

- Mecanismo de resistencia

Parte del entendimiento de los mecanismos de acción del medicamento provienen de estudios con líneas celulares experimentalmente resistentes a la miltefosina, donde se ha demostrado que la acumulación intracelular del medicamento es un prerrequisito para la actividad de miltefosina lo que depende de la actividad del heterodimero LdMT y la subunidad β LdRos3. (48)

La característica compartida en las líneas de Leishmania resistentes a miltefosina es una reducción en la acumulación del medicamento. Bajas concentraciones del medicamento se pueden lograr por al menos 4 mecanismos: reducción en la incorporación, incremento de la eliminación, incremento del metabolismo y alterar la permeabilidad de la membrana plasmática. Adicionalmente modificaciones en las composiciones de lípidos de las membranas y la biosíntesis de esteroles han sido detectadas en promastigotes resistentes a miltefosina. (52) Dentro de los 4 mecanismos por los cuales se puede observar las bajas concentraciones del medicamento están las mutaciones en la maquinaria de translocación de la miltefosina que están directamente relacionadas con la sensibilidad de *Leishmania* al medicamento. (48,53)

La fluidez de la membrana y la permeabilidad son influenciados por la composición de lípidos, su modificación puede afectar las interacciones medicamento-membrana. Por ejemplo, la reducción de esteroles en la membrana plasmática decrece la susceptibilidad del parásito a miltefosina, los autores del estudio (54), sugirieron que los esteroles y los raft lipídicos tienen un rol importante en el reservorio Miltefosina. (54,55).

2. Antecedentes y planteamiento del problema

El mecanismo de acción de anfotericina b y miltefosina, altera la homeostasis de lípidos y esteroles de membrana, adicionalmente se ha evidenciado que en especies del subgénero *L. Leishmania* existe resistencia cruzada *in vitro* a los dos medicamentos, así como una relación funcional en las vias sobre las que actúa cada uno de ellos

Las especies más prevalentes de *leishmania* en Colombia son, *Leishmania (V.) guyanensis, Leishmania (V.) panamensis* y *Leishmania (V.) braziliensis* todas ellas pertenecientes al subgénero *L. Viannia* y productoras de cuadros cutáneos y mucocutáneos de la enfermedad. En casos de falla terapéutica o contraindicaciones a la primera línea de tratamiento para LC en la región está indicado la administración de miltefosina y/o anfotericina b, sin embargo, no se hace una evaluación de la especie infectante y varios estudios han demostrado una disminución en la susceptibilidad de *Leishmania (V.) braziliensis* a miltefosina. Adicionalmente estudios en el Hospital Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta sugieren circulación de parásitos del subgénero *Viannia* con disminución en la susceptibilidad a anfotericina b.

En la literatura revisada no hay reportes de resistencia cruzada en especies del subgénero viannia, de tal manera que se hace necesario evaluar el potencial de estas especies para generar resistencia cruzada entre estos dos fármacos que son utilizados actualmente para tratar la enfermedad como segunda línea de tratamiento.

2.1 Pregunta de investigación

¿ Es posible la generación de resistencia cruzada entre anfotericina b y miltefosina en parásitos del subgénero *Leishmania Viannia* que han sido expuestos a miltefosina?

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el nivel de susceptibilidad a la Anfotericina B de parásitos de *Leishmania spp* expuestos previamente a Miltefosina.

3.2 Objetivos específicos

1. Generación *in vitro* de parásitos de *Leishmania spp* resistentes a Miltefosina
2. Evaluación de la capacidad biológica *in vitro* de los clones de *Leishmania spp* resistentes a Miltefosina
3. Determinación de la susceptibilidad a AmB de los parásitos de *Leishmania spp* resistentes a Miltefosina
4. Determinar la susceptibilidad a la Miltefosina y AmB de aislamientos clínicos de *Leishmania spp* que han sido previamente expuestos a Miltefosina

4. Metodología

4.1 Consideraciones éticas

El diseño metodológico de este proyecto no incluyo experimentación con animales ni seres humanos y según el artículo 11 de la resolución número 8430 de 1993 del ministerio de salud por la cual se establecen las normas científicas para la investigación en salud, el estudio se clasificó como una investigación sin riesgo ya que en ningún momento implica la intervención o modificación de variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales o la interacción con pacientes.

En cuanto a los aislamientos clínicos utilizados en este proyecto, se aseguró el anonimato y confidencialidad de la información del personal identificable y de contacto (Nombre, documento de identidad, dirección, teléfono) de los pacientes. Así mismo también se contó con el formato de preservación de muestra de los bancos biológicos del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta (CDFLLA) y del laboratorio de parasitología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), debidamente firmado por el paciente en el momento de la toma de la muestra.

4.2 Aspectos ambientales

La metodología de este proyecto de investigación contempló la manipulación de microorganismos que pueden contaminar el medio ambiente, por tal motivo toda actividad relacionada con su manejo se realizó en un espacio cerrado y en cámara de flujo laminar clase II.

Adicionalmente todo reactivo utilizado en técnicas de biología molecular se clasifico y etiquetó con la información necesaria para un manejo adecuado, tanto para estos residuos como para el material contaminado con residuos biológicos, se tuvo en cuenta las normas de seguridad del manual de procedimientos del laboratorio de parasitología de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

4.3 Bioseguridad

En este estudio se contempló todo lo estipulado en el capítulo uno de la resolución número 8430 de 1993 del ministerio de salud, donde se establecen los lineamientos de la

investigación con microorganismo patógenos o material biológico que pueda contenerlos. Así mismo también se aplicaron todas las normas de seguridad del manual de procedimientos del laboratorio de parasitología de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

El transporte de microorganismos entre los laboratorios del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta y el laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia se realizó siguiendo las recomendaciones de IATA para el transporte de sustancias biológicas clase B (UN3373). Brevemente, los parásitos fueron transportados en cultivo, en un recipiente herméticamente sellado a manera de embalaje primario. Este recipiente contenía un embalaje secundario con material de aislamiento y amortiguación para evitar el rompimiento del embalaje primario y material absorbente para contener los derrames en caso de fuga. Este procedimiento fue llevado a cabo por un profesional del laboratorio con certificación de expedidor de mercancías peligrosas IATA.

4.4 Seguridad de la información

La información generada por este proyecto fue guardada en una carpeta del servidor de archivo del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta denominado (SATURNO01) al cual solo tenía acceso el director, el co-director y el estudiante identificados con una clave de acceso. Adicionalmente se realizó una copia de respaldo o *"back up"* para preservar la seguridad de la información cada semana, según el protocolo específico para SATURNO01, adicionalmente se entregó toda la información a la Oficina de Docencia e Investigación del centro al darse por terminado el proyecto.

4.5 Pertinencia social

Mediante el desarrollo de este proyecto se logró el fortalecimiento científico para el desarrollo de proyectos de evaluación de medicamentos, específicamente Miltefosina y Anfotericina B. En América la AmB y la miltefosina son medicamentos de segunda línea para el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea y muco-cutánea y de primera línea para el tratamiento de la Leishmaniasis visceral. Sin embargo, poco es conocido de la resistencia y susceptibilidad *in vitro* a este medicamento para las especies circulantes en Colombia. La posibilidad de que las especies de *Leishmania* puedan desarrollar resistencia

cruzada a estos dos medicamentos puede tener un impacto significativo en la manera en que se administran las reducidas opciones terapéuticas a la Leishmaniasis.

4.6 Cultivo de cepas de parásitos

Las cepas de referencia de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) y *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) se mantuvieron a 27ºC en medio Schneider (Schneider's Drosophila Insektenmedium, Genaxxon Bioscience) suplementado con 10% de suero fetal bovino y gentamicina. El cultivo de los clones en inducción de resistencia se realizó con el mismo esquema anterior, más la adición la dosis de miltefosina (Cayman Chemical Company) a la que se encontraba el cultivo en ese momento. Para el clon derivado de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) las concentraciones fueron las siguientes: 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145µM, para el clon de *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) 7, 14, 24, 34, 44, 54 µM y para el clon de *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24µM.

En el caso de los cultivos realizados en medio senekjie, la fase liquida estaba compuesta por medio schneider con gentamicina sin suero fetal bovino más la dosis de miltefosina, también se mantuvo a 27°C.

Las condiciones cultivo de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* fueron exactamente la mismas que para los clones de las cepas de referencia, descritas en el párrafo anterior.

- *Curvas de crecimiento*

Para las curvas de crecimiento se colocaron una cantidad de 1*10^6/ ml parásitos el primer día y se realizaron conteos diarios en cámara de neubauer hasta que el cultivo alcanzará la fase estacionaria de la curva, aproximadamente 7 días después. Las curvas de crecimiento se colocaron por duplicado.

4.7 Generación de clones

Para generar los clones de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) y *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) se utilizó la metodología de la dilución limitante, previamente empleada en un trabajo del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, para generar clones resistentes a AmB

derivados de aislamientos de referencia susceptibles al medicamento. La metodología consistió en realizar diluciones seriadas de los parásitos de cada una de las especies en factor de ½ en una placa de 96 pozos a partir de 100 µl de una solución de 1000 parásitos/ml. La placa de 96 pozos posteriormente fue evaluada en el microscopio invertido para identificar los pozos en los que hubo un solo promastigote. Las poblaciones de parásitos derivadas de estos pozos se tomaron como clones. Los clones derivados de los promastigotes de los aislamientos de las cepas de referencia fueron sometidos a diferentes concentraciones crecientes de miltefosina para inducir la resistencia a miltefosina.

4.7.1 Inducción de resistencia *in vitro* a miltefosina.

La inducción de resistencia a miltefosina en los clones de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) y *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) se realizó aumentando de forma creciente y gradual la dosis del fármaco en cultivo.

La dosis de miltefosina inicial de la inducción de resistencia fue aproximadamente la mitad de la dosis efectiva 50 determinada en el presente trabajo para cada uno de los clones. La dosis de inicio de inducción de resistencia para el clon derivado de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) fue de 15µM, para el clon de *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) fue de 7µM y para el clon *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) fue 2µM.

Una vez los cultivos tenían el mismo comportamiento en términos de crecimiento con la cepa sin inducción de resistencia, la dosis de miltefosina aumentaba al doble, proceso que duraba al menos 4 pases, en caso de que el cultivo tomara más pases en llegar al mismo crecimiento que la cepa sin inducción de resistencia, se disminuía la concentración del medicamento. En el caso del clon de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) las dosis de miltefosina utilizadas en cultivo para generar la resistencia *in vitro*, fueron las siguientes: 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145µM, para el clon de *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) fueron: 7, 14, 24, 34, 44 µM y para el clon de *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) fueron: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24µM.

4.7.2 Evaluación de la susceptibilidad a miltefosina y anfotericina B.

Para evaluar la susceptibilidad a miltefosina y anfotericina B, se realizó un ensayo colorimétrico con AlamarBlue® (rezasurina) de viabilidad celular representada en la inhibición de la actividad metabólica. Se sembraron 2x10*5 promastigotes en placas de 96 pozos en medio Schneider completo, más la dosis del medicamento. En el caso de la miltefosina para *Leishmania panamensis* el cultivo se expuso a las siguientes concentraciones: (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5µM), para *Leishmania guyanensis* (64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5µM) y para *Leishmania braziliensis* (243.2, 60.8, 30.4, 15.2, 7.6, 3.8, 1.9µM) y se incubo por 66 horas a 27°C, una vez pasado el tiempo se adicionaron 4µl de AlamarBlue® 2.5mM y se incubo una vez más por 6 horas a 27°C, luego se leyeron las absorbancias a 570 y 630nm en el lector ThermoFisher Scientific Multiskan Go.

En el caso de la anfotericina b, el tiempo de incubación total, incluyendo el alamar blue fue de 48 horas y con las siguientes concentraciones del fármaco: (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.031, 0.015µg/ml)

4.8 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de los clones inducidos resistentes se utilizó el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). La extracción se realizó a partir de una cantidad de parásitos igual o superior a $1x10^8$. El RNA obtenido fue cuantificado en NanoDrop y almacenado en -80° hasta su uso.

4.9 Retrotranscripción

Antes de iniciar el proceso de retrotranscripción se adiciono un paso con DNAsa (Invitrogen). El RNA extraído se incubo con DNAsa por 15 minutos a temperatura ambiente posteriormente se adiciono 1µl de EDTA 25mM y se calentó por 10 minutos a 65°C.

Para la retrotranscripción se utilizó el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit y se usó 1µg de RNA extraído de cada uno de los clones inducidos resistentes y del control sin inducción de resistencia. El protocolo se estandarizo según el procedimiento del kit, a un volumen de 20µl, donde las concentraciones finales utilizadas fueron 1X de buffer de la enzima, 2µl de random primers, 0.8µl de dNTPs y 1µL de la retrotranscriptasa reversa. El perfil térmico ejecutado fue el sugerido por la casa comercial: 10 minutos a 25°C, 37°C por

120 minutos, 85°C por 5 minutos y 4°C para finalizar el procedimiento. El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

4.10 qRT-PCR

Para la qRT-PCR se utilizó el SsoFast™ EvaGreen® Supermix a un volumen final de reacción de 15µl, con 7.5µl de la Mix 1X y las siguientes concentraciones de primers: para el gen housekeeping (Actina) se utilizó 0.6µM de cada primer Fw 5'- (GGCGAACGAGGAGTCATTTG) -3' y Rev 5'- (ATCAGCGACGGCTTGAACAG) -3', para el gen transportador de miltefosina (MT), 0.3 µM de cada primer Fw 5'- (GACAGGCGTTCATTGACACATG) -3' y Rev 5'- (CTATTCATGATCGTCTCGACTTTGC) -3', para el gen de Vamp, se utilizó 0.3 µM, de cada primer Fw 5'- (GAGATGAGGCTTCTG GCCGAGC) -3' y Rev 5'- (GACGCCACCATCCTTGTCCTCG) -3', para el gen de la esterol metil transferada (SMT), se utilizó 0.3 µM, de cada primer Fw 5'- (TAAACAACAACGATTACCAGATCA) -3' y Rev 5'- (CTACAGAAGTCGGTCTTAATGTAG) -3',finalmente para el gen de la latosterol oxidasa (LO) se utilizó 0.3 µM , de cada primer Fw 5'-(CATTTATGCCGTTCTTGATG) -3' y Rev 5'- (TTATTGTACATCTTGCTATACCCAC) -3'. El perfil térmico de la reacción consistió en un ciclo de 50°C por dos minutos, un ciclo de 95° por 10 segundos, y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minutos. Todos los ensayos incluyeron 3 réplicas de cada muestra y control.

4.11 Análisis de expresión de genes

Para la evaluación de los niveles de expresión del transportador de miltefosina (MT), la proteína asociada al tráfico vesicular (Vamp), el esterol metil transferasa (SMT) y la latosterol oxidasa (LO) se utilizó el método de Livak, delta-delta ct $2^{-\Delta\Delta CT}$, siendo la actina el gen normalizador.

Las tres ecuaciones utilizadas para calcular el DDCT, fueron las siguientes:

La primera y segunda ecuación ((4.1.1 – 4.1.2)) normalizan la expresión del gen objetivo proveniente de muestras con o sin inducción de resistencia, con la expresión del gen normalizador.

$$CT\ Gen\ objetivo - CT\ del\ gen\ de\ control\ interno = \Delta CT\ inducido \qquad (4.1.1)$$

$$CT\ Gen\ objetivo - CT\ del\ gen\ de\ control\ interno = \Delta CT\ No\ inducido \quad (4.1.2)$$

La ecuación (4.1.3) describe el cambio de expresión de los genes.

$$\frac{2^{-\Delta \mathrm{ct}}\ \mathrm{Inducido}}{2^{-\Delta \mathrm{CT}}\mathrm{No\ Inducido}} = Fold\ change \quad (4.1.3)$$

Finalmente, para el análisis de los datos se presentó el: Log2 Fold Change.

4.12 Análisis estadístico

El EC_{50} se determinó por medio de una curva de dosis respuesta usando una regresión no linear en el software GraphPad Prism (8.0.1)

Para determinar la significancia de la diferencia en la expresión de genes se realizó una t student paramétrica no pareada en el software GraphPad Prism (8.0.1).

Para determinar el tiempo de duplicación poblacional, la fase exponencial de la curva de crecimiento (24, 48, 72 horas) se ajustó a la ecuación de curva exponencial y luego se realizó una prueba F en el software GraphPad Prism (8.0.1).

5. Resultados

5.1 Generación *in vitro* de parásitos de *Leishmania spp* resistentes a miltefosina

5.1.1 Detección de la susceptibilidad inicial a miltefosina en clones de *Leishmania spp.*

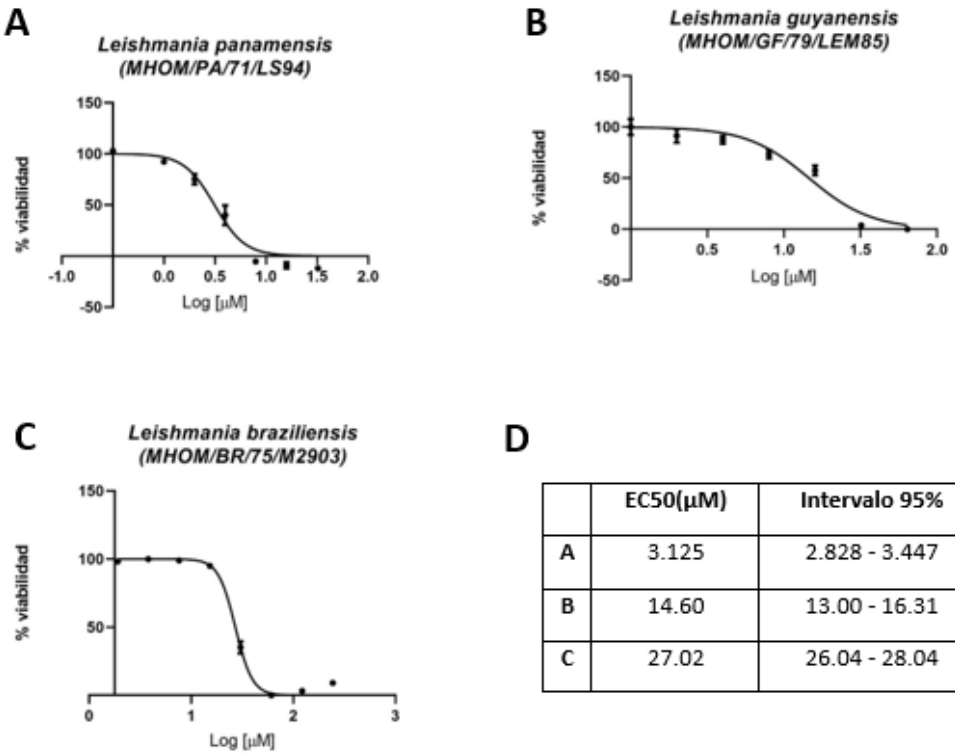
Para dar inicio al proceso de generación de parásitos con una reducción en la susceptibilidad a la miltefosina en estadio promastigote de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos, se obtuvo clones provenientes de aislamientos de referencia de las especies *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/GF/79/LEM85) y *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) respectivamente denominados C10, C2 y D11 a los cuales se les determinó la dosis efectiva 50 (EC50). Todos previamente generados a este estudio en el Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, por la técnica de dilución limitante, descrita en métodos. (56)

El establecimiento de la escalera de concentraciones de miltefosina para determinar la susceptibilidad de C10, C2 y D11 se realizó con base a los valores de EC50 reportados en la literatura para cada una de las especies. En el caso de *leishmania (V.) guyanensis* no hubo registros en la literatura de tal manera que las concentraciones utilizadas fueron basadas en datos no publicados del grupo de investigación **(tabla 5-1).**

	EC50 (µM)	**Referencia**
Leishmania braziliensis MHOM/BR/1995/M15280	61.43 ± 9.37	(57)
Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903	48.37±11.37	(58)
Leishmania braziliensis Aislamientos	25 - 70	(59)
Leishmania panamensis MHOM/COL/86/1166LUC	4	(60)
Leishmania panamensis (MHOM/PA/67/BOYNTON)	1.3 – 3.72	(61)

Tabla 5-1: Dosis EC50 reportada en la literatura para cepas de referencia de *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) panamensis*

Los valores de la dosis efectiva 50 establecida en este trabajo por medio del método de rezasurina, para los clones de las tres especies, fueron los siguientes: el clon menos susceptible a la miltefosina fue el C10 de *Leishmania (V.) braziliensis* con un EC50 de 27.02 µM, para el clon C2 de *Leishmania (V.) guyanensis* una dosis de 14.60 µM mientras que el clon más susceptible fue el de *Leishmania (V.) panamensis* con una dosis EC50 de 3.12 µM. **(Figura 5-1).**



	EC50(µM)	Intervalo 95%	R^2
A	3.125	2.828 - 3.447	0.9608
B	14.60	13.00 - 16.31	0.9447
C	27.02	26.04 - 28.04	0.9924

Figura 5-1: Graficas de dosis-respuesta y EC50 de D11, C2 y C10, clones de *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis*.

A. Grafica de dosis respuesta del clon D11 de *Leishmania panamensis* a miltefosina. **B.** Grafica de dosis respuesta del clon C2 *Leishmania guyanensis* a la Miltefosina. **C.** Grafica de dosis respuesta del clon C10 de *Leishmania braziliensis* a miltefosina. **D.** Tabla resumen con datos de dosis efectiva 50, intervalo de confianza y coeficiente de ajuste R^2 para D11, C2, C10.

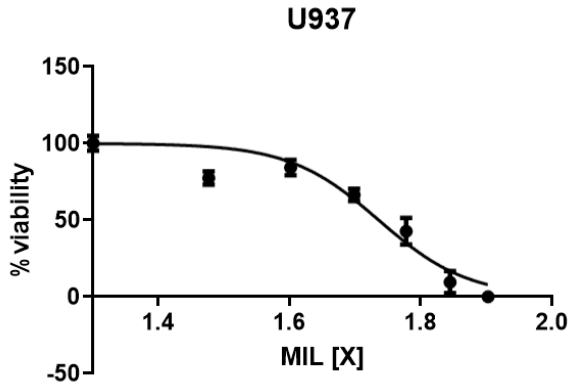


Figura 5-2: Gráfica de dosis respuesta de los monocitos de la línea U937 a miltefosina.

Adicionalmente se evaluó la susceptibilidad a miltefosina de la línea de pre-monocitica U937, la dosis efectiva 50 fue de 54.51µM (IC, 95%: 51.57-57.63µM. R^2 0.91) **(Figura 5-2)**

5.1.2 Inducción de resistencia

- Exposición de los clones de *Leishmania spp* a miltefosina

El incremento de la dosis de miltefosina en cultivo se realizó de manera gradual. Una vez que el cultivo con miltefosina crecía de igual manera que el cultivo control sin inducción de resistencia, se aumentaba la dosis del medicamento. Cada una de las tres especies inicio con una concentración de miltefosina menor a la del valor

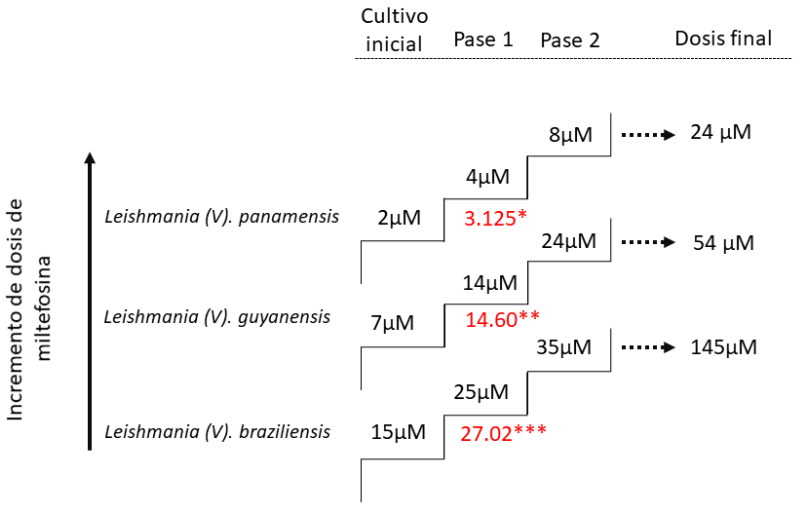


Figura 5-3: Exposición de C10, C2 y D11 de Leishmania spp a miltefosina.

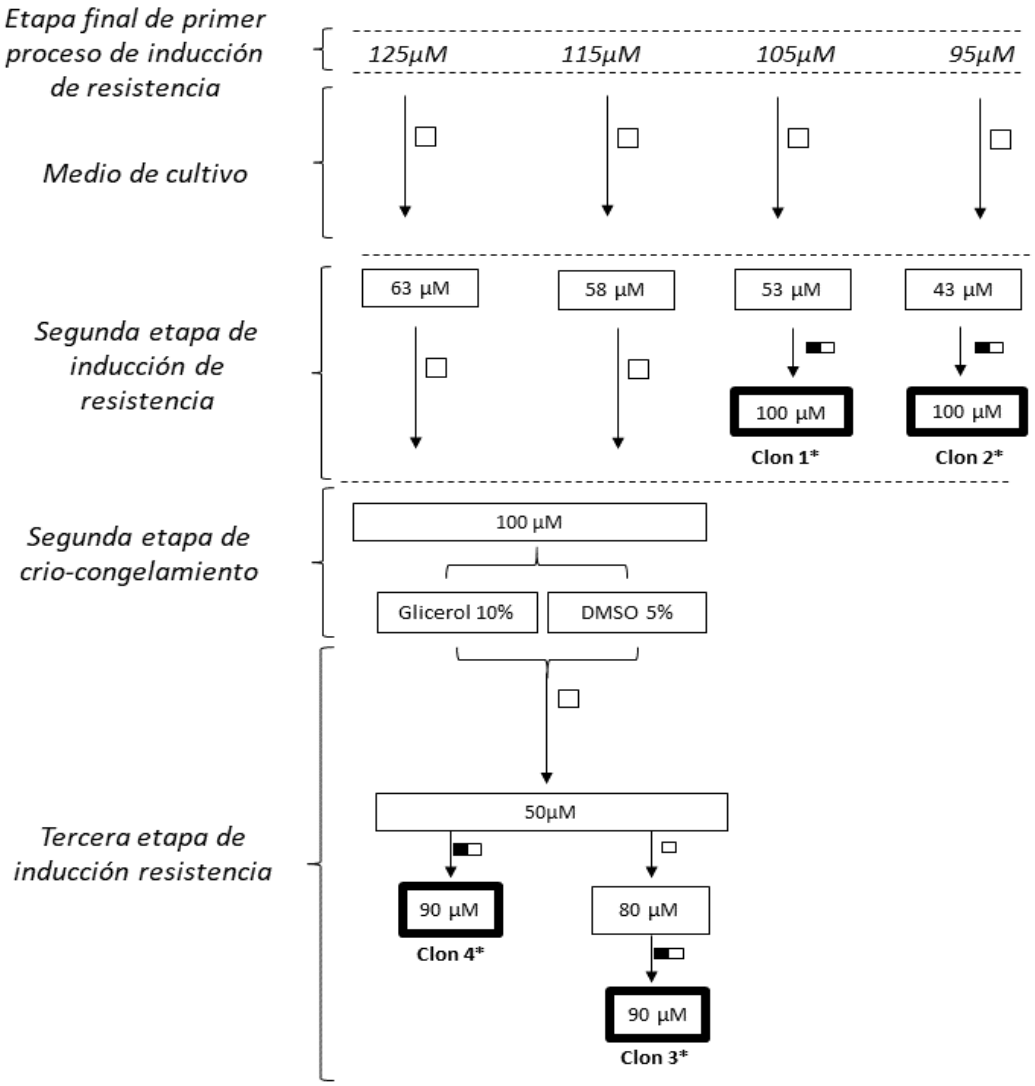
La figura muestra la dosis inicial y final que alcanzaron los clones en cultivo y la concentración de miltefosina de los dos siguientes sub-cultivos a la inicial para ilustrar la inducción de resistencia en cada una de las especies. Las tres primeras concentraciones de la inducción de resistencia del clon D11, Leishmania (v). panamensis fueron 2, 4, 8 hasta llegar a una concentración final en cultivo de 24µM. Las tres primeras concentraciones de la inducción de resistencia del clon C2, Leishmania (v). guyanensis fueron 7, 14, 24 hasta llegar a una concentración final en cultivo de 54µM. Las tres primeras concentraciones de la inducción de resistencia de C10, Leishmania (v). braziliensis fueron 15, 25, 35 hasta llegar a una concentración final en cultivo de 145µM. (*)(**)(***) Dosis EC50 para cada una de las especies reportada en el presente trabajo (*Leishmania (v). panamensis**, *Leishmania (v). guyanensis***, *Leishmania (v). braziliensis****)

de EC50 determinada en este estudio. Para el clon C10 de *Leishmania (V.) braziliensis* la concentración inicial del medicamento fue de 15µM, para el clon C2 de *Leishmania (V.) guyanensis* de 7µM y para ambas especies el aumento de la dosis en cada sub-cultivo fue de 10µM, teniendo en cuenta que la baja susceptibilidad al medicamento permitía un cambio grande de concentración, mientras que en el clon D11 de *Leishmania (V.) panamensis* el aumento de la concentración fue delimitada por la viabilidad del cultivo y la concentración de inicio de inducción de resistencia fue 2 µM. **(Figura 5-3)**

Debido al principal obstáculo técnico de este proyecto que es abordado en el siguiente capítulo de crio-preservación, se continuará describiendo únicamente el proceso de inducción de resistencia del clon C10 de *Leishmania braziliensis.*
En una etapa inicial, la inducción de resistencia del clon C10 de *Leishmania (V.) braziliensis* se desarrolló de manera sucesiva, en cultivo continuo siempre aumentado la dosis del medicamento. **(Figura 5-4)**

Posterior a este proceso se realizaron descongelamientos de clones a los cuales previamente se les había inducido resistencia y debido a la viabilidad de los cultivos fue necesario retornar a dosis menores de miltefosina además de cambio del medio de cultivo, como de describe en la **(Figura 5-4)**.

según el proceso de crioconservación-descongelamiento descrita en el siguiente capítulo para *Leishmania (V.) braziliensis*, los clones de C10 utilizados en el presente trabajo se dividen en dos grupos según su historia de inducción de resistencia, un grupo (125, 115µM) con 3 periodos de inducción de resistencia, separado por dos momentos de crio-preservación y el segundo con (105, 95µM) dos periodos de inducción de resistencia y un momento de crio – congelamiento. **(Figura 5-4)**



* Concentraciones finales de clones utilizados en el estudio

Medio Schneider

Medio Senekjie

Cultivo con un periodo de tiempo en senekjie y luego en schneider

Figura 5-4: Figura que ilustra el curso de la inducción de resistencia de los clones *de Leishmania (V.) braziliensis* utilizados en este trabajo.

Los clones (1-4) provienen de diferentes congelamientos (125 - 95 µM) realizados en la primera etapa de inducción de resistencia de este trabajo. Para describir la inducción de resistencia de los clones se dividieron en dos grupos, los clones que provienen de congelamientos con 3 ciclos de inducción de resistencia y 2 etapas de crio-congelamiento (125, 115 µM) y con dos ciclos de inducción de resistencia y una etapa de crio-congelamiento. (105, 95 µM). Adicionalmente en la figura también se ilustra el tipo de medio en el que se realizó la inducción de resistencia. Cultivos realizados en medio schneider (□) Cultivos realizados en medio Senekjie ( ), un periodo de tiempo en medio schneider seguido de otro en medio senekjie (□) indica un periodo de tiempo en schneider y luego en senekjie.

Parásitos que originalmente fueron expuestos en una primera etapa de inducción de resistencia hasta 125 y 115 µM, luego de la crio-preservación se retornó a una concentración más baja de miltefosina 63 y 58 µM respectivamente y de nuevo se indujo resistencia con un incremento de 10 µM en cada sub-cultivo hasta una dosis de 100 µM que fue crio conservada según el protocolo de Croft (62) descrito en el siguiente capítulo. **(Figura 5-4)**

Posteriormente el descongelamiento de los parásitos en el esquema de glicerol 10% y DMSO 5% se realizó en medio schneider, suero fetal bovino y la misma dosis de miltefosina a la cual se encontraba creciendo el cultivo antes de la criopreservación. Aunque se dio el crecimiento del cultivo, tenían una baja viabilidad representada en parásitos con formas inespecíficas (redondeadas), dos flagelos o perdida de movilidad, siendo un indicador de estrés en el cultivo, por tanto, se decidió disminuir la concentración de miltefosina en el medio de ambos descongelamientos de 100 µM a 50 µM. **(Figura 5-4)**

Una vez se siguieron los cultivos y se estableció que crecían los promastigotes sin problemas de viabilidad a una concentración de 50 µM del medicamento, se inició de nuevo la inducción de resistencia en medio schneider suplementado, con un aumento de 10µM de miltefosina cada dos sub-cultivos de los parásitos, no obstante ambos cultivos presentaron baja viabilidad siendo necesario cambiar de

medio de cultivo de schneider a senekjie. Para el clon que fue descongelado de glicerol 10% se cambió de medio desde la concentración 50 µM**,** mientras que para el clon descongelado en 5% DMSO el cambio se dio en la concentración de 80 µM, ambos cultivos terminaron en una concentración de 90µM **(Figura 5-4)**

El clon 1 y el clon 2 provienen del segundo grupo de inducción de resistencia, inicialmente la etapa de inducción de resistencia en este grupo llego hasta 105 y 95 µM y al igual que en el grupo anterior luego de la crio preservación se retornó a una dosis inferior de miltefosina 53 y 43µM respectivamente. Al presentarse problemas de viabilidad los cultivos se cambiaron de medio schneider a medio senekjie y se indujo resistencia hasta llegar a la concentración 100 µM en ambos cultivos. **(Figura 5-4)**

5.1.3 Criopreservación de parásitos resistentes a miltefosina

El aumento de la dosis de miltefosina en el cultivo, determinaba el fin de un ciclo de exposición al fármaco y definía un punto de criopreservación para los clones D11, C2 y C10 de las diferentes especies.

El principal obstáculo técnico que se ha presentado en el desarrollo de este proyecto es consistente con la no recuperación de parásitos a los que se les ha inducido resistencia *in vitro* a miltefosina una vez han sido criopreservados.

Con el objetivo de recuperar los congelamientos de clones D11, C2 y C10 con inducción de resistencia, se realizaron diferentes variaciones al protocolo de descongelamiento y se evaluaron criocongelamientos de diferentes ciclos de exposición al fármaco.

En total se realizaron 34 ensayos de descongelamiento que comprenden los últimos 4 ciclos de exposición al fármaco de los clones D11 y C2 de *Leishmania (V.) panamensis* y *Leishmania (V.) guyanensis,* y los últimos 7 ciclos de exposición a miltefosina del clon C10 de *Leishmania (V.) braziliensis* **(Figura 5-5)**.

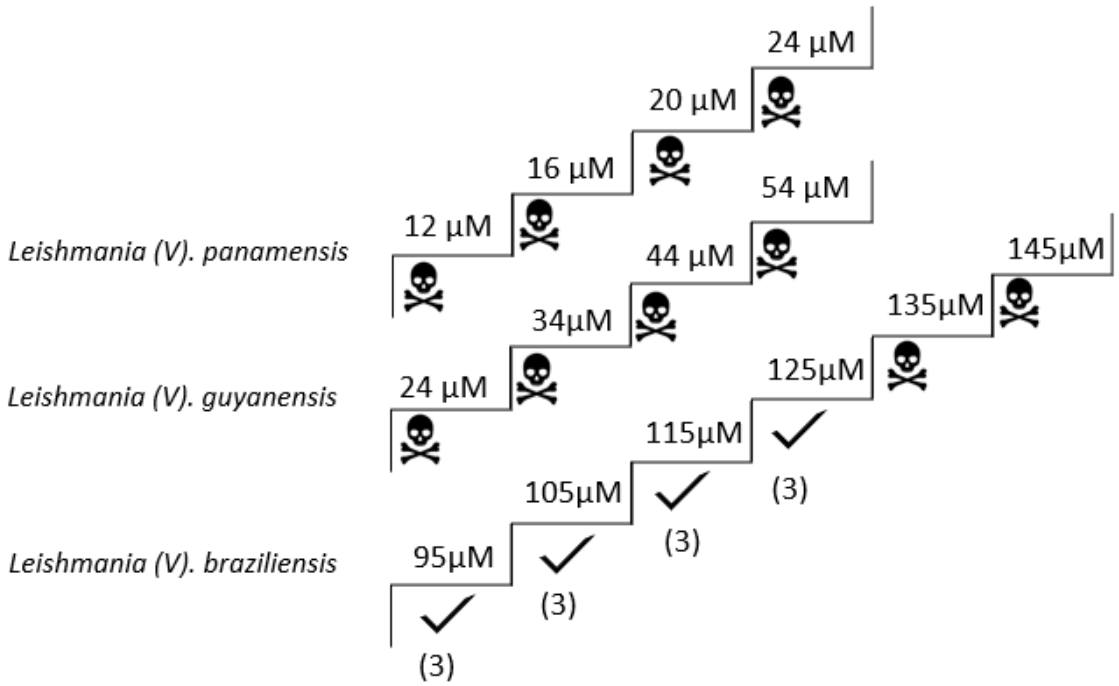


Figura 5-5: Efectividad de variaciones al protocolo de descongelamiento de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis.*

La figura muestra los descongelamientos realizados en *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis.* (☠) Corresponde a los criocultivos que no se recuperaron con ninguna de las variaciones al protocolo de descongelamiento. (✓) Corresponde a cultivos que se recuperaron efectivamente en la tercera variación al protocolo de cultivo (3) medio schneider suplementado con 10% de SFB y la mitad de concentración de miltefosina de la que fue usada para la crioconservación

La primera variación al protocolo de descongelamiento de los clones con inducción de resistencia consistió en descongelar en medio schneider con suero fetal bovino, sin miltefosina y se evaluó en los congelamientos provenientes del último ciclo de inducción de resistencia para cada uno de los clones, es decir, para el clon de *Leishmania (V.) braziliensis* fueron los criocongelamientos que provenían de cultivos que crecían a una concentración de 145µM, *Leishmania (V.) guyanensis* de 54 µM y para *Leishmania (V.) panamensis* de 24 µM. Sin embargo, esta

variación en el protocolo no fue exitosa para recuperar los criocongelamientos en ninguno de los clones C10, C2, D11.

La segunda variación también se evaluó en descongelamientos del último ciclo de exposición a la miltefosina y consistió en descongelar en medio con miltefosina suplementado con suero fetal bovino de una casa comercial diferente, no obstante, esta condición tampoco fue exitosa para recuperar los congelamientos de C10, C2, D11.

La última condición evaluada en los criocongelamientos del último ciclo de inducción de resistencia fue el descongelamiento en medio schneider con suero fetal bovino a la mitad de la concentración de miltefosina a la que estaban expuestos los parásitos antes del congelamiento, no obstante, esta última condición tampoco fue exitosa con la recuperación de C10, C2, D11

Una vez se evaluaron todas las condiciones de descongelamiento en los parásitos que fueron criocongelados en el último ciclo de exposición al fármaco, se siguió con el ciclo inmediatamente anterior y se realizaron los mismos ensayos. En *Leishmania (V.) panamensis* y *Leishmania (V.) guyanensis* no fue posible recuperar los congelamientos en ninguno de los ciclos de exposición al medicamento evaluados, en *Leishmania (V.) braziliensis* se logró recuperar los congelamientos desde el tercer ciclo de congelamiento que correspondía a la concentración de 125, 115, 105 y 95 µM, con la última variación al protocolo de descongelamiento **(Figura 5-4)**

Los congelamientos recuperados del clon C10 de *Leishmania (V.) braziliensis* se descongelaron a la mitad de la concentración a la que crecían al momento de la criopreservación (63, 58, 53, 43µM; respectivamente) para a partir de estas concentraciones dar inicio al aumento gradual del fármaco nuevamente. **(Figura 5-4)**

Los cultivos descongelados en dosis de 53 y 43µM, perdieron viabilidad gradualmente en schneider completo, de tal manera que se cambiaron a medio senekjie, con las condiciones descritas en la sección de métodos, hasta alcanzar una dosis de 100µM para luego ser cultivados de nuevo en medio schneider completo a la misma concentración de miltefosina. **(Figura 5-4)**

En cuanto a los cultivos descongelados en una dosis de 63 y 58µM una vez se estableció el cultivo en schneider de nuevo se inició la inducción de resistencia con el objetivo de establecer un método de criopreservación de los nuevos clones "resistentes" a miltefosina, se utilizó el descrito por Croft, que consiste en el uso de DMSO 5% y Glicerol 10% como medios de criopreservación (62) **(Figura 5-4)**

Los crio-conservamientos realizados con el esquema anterior fueron descongelados inicialmente en una concentración de miltefosina de 100µM en medio schneider suplementado, sin embargo, el cultivo proveniente del esquema con glicerol 10% perdió viabilidad y se cambió a medio senekjie hasta alcanzar una dosis de 90µM y luego se estableció de nuevo en medio schneider suplementado. El crio-cultivo proveniente del esquema con 5% de DMSO conservo la viabilidad hasta una concentración de miltefosina de 80µM, en este punto se cambió a medio senekjie hasta alcanzar una dosis de 90µM, proceso descrito en el capítulo de inducción de resistencia. **(Figura 5-4)**

- ***Determinación de la dosis efectiva 50 de promastigotes de Leishmania braziliensis***

La dosis efectiva 50 determinada para el clon de *Leishmania (V.) braziliensis,* que crecía a una concentración de 145µM en la primera etapa de inducción de resistencia fue de 129.6 µM, mientras que para el clon sin inducción de resistencia fue de 26.87 µM, es decir un clon 4.8 veces menos susceptible a la miltefosina. **(Figura 5-6)**

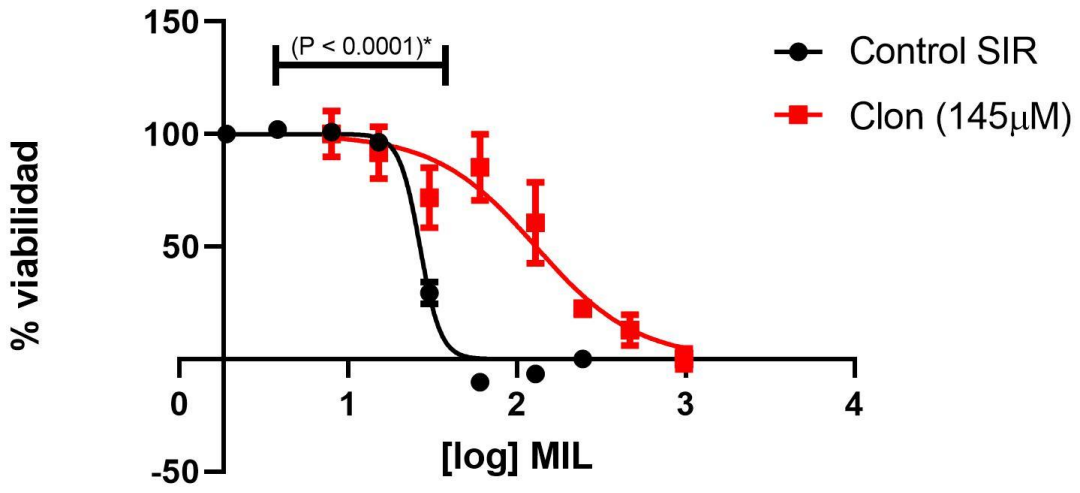


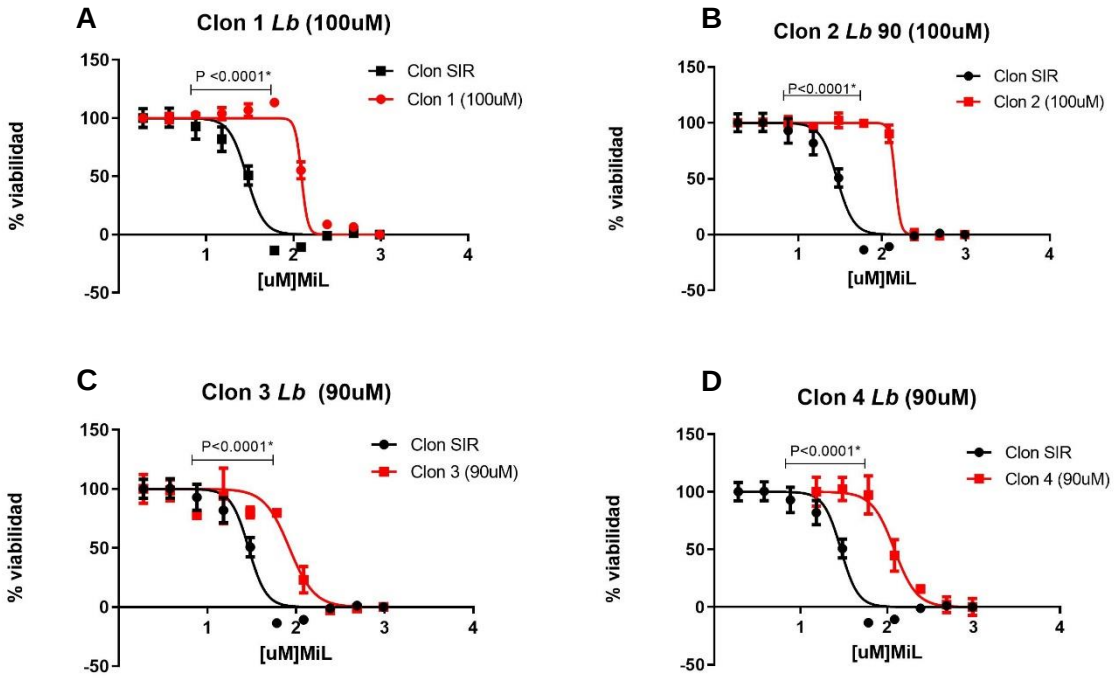
Figura 5-6: Susceptibilidad a miltefosina de los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* en primera etapa de inducción de resistencia.

(Línea roja) La grafica de dosis respuesta, muestra la susceptibilidad de los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* que crecían en cultivo a 145 µM, EC50 129.6 µM (IC, 95%: 103.8-159.5, R2 0.89). (Línea negra) Susceptibilidad de clon sin inducción de resistencia (SIR) a miltefosina, EC50 26.87 6 µM (IC, 95%: 25.91-27.88, R2 0.99), P valor (P<0.0001) de Prueba F para diferencia de medias.

En la segunda etapa de inducción de resistencia, se determinó la susceptibilidad a la miltefosina de los clones de *Leishmania braziliensis* 1-4 que crecían a una concentración de 100 y 90 µM. **(Figura 5-7)**

Todos los clones presentaron una disminución en la susceptibilidad a la miltefosina, reflejado en el desplazamiento a la derecha de curva de dosis respuesta en comparación con la del control sin inducción de resistencia.

La dosis EC50 determinada para los clones 1 y 2 que crecían en cultivo a una concentración de 100µM fue de 123.7 y 143.6 µM respectivamente, mientras que para los clones 3 y 4 que crecían en cultivo a una concentración de 90µM de miltefosina fue de 84.14 y 121.2µM respectivamente, con respecto a la dosis 50 del clon control sin inducción de resistencia que fue de 29.17µM. Los clones generados fueron de 3 a 5 veces menos susceptibles a la miltefosina. **Figura 5-7**



E

Clon	EC50 (µM)	IC, 95% (µM)	R^2
1	123.7	82.66 - 185.2	0.9756
2	143.6	76.07 - 271.1	0.9912
3	84.14	74.23 - 95.37	0.9145
4	121.2	110.8 - 132.7	0.9414
Control SIR	29.17	26.93 - 31.59	0.9506

Figura 5-7: Susceptibilidad a miltefosina de los clones de *Leishmania braziliensis* con inducción de resistencia a miltefosina.

Las gráficas ilustran la respuesta a miltefosina de los clones de *Leishmania braziliensis*. A. Grafica de dosis respuesta para el clon 1 que crecía a una concentración de 100µM en cultivo. B. Grafica de dosis respuesta para el clon 2 que crecía a una concentración de 100µM en cultivo. C. Grafica de dosis respuesta para el clon 3 que crecía a una concentración de 90µM en cultivo. D. Grafica de dosis respuesta para el clon 4 que crecía a una concentración de 90µM en cultivo. En todas las gráficas la línea negra representa la respuesta del clon control sin inducción de resistencia. La prueba F para diferencia de medias tuvo un P significativo para todas las comparaciones. (P<0.0001). E. Tabla resumen de los datos de EC50, IC, 95% y R2.

5.2 Evaluación de la capacidad biológica de los clones resistentes de Leishmania braziliensis.

Estudios previos en *Leishmania* han demostrado que la adquisición de resistencia puede tener impactos diferentes en el "*fitness*" del parásito o en la capacidad de crecimiento, sobrevivencia en las células hospederas o transmisión. Se ha encontrado relación entre cambios en la cinética de crecimiento y la resistencia a medicamentos en cepas susceptibles y resistentes en *Leishmania amazonensis*, también se ha reportado un detrimento significativo en el crecimiento de cepas de *Leishmania infantum* resistentes a miltefosina (63–65)

Se evaluó el crecimiento de los clones inducidos resistentes a miltefosina de *leishmania (V.) braziliensis* en comparación con el crecimiento del clon control sin inducción de resistencia. (**Figura 5-8.)**

Para comparar el crecimiento de los clones con una menor susceptibilidad a la miltefosina se utilizó la fase exponencial de la curva de crecimiento que representa el periodo de tiempo donde los parásitos se dividen regularmente siguiendo una progresión geométrica. Se calculó la razón de crecimiento exponencial o el tiempo de duplicación poblacional que es definido como el tiempo en el que se duplica la población de parásitos, tanto para los clones como para el control sin inducción de resistencia.

Los clones 1 y 2 mostraron diferencias significativas en la fase exponencial de la curva de crecimiento, mientras que los clones 3 y 4 no mostraron diferencias significativas respecto a el control sin inducción de resistencia que presento un tiempo de duplicación poblacional de 12.79 horas. **(Figura 5-8)**

El tiempo de duplicación poblacional para el clon 1 fue de 21.27 horas y para el clon 2 de 10.58 horas, es decir una diferencia de 8.5 horas en el primer caso y una diferencia de 2.2 horas para el clon 2, aunque la tasa de crecimiento del ultimo clon es más rápida que la del control sin inducción de resistencia, la cantidad de parásitos de la curva de crecimiento del clon siempre fue más baja que del control evidenciado en la fase logarítmica y plateau de la curva de crecimiento de este clon. **(Figura 5-8)**

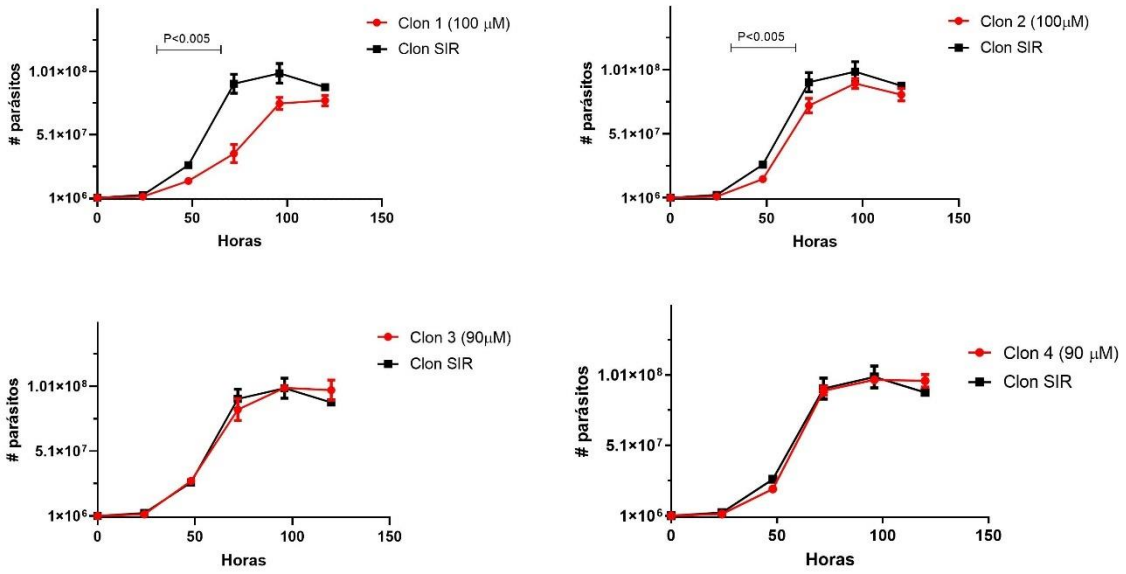


Figura 5-8: Curvas de crecimiento de clones de *Leishmania (V.) braziliensis* resistentes a miltefosina.

(Línea negra) Curva de crecimiento del clon control sin inducción de resistencia. (Línea roja). Curva de crecimiento del clon de *Leishmania (V.) braziliensis*. Entre paréntesis se señala la dosis de miltefosina a la que crecía cada clon. P valor con (P<0.005) calculado con una prueba F para diferencia de medias.

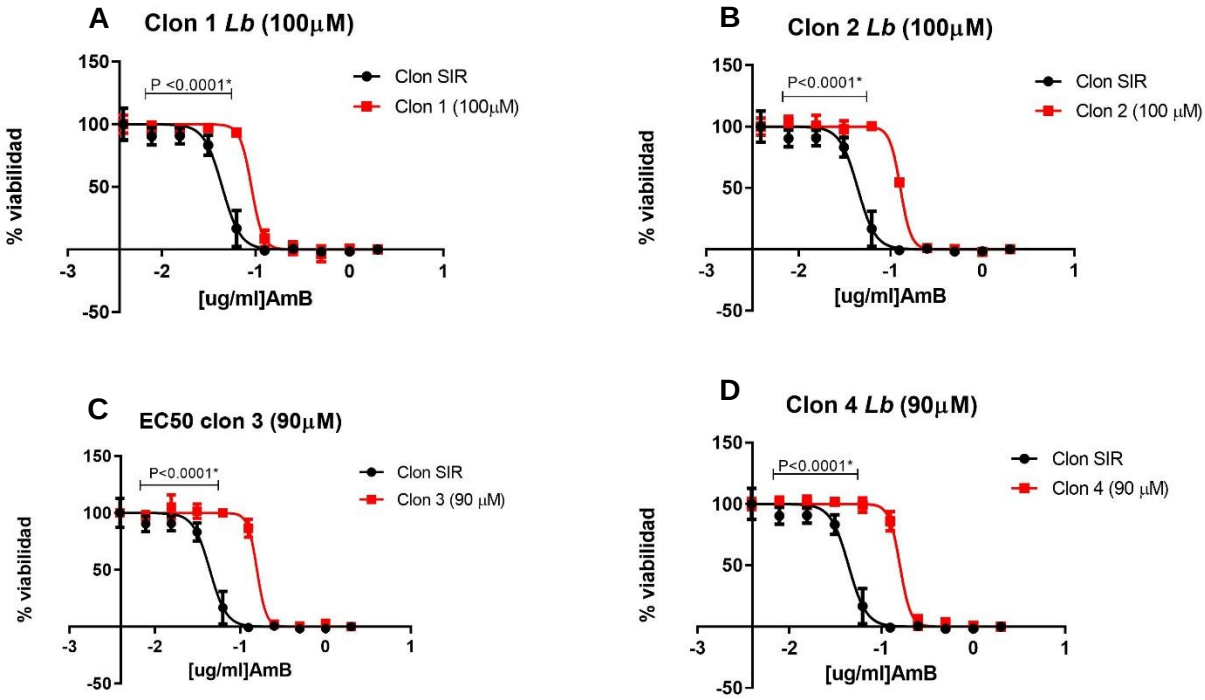
5.3 Determinación de susceptibilidad de anfotericina B de parásitos resistentes a miltefosina

En *leishmania mexicana, Leishmania major*, *Leishmania infantum y Leishmania donovani* se ha reportado la generación de resistencia a miltefosina y anfotericina b tanto en campo como en laboratorio. Adicionalmente debido al uso del tratamiento combinado de estos dos fármacos en la India se ha reportado resistencia cruzada en aislamientos de *Leishmania donovani*. (4,53,66)

Se evaluó la susceptibilidad a anfotericina b de todos los clones de *leishmania (V.) braziliensis* con una menor susceptibilidad a miltefosina.

Los cuatro clones mostraron una diferencia significativa en la dosis de EC50 comparado con el clon control sin inducción de resistencia, reflejado en el desplazamiento a la derecha

de la curva de dosis respuesta de los clones con respecto a la curva del control. La dosis efectiva 50 del clon 1 y 2 fue de 0.0902 y 0.1282 µg/ml respectivamente, los clones 3, 4 mostraron una mayor tolerancia a la anfotericina b, con una dosis efectiva 50 de 0.1573 y 0.1594 1282 µg/ml respectivamente, mientras que la dosis efectiva 50 para el clon control sin inducción de resistencia fue de 0.044µg/ml. Es decir que los clones con una susceptibilidad menor a miltefosina fueron entre 2.25 y 3.9 veces menos susceptibles a la anfotericina b. (Figura 5.7)



D

Clon	EC50 (µg/ml)	IC, 95% (µg/ml)	R^2
1	0.0902	0.0852 - 0.0955	0.9900
2	0.1282	0.1232 - 0.1333	0.9912
3	0.1573	0.1451 - 0.1707	0.9866
4	0.1594	0.1505 - 0.1688	0.9912
Control SIR	0.0440	0.0413 - 0.0469	0.9701

Figura 5-9: Susceptibilidad a anfotericina b de los clones de *Leishmania braziliensis* con inducción de resistencia a miltefosina.

Las gráficas ilustran la respuesta a anfotericina b de los clones de *Leishmania braziliensis* con inducción de resistencia a miltefosina. A. Grafica de dosis respuesta del clon 1 que crecía a una concentración de 100µM en cultivo. B. Grafica de dosis respuesta para el clon 2 que crecía a una

concentración de 100µM en cultivo. C. Grafica de dosis respuesta para el clon 3 que crecía a una concentración de 90µM en cultivo. D. Grafica de dosis respuesta para el clon 4 que crecía a una concentración de 90µM en cultivo. En todas las gráficas la línea negra representa la respuesta del clon sin inducción de resistencia. La prueba F para diferencia de medias tuvo un P significativo para todas las comparaciones. E. Tabla resumen de los datos de EC50, IC, 95% y R^2.

El mecanismo por el cual la anfotericina b y la miltefosina ejercen su efecto leishmanicida, no es completamente conocido, sin embargo, ambos involucran los esteroles presentes en la membrana de *Leishmania* y se ha evidenciado resistencia-cruzada entre estos dos fármacos en laboratorio y en aislamientos clínicos.

Ensayos realizados con secuenciamiento de alto rendimiento, han identificado múltiples determinantes de resistencia que están involucrados o relacionados con el mecanismo de acción de miltefosina y anfotericina b. En cepas de *Leishmania mexicana* resistentes a AmB se encontró una regulación a la baja de la enzima esterol C24 metil transferasa (SMT), involucrada en la vía biosintética del ergosterol, también una disminución de la expresión del transportador de miltefosina (MT), relacionado con la resistencia cruzada entre AmB y Milt. (53,67)

Otra enzima involucrada en la síntesis de esteroles es la latosterol oxidasa (LO) que se ha encontrada regulada a la baja en promastigotes de *Leishmania donovani* resistentes a paromomicina. (68)

En otro estudio realizado con RIT-seq (RNA Interference Target sequencing) se identificaron diversas flipasas de transporte de fosfolípidos incluyendo el ortólogo en *T. brucei* del transportador de miltefosina de *Leishmania* modulando la eficacia de la anfotericina b, también se identificó la proteína Vamp, como un potencial determinante de la resistencia cruzada entre AmB y Milt. (69)

Teniendo en cuenta que los clones 1-4 de *Leishmania (V.) braziliensis* resistentes a miltefosina obtenidos en este trabajo por presión de selección con el medicamento *in vitro* presentaron una menor susceptibilidad a anfotericina b se caracterizó la expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis de ergosterol: esterol C-24 metil transferasa (SMT),

latosterol oxiadasa (LO), el transportador de miltefosina (MT) y la proteína asociada a transporte vesicular (Vamp) **(Figura 5-10)**

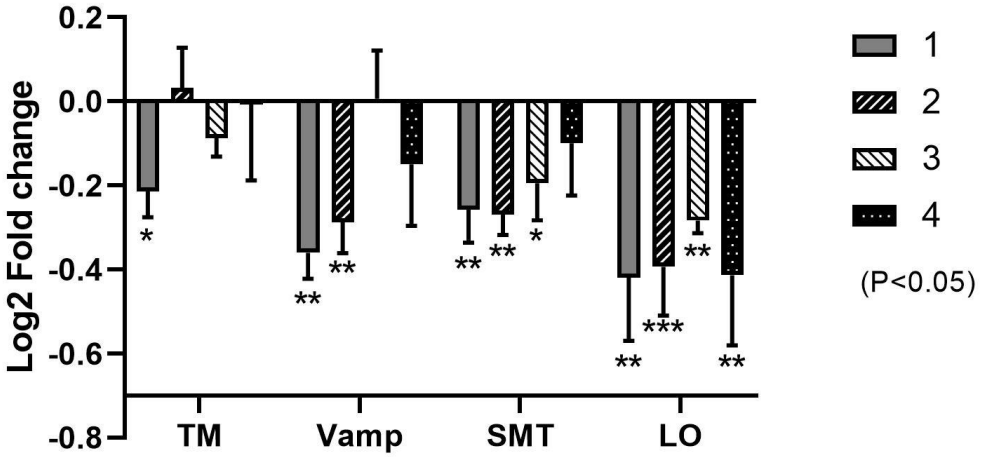


Figura 5-10: Expresión de genes en todos los clones de *Leishmania braziliensis.*

Se presenta el Log2 fold change de la expresión de TM, Vamp, SMT y LO. T student paramétrica no pareada: P valor (P<0.05)*, (P<0.002)**, (P<0.001)***.

Todos los clones presentaron una disminución significativa de los niveles de mRNA de LO, los clones 1-3 una disminución significativa de mRNA de SMT, los clones 1 y 2 de mRNA de Vamp y únicamente el clon 1 mostro una disminución significativa de mRNA a TM. **(Figura 5-10)**

A modo de resumen de las características de todos los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* inducidos resistentes a miltefosina en este trabajo, se presenta la **(tabla 5-2).**

	Nivel de susceptibilidad de los clones a AmB y MilT		Niveles de expresión respecto al control sin inducción de resistencia				Diferencias en el crecimiento	Inducción de resistencia	
Clon	**EC50 AmB (ug/ml)**	**EC50 MilT (µM)**	**TM**	**SMT**	**LO**	**VAMP**	**Crecimiento**	**Proveniente (µM)**	**Final (µM)**
1	0.0902	123.7	**ME**	**SCE**	**ME**	**ME**	**DS**	**105**	**100**
2	0.1282	143.6	**SCE**	**ME**	**ME**	**ME**	**DS**	**95**	**100**
3	0.1594	84.14	**SCE**	**SCE**	**ME**	**SCE**	**NDS**	**115**	**90**
4	0.1573	121.2	**SCE**	**ME**	**ME**	**SCE**	**NDS**	**125**	**90**
SIR	0.0440	29.17							

Tabla 5-2: Resumen de susceptibilidad a miltefosina y anfotericina B, expresión de genes y crecimiento de los clones 1-4 de *Leishmania (V.) braziliensis*.

SIR: Clon sin inducción de resistencia **TM:** transportador de miltefosina, **SMT:** esterol C-24 metil transferasa, **LO:** latosterol oxidasa, Vamp, proteina de transporte vesicular. **ME** Menor expresión. **SCE** sin cambio en la expresión **DS:** Diferencias significativas en crecimiento. **NDS:** No diferencias significativas en el crecimiento.

5.4 Determinación de susceptibilidad a miltefosina y anfotericina b de aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina.

La adquisición de resistencia a fármacos en *Leishmania*, se ha evaluado tanto experimentalmente, como en aislamientos clínicos. Particularmente en Colombia no se cuenta con información de la susceptibilidad a miltefosina o anfotericina b en los aislamientos clínicos de *Leishmania (V.) braziliensis* causante de la forma cutánea de la enfermedad y la más común en la región. En la India como se comento anteriormente se ha reportado resistencia cruzada en *Leishmania donovani*, debido al uso de un tratamiento combinado entre anfotericina b y miltefosina.

5.4.1 Curvas de crecimiento aislamientos clínicos de Leishmania braziliensis previamente expuestos a miltefosina.

El crecimiento de los aislamientos previamente expuestos a miltefosina, fue evaluado mediante una curva de crecimiento respecto a la cepa de referencia de *Leishmania braziliensis*. **Figura 5.9**

Los aislamientos clínicos A y C mostraron diferencias estadísticamente significativas en la fase exponencial de la curva de crecimiento comparados con la cepa de referencia, con P valor de 0.0036 y 0.0016 respectivamente, el tiempo de duplicación poblacional fue de 26.59 y 18.61 horas respectivamente, mientras que para la cepa de referencia fue de 17.15 horas, indicando una diferencia entre 1.46 y 9.44 horas entre los aislamientos y el cultivo de referencia. **Figura 5.9**

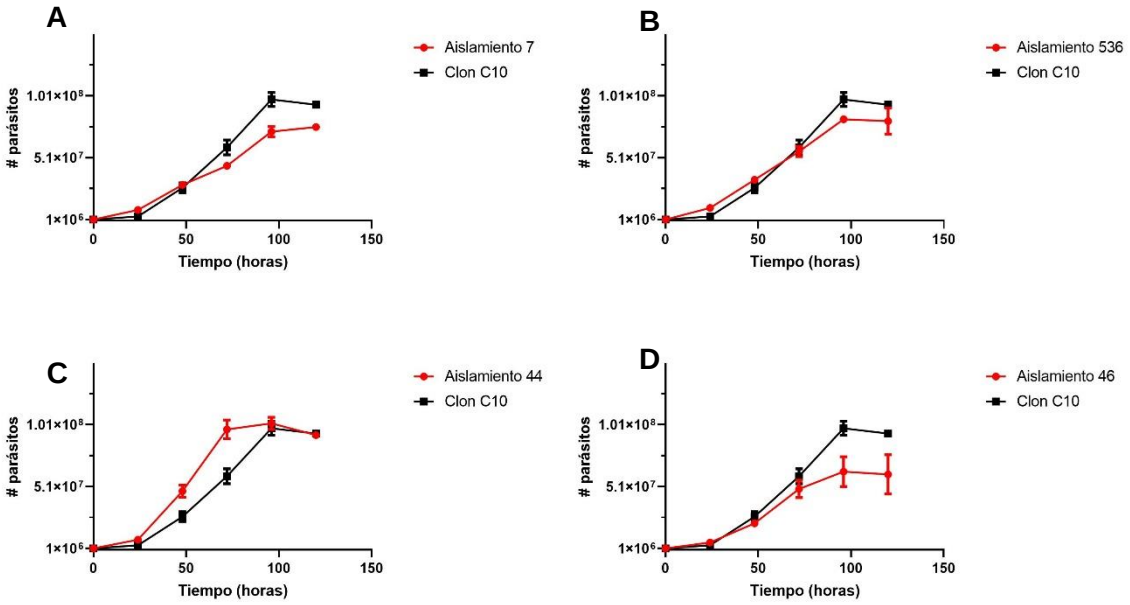


Figura 5-11: Curvas de crecimiento de aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis.*

(Línea negra) Curva de crecimiento de la cepa de referencia. (Línea roja). Curva de crecimiento del aislamiento clínico de *Leishmania braziliensis*. **A.** Curva de crecimiento del aislamiento 7 **B**. Curva de crecimiento del aislamiento 536 **C.** Curva de crecimiento del aislamiento 44 **D**. Curva de crecimiento del aislamiento 46.

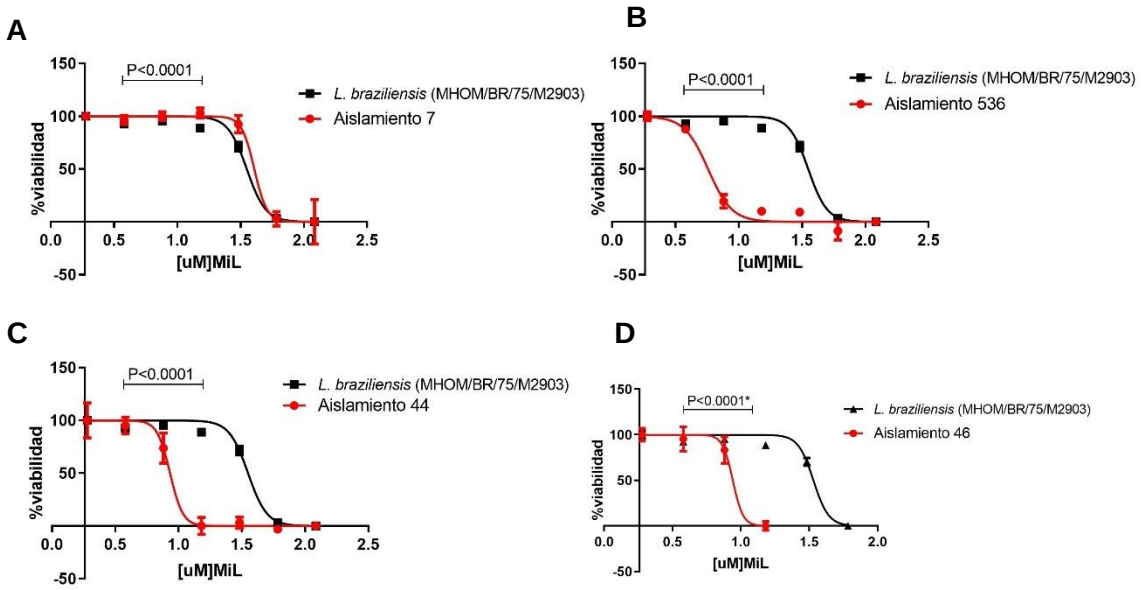
Por otra parte, los aislamientos clínicos B y D no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la fase exponencial de las curvas de crecimiento con la cepa de referencia, obteniendo un P valor de 0.0918 y 0.1510 respectivamente. El tiempo de duplicación poblacional fue de 24.39 y 18.04 horas comparado con 17.15 horas de la cepa de referencia es decir una diferencia entre 7.24 y 0.9 horas. **Figura 5-11**

5.4.2 Susceptibilidad a miltefosina de aislamientos clínicos de Leishmania braziliensis previamente expuestos a miltefosina

Los aislamientos clínicos con previa exposición a miltefosina, mostraron una susceptibilidad mixta al fármaco. Los aislamientos 536, 44 y 46 mostraron una susceptibilidad significativamente mayor a la miltefosina con dosis EC50 de: 5.729, 8.572 y 8.733µM respectivamente, comparada con el EC50 de la cepa de referencia

(MHOM/BR/75/M2903) de entre 33.94 y 35.44µM, siendo entre 3.88 y 6.18 veces menos susceptibles al medicamento. **(Figura 5-10)**

Por el contrario, el asilamiento 7 fue el único que mostro un leve aumento en la tolerancia a la miltefosina con una dosis efectiva 50 de 40.64µM, comparado con el 35.44 de la cepa de referencia, siendo aproximadamente 1.1 veces menos susceptible a la miltefosina. **(Figura 5-10)**



E

Aislamiento	EC50 (µM)	IC, 95%	R^2		EC50 (µM)	IC, 95%	R^2
7	40.64	35.06 - 47.12	0.96		35.44	33.67 -37.31	0.98
536	5.729	5.356 - 6.117	0.96	***Lb* M2903**	35.44	33.67 -37.31	0.98
44	8.572	6.969 - 10.55	0.96		35.44	33.67 -37.31	0.98
46	8.733	3.811 - 20.01	0.94		33.94	30.61 - 37.63	0.97

Figura 5-12: Susceptibilidad a miltefosina de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina.

Las gráficas ilustran la respuesta a miltefosina de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina. A. Grafica de dosis respuesta del aislamiento clínico 7, B. Grafica de dosis respuesta para el aislamiento clínico 536. C. Grafica de dosis respuesta para el aislamiento clínico 44. D. Grafica de dosis respuesta para el aislamiento clínico 46. E. Cuadro resumen con la dosis EC50, IC, 95% y el

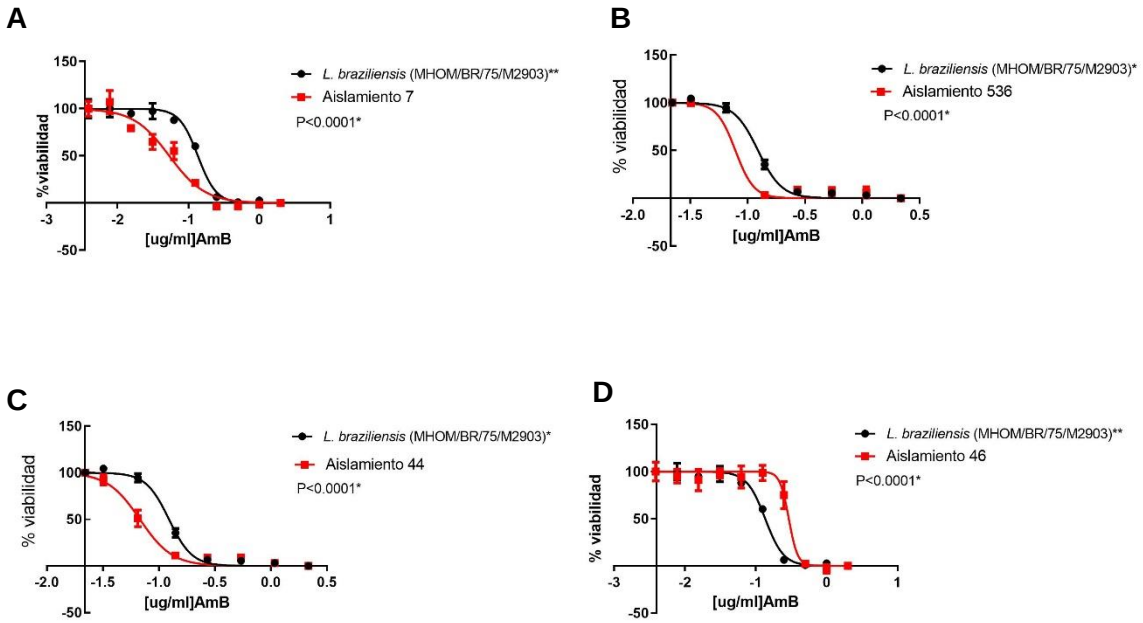
coeficiente de ajuste R^2 adicionalmente se muestran los mismos datos para la cepa de referencia. En todas las gráficas la línea negra representa a la cepa de referencia de Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903. EC50 35.44 µM (IC, 95%: 33.67 – 37.31 µM, R^2 0.98); EC50 33.94 µM (IC, 95%: 30.61 – 37.63 µM, R^2 0.97). P valor de la prueba F para diferencia de medias. Todos los aislamientos clínicos obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

5.4.3 Susceptibilidad a anfotericina b de aislamientos clínicos de Leishmania braziliensis previamente expuestos a miltefosina.

Con el ánimo de establecer si existía una mayor tolerancia a la anfotericina b por parte de los aislamientos clínicos de *Leishmania (V) braziliensis* previamente expuestos a miltefosina se evaluó la susceptibilidad a este fármaco por medio de un ensayo de viabilidad con rezasurina y se observó que la dosis efectiva 50 de los aislamientos 7, 536 44 era menor a la de la cepa de referencia MHOM/BR/75/M2903 mientras que el aislamiento 46 fue 2.2 veces más tolerante al fármaco que la cepa de referencia. **Figura 5-11**

Los aislamientos 7, 536 y 44 fueron significativamente menos susceptibles a la anfotericina b que la cepa de referencia, la dosis EC50 de estos aislamientos fue de 0.05384, 0.07816 y 0.06769 µg/ml respectivamente, mientras que la dosis EC50 de la cepa de referencia (MHOM/BR/75/M2903) se encontró entre 0.1231 y 0.1363 µg/ml. Los aislamientos fueron entre 1.57 y 2.5 veces menos susceptibles a la anfotericina b. **Figura 5-11**

El aislamiento D mostro una mayor tolerancia a la anfotericina b, siendo 2.15 menos susceptible al fármaco, con una dosis efectiva 50 de 0.2931, comparado con 0.1363 de la cepa de referencia (MHOM/BR/75/M2903). **Figura 5-11**



E

Aislamiento	EC50 (µg/ml)	IC, 95%	R2		EC50 (µg/ml)	IC, 95%	R2
7	0.05384	0.0477 - 0.0607	0.96		0.1363	0.1273 - 0.1479	0.98
537	0.07816	0.0414 - 0.1474	0.98	***Lb* M2903**	0.1231	0.1177 - 0.1287	0.99
44	0.06769	0.0621 - 0.0736	0.98		0.1231	0.1177 - 0.1287	0.99
46	0.29310	0.2661 - 0.3228	0.96		0.1363	0.1273 - 0.1479	0.98

Figura 5-13: Susceptibilidad a anfotericina b de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina.

Las gráficas ilustran la respuesta a anfotericina b de los aislamientos clínicos de *Leishmania braziliensis* previamente expuestos a miltefosina. A. Grafica de dosis respuesta del aislamiento clínico 7. B. Grafica de dosis respuesta para el aislamiento clínico 536. C. Grafica de dosis respuesta para el aislamiento clínico 44. D. Grafica de dosis respuesta para el aislamiento clínico 46. E. Cuadro resumen con la dosis EC50, IC, 95% y el coeficiente de ajuste R^2 adicionalmente se muestran los mismos datos para la cepa de referencia En todas las gráficas la línea negra representa a la cepa de referencia de Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903. (*) EC50 0.1231 µg/ml (IC, 95%: 0.1177 – 0.1287 µg/ml, R^2 0.99); (**) EC50 0.1363 µg/ml (IC, 95%: 0.1273 – 0.1459 µg/ml, R^2 0.98). P valor de la prueba F para diferencia de medias. Todos los aislamientos clínicos obtuvieron diferencias estadísticamente significativas

A modo de resumen de la susceptibilidad de los aislamientos clínicos a anfotericina b y miltefosina, se presenta la **(tabla 5-3)**

Aislamiento	EC50 MilT (µM)	MHOM/BR/75/M2903	EC50 AmB (ug/ml)	MHOM/BR/75/M2903
7	40.64	35.44	0.05384	0.1363
536	5.729	35.44	0.07816	0.1231
44	8.572	35.44	0.06769	0.1231
46	8.733	33.94	0.29310	0.1363

Tabla 5-3: Resumen de susceptibilidad a miltefosina y anfotericina b de los aislamientos clínicos de *Leishmania (V.) braziliensis* con previa exposición a miltefosina.

6. Discusión

Las opciones terapéuticas para tratar la leishmaniasis son limitadas. La primera línea incluye medicamentos derivados de antimonio pentavalente, que son efectivos en un 75% y que en cierto tipo de pacientes no son una opción terapéutica (70,71) tienen un esquema de tratamiento prolongado y han sido asociados con resistencia en especies circulantes en el viejo mundo. La segunda línea de tratamiento incluye anfotericina B o miltefosina, en la India donde se utilizan de forma combinada para tratar la forma visceral de la enfermedad se ha descrito resistencia cruzada *in vitro* entre ambos medicamentos, así mismo también se ha observado aislamientos clínicos de *Leishmania donovani* con una mayor tolerancia a anfotericina B y con falla terapéutica a miltefosina. (53,72–76)

En Colombia la segunda especie más prevalente es *Leishmania (V.) braziliensis*(77,78), asociada a la forma cutánea de la enfermedad y la cual se ha descrito con inherente baja susceptibilidad a la miltefosina(79). Consecuentemente, desde el 2005 que se introdujo el fármaco en Colombia, una serie de estudios ha evidenciado amplia tolerancia de los aislamientos clínicos de esta especie al fármaco.(79–81) La determinación de especie infectante de *Leishmania* no es una herramienta disponible para la elección del tratamiento en la práctica clínica, de tal manera es probable que cuadros cutáneos de la enfermedad, los más frecuentes en la región, sean tratados con este fármaco.

Al ser un análogo de alquil-lisofosfólipido (ALP), el mecanismo de acción de miltefosina tanto en células cancerígenas como en *Leishmania*, consiste en alterar la composición de lípidos y la fluidez de las membranas celulares, actuando como un antimetabolito en la

síntesis de fosfolípidos, bloqueando la incorporación de ácidos grasos en los fosfolípidos y la captación de colina del medio extracelular. (82)

Este efecto es concordante con lo observado en el presente trabajo durante el proceso de congelamiento-descongelamiento de los parásitos inducidos resistentes y con los de estudios en células cancerígenas de la línea HL60 tratadas con ALPs las cuales presentaron la formación de poros en la membrana, adicionalmente en esta mismas células tratadas con HPC (hexadecifosfocolina) o miltefosina se observaron alteraciones morfológicas y un desbalance en el calcio celular, indicando daños en la membrana celular. (82).

En el presente estudio no fue posible recuperar los parásitos con inducción de resistencia *in vitro* a miltefosina de *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* y los de dosis más altas de *Leishmania (V.) braziliensis* una vez habían sido crio-preservados (figura 5-3). En cuanto a las dos primeras especies, aunque la dosis de miltefosina de los congelamientos no fue tan alta como en *Leishmania (V.) braziliensis,* para la primera fueron (12, 16, 20, 24µM) y para la segunda de (14, 34, 44, 54µM) respectivamente, mientras que para *L. braziliensis* fueron de (135, 145µM)(Figura 5-5), es posible que cambios en los lípidos de membrana o en la de fluidez de esta que les estaban permitiendo crecer en presencia del fármaco, hallan ocasionado que estos parásitos no toleraran el proceso de congelamiento o el descongelamiento. Sin embargo, sería necesario un estudio del lipidoma de la membrana celular de estos parásitos para determinar la influencia de la composición lipídica en la perdida de viabilidad en el proceso de crio-preservación. Cabe resaltar que el proceso de crio-preservación es un proceso extremadamente agresivo que involucra cambios en la concentración y composición de soluciones acuosas, que generan movimiento de agua y solutos, haciendo que las células sufran cambios volumétricos donde todo el estrés mecánico se concentra en las membranas, si son cambios de volumen excesivos, pueden llegar a ser perjudiciales. (82,83)

Al igual que en el caso de *Leishmania (V.) panamensis* y *Leishmania (V.) guyanensis* en *Leishmania (V.) braziliensis* es posible que las altas dosis de miltefosina (figura 5-3) hallan ocasionando daños en la estructura de la membrana plasmática, puesto que algunos de los efectos de ALPs descritos son dependientes de la concentración del fármaco. Como se comentó en el párrafo anterior la crio-preservación es un proceso que implica el cambio de volumen de las células, esta variación de tamaño dependerá de la concentración del

criopreservante, de forma interesante en el presente estudio se observó que los descongelamientos provenientes del medio con 5% de DMSO, tenían una mejor viabilidad que los de 10% de Glicerol y 10% de DMSO (Figura 5-4),(82–85).

Además del efecto de los crio-preservantes en el contenido de solutos y de agua de la célula, también modulan propiedades de las membranas celulares (86), en células HeLa crio-conservadas con DMSO y etilenglicol se observó una relación entre estos crio-preservantes y la movilidad de los lípidos en la membrana plasmática de las células, a una mayor cantidad de esteroles en membrana una mayor viabilidad (86). Es posible que los problemas de viabilidad observados en los parásitos crio-conservados en 10% de DSMO y 10% de glicerol, pero no en 5% de DMSO (Figura 5-5) sean un resultado del efecto del DMSO en la membrana celular además del bajo contenido de esteroles causado por la inducción de resistencia a miltefosina.

Los efectos de la inducción de resistencia a miltefosina en clones de *Leishmania V. braziliensis* no fueron observados únicamente en el proceso de crio-preservación, en el presente trabajo también se observaron cambios en el *"fitness"* del clon 1 y 2 (Figura 5-8) y cambios en el perfil de expresión de genes relacionados con resistencia a ambos medicamentos (Figura 5-10).

El *"fitness"* de un parasito está relacionado con todos aquellos procesos vitales que le permiten sobrevivir, reproducirse y transmitirse. La presencia de medicamentos causa la selección de sub-poblaciones con una tolerancia mayor al fármaco, esta característica seleccionada en los parásitos, generalmente tienen un costo metabólico, es decir, que alguno de los procesos vitales puede resultar afectado en el proceso de resistir el efecto de un fármaco. (63)

Uno de los procesos vitales de *Leishmania* es la capacidad de crecimiento, por esta razón se compararon las curvas de crecimiento de los clones inducidos resistentes versus los no inducidos. (figura 5-8) Únicamente los clones 1 y 2 que son los que crecían a una mayor concentración de miltefosina (100µM) tenían diferencias significativas en el crecimiento, comparado con el control sin inducción de resistencia. (Figura 5-8)

La capacidad de crecimiento de cepas de *Leishmania* resistentes a los medicamentos es variable, en *Leishmania infantum* y *Leishmania donovani* no se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre resistentes-inducidos a paromomicina versus no inducidos, mientras que *Leishmania infantum* el resistente a miltefosina tenía un crecimiento significativamente más bajo. Otra forma de investigar el posible costo en el *"fitness"* por la ganancia de resistencia en *Leishmania* es evaluando la virulencia y la transmisión, para lo primero se evalúa la infectividad y para el segundo la metaciclogénesis, se ha encontrado un incremento en ambos procesos en aislamientos de *Leishmania donovani* resistentes a antimonio y en falla terapéutica a miltefosina, por lo tanto es importante evaluar estos dos procesos en los clones con inducción de resistencia a miltefosina de *Leishamania (V) braziliensis,* producidos en el presente trabajo y determinar el compromiso en otras procesos vitales del parasito (63,65,75,87–89).

Las causas de la falla al tratamiento y la generación de resistencia a fármacos en Leishmaniasis incluyen los factores propios a los parásitos de *Leishmania*, el hospedero y los relacionados con los medicamentos, entre los primeros se encuentran la especie infectante y la susceptibilidad intrínseca del aislamiento de *Leishmania* al fármaco. La especie *Leishmania (V.) braziliensis* se caracteriza por tener una sensibilidad menor a miltefosina inherente a la especie. Consecuentemente el EC50 determinado en el presente trabajo (Figura 5-1) para la cepa de referencia de *Leishmania (V.) braziliensis* fue de 27.02 µM mayor que el determinado para *Leishmania (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) panamensis* que fue de 14.6 y 3.125µM respectivamente, una razón para la tolerancia de *Leishmania (V.) braziliensis* a la miltefosina puede estar dada por la menor expresión del transportador del medicamento en membrana, estudios del transcriptoma en aislamientos clínicos de la especie han observado mayor expresión del transportador de miltefosina en aislamientos sensibles y menor en aislamientos tolerantes al fármaco. (90,91)

Ambos medicamentos, anfotericina B y miltefosina tienen mecanismos de acción que afectan la membrana celular y alteran la biosíntesis de esteroles (Figura 6-1), recientemente en diferentes trabajos donde se ha inducido resistencia *in vitro* hacia alguno de los dos medicamentos, se ha descrito resistencia cruzada, sugiriendo que los fármacos generan una presión de selección en los parásitos de *Leishmania* aislando características moleculares que favorecen la tolerancia a ambos fármacos. (53,67) En el presente estudio, posterior a la inducción de resistencia a la miltefosina, disminuyó la susceptibilidad de los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* de 2.8 a 4.9 veces a miltefosina (Figura5-7) y concomitantemente se observó un aumento de la tolerancia de 2 a 3.6 veces a anfotericina

B (Figura 5-9), además de una menor expresión de genes que han sido relacionados con una mayor tolerancia a cada uno de los fármacos (Figura 6-1). (Figura 5-10).

En *leishmania mexicana y Leishmania donovani*, clones resistentes-inducidos *in vitro* a anfotericina B presentaron perdida de expresión de la enzima C24- metil-transferasa (SMT) (Figura 6-1) encargada de transferir un grupo metilo en el carbono 24 en la cadena lateral de los precursores del ergosterol, de tal manera que no se detectó ergosterol, pero si una acumulación de cholesta-5,7,24-trienol en la membrana de los parásitos resistentes a este medicamento (Figura 6-1). También se documentó la perdida de la expresión del transportador de miltefosina en al menos en una de las líneas resistentes a anfotericina B acompañado de un detrimento en la sensibilidad a miltefosina. (Figura 6-1) (67,92,93)

En el presente trabajo se observó 0.2 veces menos expresión de SMT en los clones 1,2 y 3 resistentes-inducidos a miltefosina (Figura 5-10). Comparando estos resultados con el estudio de *Pountain et al* (67), uno de los clones de *Leishmania mexicana* con resistencia inducida *in vitro* a anfotericina B presentó la misma magnitud de disminución en la expresión de SMT y el aumento de la tolerancia a anfotericina B hasta de 8.4 veces y a miltefosina de 2.3 veces, mientras que en el presente estudio los clones 1, 2 y 3 tienen una reducción en la susceptibilidad de 2 a 3.6 veces a anfotericina B (Figura 5-9) y de 2.8 a 4.9 veces más a miltefosina (Figura 5-7).

Notablemente en el mismo clon resistente inducido a anfotericina B del trabajo de *Pountain et al* (67) también se encontró una deleción en el transportador de miltefosina acompañado de una disminución en la susceptibilidad a miltefosina. En el presente trabajo únicamente en el clon 1 se evidenció una disminución estadísticamente significativa del transportador de miltefosina (Figura 5-10), este clon crecía en cultivo a una concentración de 100μM del fármaco al igual que el clon 2, sin embargo, este último no presentó cambios significativos en la expresión del transportador comparado con el clon no inducido. La entrada de la miltefosina, un análogo de fosfolípidos, al medio intracelular está regulada por una flipasa perteneciente a la familia de las ATPasas y la subunidad β LdRos3, que se localizan en la membrana celular. En parásitos con una menor susceptibilidad a miltefosina la adquisición de mutaciones y la baja expresión del transportador de miltefosina han sido descritos

constantemente con relación a la resistencia a miltefosina y recientemente también visto en parásitos resistentes *in vitro* a anfotericina B (53,67,90,94).

Aunque los clones mostraron una mayor tolerancia a la miltefosina siendo 2.8 a 4.9 veces menos susceptibles (Figura 5-7), no presentaron una diferencia significativa en la expresión del transportador, a diferencia del clon 1 que es 4.2 veces menos susceptible a la miltefosina, indicando que sería necesario evaluar la aparición de mutaciones en el transportador que también se han relacionados con la baja susceptibilidad al medicamento (67,84,94,95) .

El secuenciamiento del genoma completo de *Leishmania mexicana* resistente a anfotericina B, mostro mutaciones no sinónimas en los genes de dos enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroles, 3 de las 4 líneas de *Leishmania mexicana* con inducción de resistencia a anfotericina B mostraron cambios en SMT y en una línea se describió una mutación (G415C) que marcaba la modificación de un aminoácido G139R en el gen del esterol C5 desaturasa o latosterol oxidasa, requerida para el primer paso de la remoción del grupo metilo del C4 del esterol, 2 pasos antes de la acción de SMT (Figura 6-1). La información sobre el efecto de este gen en *leishmania* es poca. Sin embargo, en hongos donde el esterol predominante en membrana es el ergosterol, al igual que en los tripanosomatidos, se ha reportado que una sola deleción en este gen puede causar alteraciones en la vía canónica de biosíntesis de ergosterol. En este trabajo todos los clones 1-4 con inducción de resistencia a miltefosina mostraron una disminución estadísticamente significativa de esta enzima (Figura 5-10) (67,96).

Las aproximaciones técnicas utilizadas para describir los mecanismos o los elementos moleculares relacionados con la resistencia en *Leishmania* registran las alteraciones fenotípicas causadas por el cambio de susceptibilidad a un fármaco y se evalúan los genes identificados como causantes del fenotipo. Recientemente, trabajos de genética reversa realizados en el genoma de *Trypanosoma brucei,* donde se utilizan librerías genómicas de RNA de interferencia (RNAi) en presencia de antimonio, paromomicina, anfotericina B y miltefosina para identificar aquellos factores cuya pérdida hacen al parasito resistente a los fármacos, se identificó a una proteína de la familia de *Vesicle-associated membrane proteins (VAMP),* denominada TbVAMP7b y al transportador tipo P-ATPasa en *T. brucei*

como factores importantes en la perdida de susceptibilidad simultánea a miltefosina y anfotericina B. (Figura 6-1) (69)

La proteína VAMP identificada hace parte de la familia SNARE, es una proteína membranal asociada a vesículas altamente conservada entre *T. brucei* y *Leishmania*(97), descrita como un determinante de susceptibilidad a la lisis causada por apolipoproteínas en *T. brucei* (98) subsecuentemente se ha descrito la importancia de la endocitosis de las apolipoproteínas APOL1 hacia el lisosoma (99) y la función de VAMP es requerida para la fusión membranal de endosoma-lisosoma. En el presente trabajo los clones 1 y 2 mostraron una disminución en la expresión del gen ortólogo en *Leishmania braziliensis* que codificaría para esta proteína; adicionalmente fueron los únicos clones que mostraron un crecimiento significativamente más bajo que el control sin inducción de resistencia, lo que concuerda con los hallazgos en *T. brucei,* donde se observó una disminución significativa en el crecimiento de los parásitos a los cuales se les realizó un "*knockdown"* de TbVamp7b (Figura 5-8). (69)

En Colombia la información sobre la susceptibilidad de los aislamientos clínicos a estos dos fármacos es poca. En un estudio del 2014 donde se describió la susceptibilidad de 6 aislamientos clínicos de *Leishmania (V.) panamensis* y *6 aislamientos de Leishmania (V) braziliensis* se encontró que luego del tratamiento con miltefosina se seleccionaba poblaciones de parásitos más tolerantes al fármaco, efecto que además se observó en una mayor supervivencia de los amastigotes intracelulares, adicionalmente se han reportado aislamientos de especies pertenecientes al sub genero *viannia* con una baja susceptibilidad a la anfotericina B. En el presente trabajo también se encontraron aislamientos de *Leishmania (V.) braziliensis* con una mayor tolerancia tanto a anfotericina B como a miltefosina, sin embargo se requieren estudios con una mayor cantidad de aislamientos para evaluar la frecuencia de la disminución en la susceptibilidad a ambos fármacos (56,100).

En el presente trabajo no se realizaron ensayos con amastigotes debido a que la dosis efectiva 50 de la linea celular pro-monocitica U937 fue de 54.51µM (Figura 5-2) , de tal manera que en la realización de un ensayo donde se determine el indice de selectividad es posible que el efecto citotoxico no sea despreciable en los macrofagos y por lo tanto el efecto leishmanicida sea bajo.

En diferentes trabajos donde se han obtenido parasitos de *Leishmania spp* resistentes inducidos a anfotericina B o a miltefosina(Tabla 5) se ha observado que los amastigotes mantienen la diferencia en la susceptibilidad contra el párasito no inducido, por lo tanto dado que el EC50 obtenido en el presente trabajo en los clones de *Leishmnia (V.) braziliensis* a miltefosina luego del proceso de inducción de resistencia fue de 84.14 a 146µM, no hubiese sido posible determinar la dosis efectiva 50 de los amastigotes de estos mismos clones dado que hubiese sido necesario aumentar la dosis de miltefosina por encima de 54.51µM la dosis EC50 para los macrofagos de la linea U937. Un inconveniente tambien descrito en el trabajo de *C. D. shaw* (84).

Esta investigación es la primera en describir el potencial para desarrollar resistencia cruzada en *Leishmania (V.) braziliensis* una de las especies del subgenero *Viannia,* entre anfotericina B y miltefosina, en promastigotes con resistencia inducida *in vitro* a este ultimo farmaco, adicionalmente tambien sugiere que se debe ampliar el tamaño de muestra de los aislamientos clinicos de esta especie para poder evaluar el perfil de susceptibilidad a miltefosina en Colombia, puesto que se observo una diminución significativa en dos de los cuatro clones evaluados en este proyecto.

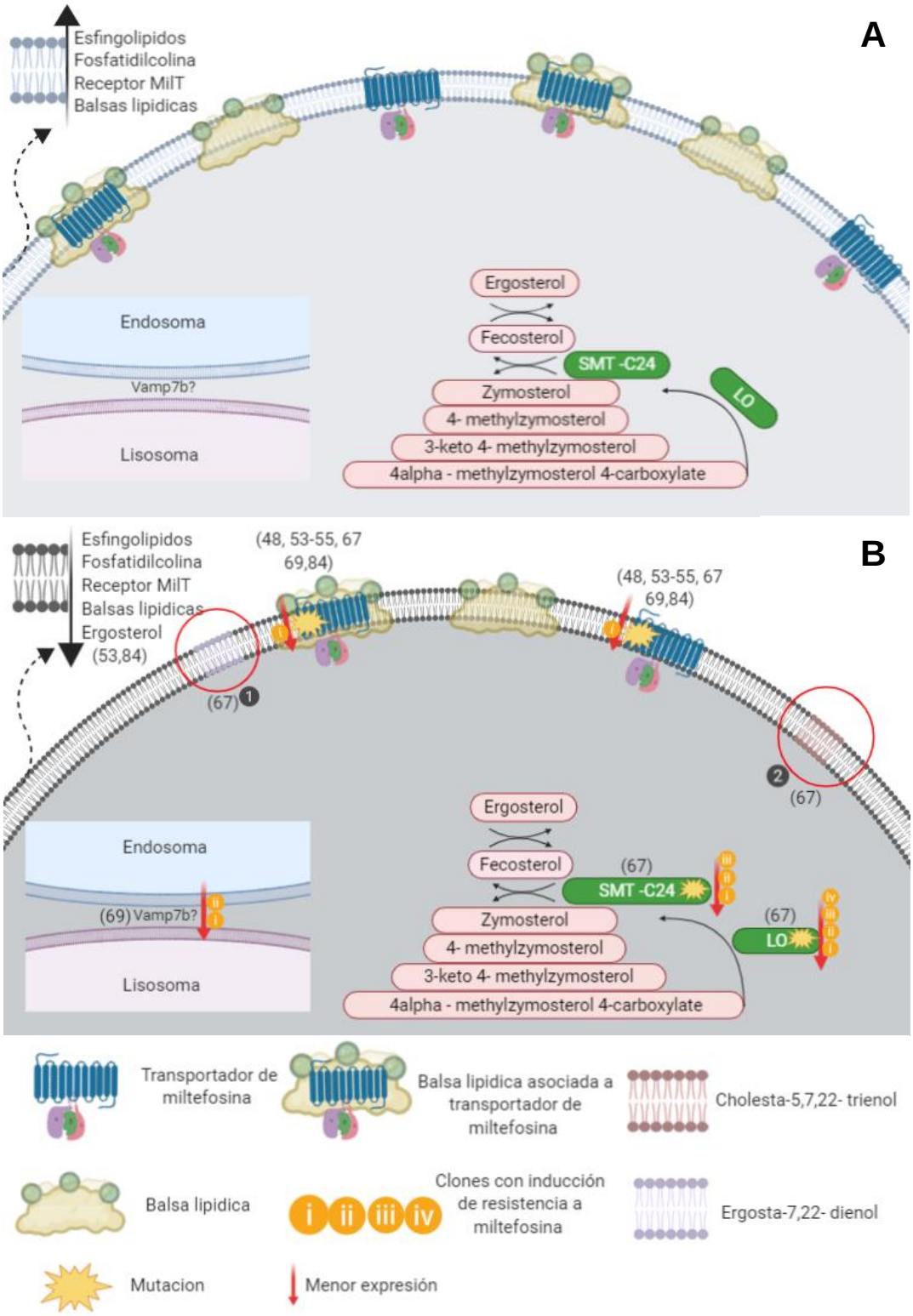

A
Esfingolipidos
Fosfatidilcolina
Receptor MilT
Balsas lipidicas
Endosoma
Vamp7b?
Lisosoma
Ergosterol
Fecosterol
SMT -C24
Zymosterol
4- methylzymosterol
3-keto 4- methylzymosterol
4alpha - methylzymosterol 4-carboxylate
LO
B
Esfingolipidos
Fosfatidilcolina
Receptor MilT
Balsas lipidicas
Ergosterol
(53,84)
(48, 53-55, 67
69,84)
(48, 53-55, 67
69,84)
(67)
(67)
(69) Vamp7b?
(67)
(67)
Transportador de miltefosina
Balsa lipidica asociada a transportador de miltefosina
Cholesta-5,7,22- trienol
Balsa lipidica
Clones con inducción de resistencia a miltefosina
Ergosta-7,22- dienol
Mutacion
Menor expresión

Figura 6-1 Cambios reportados en parásitos de *Leishmania* resistentes *in vitro* o *in vivo* a la anfotericina B o a miltefosina.

A. Diagrama de membrana celular y de ambiente intracelular de parasito de *Leishmania* con susceptibilidad silvestre o no manipulada *in vitro* a miltefosina o anfotericina B.
B. Diagrama de membrana celular y de ambiente intracelular de parasito de *Leishmania* inducido con disminución en la susceptibilidad a miltefosina o anfotericina B (mirar tabla

A modo de descripción general de la figura, los cambios que se han reportado en parásitos con un nivel de susceptibilidad bajo a anfotericina B o a miltefosina, presentan cambios en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos, en la figura se muestran la esterol metil transferasa (SMT) y la latosterol oxidasa (LO), ambas evaluadas en el presente trabajo, con una disminución significa en la expresión de la ultima en los cuatro clones inducidos resistente a miltefosina y únicamente en tres a la SMT.

En el presente trabajo también se evidencio una expresión significativamente baja de VAMP una proteína ortóloga en *Leishmania*, identificada como uno de los factores importantes en la contribución a la resistencia cruzada entre anfotericina b y miltefosina. Además de VAMP el otro factor identificado es el transportador de miltefosina, el cual se ha observado con una menor expresión en parásitos resistentes a ambos medicamentos. En el presente proyecto únicamente un clon mostro reducción significativa de este transportador.

Adicionalmente también se han descrito cambios en el perfil de lípidos y esteroles de la membrana de los parásitos, así como una menor formación de balsas lipídicas o rafts.

La grafica es de elaboración propia del autor del presente trabajo, con la información publicada por diversos autores (referencias mencionadas en la imagen y anotadas en la tabla 5) y los hallazgos realizados en esta investigación.

Tabla 4 Cambios reportados en parásitos de *Leishmania spp* resistentes a miltefosina o anfotericina B.

				Cambios reportados en parásitos de *Leishmania spp* resistentes a miltefosina o anfotericina B			
Ref.	**Especie**	**Estadio**	**Susceptibilidad**	**Enzimas**	**Lípidos**	**Transportador de miltefosina**	**Infección**
(53)	*L. infantum*	Pro	Resistente inducida a anfotericina B con resistencia cruzada a miltefosina		Incremento de Inositol fosfatilcolina, fosfatilinositol y fosfatifiletanolamina. Reducción de ergosterol y 5-dehydroespisterol y un aumento de 4-metil -8,24 colestanodiol		
(53)	*L. infantum*	Amas	Se mantuvo la resistencia inducida a anfotericina B y la resistencia cruzada con miltefosina			La introducción de copias silvestres del transportador de miltefosina resulto en una reducción de la resistencia tanto a anfotericina B como en miltefosina	Infección reducida a la mitad comparada con la contraparte no inducida, relacionada con mutaciones en el transportador de miltefosina.
(53)	*L. infantum*	Pro.	Resistente inducida a miltefosina con resistencia cruzada a anfotericina B		Incremento de Inositol fosfatilcolina, fosfatilinositol y fosfatifiletanolamina. Marcada reducción de ergosterol y un aumento del episterol	En el transportador de miltefosina se describió la mutación previamente observada: G565R asi como otras mutaciones al inicio del gen y en regiones conservadas del mismo	
(53)	*L. infantum*	Amas.	Se mantuvo la resistencia inducida a miltefosina y la resistencia				Infección reducida a la mitad comparada con la contraparte no inducida

			cruzada con anfotericina B				
(67)	*L. mexicana, L. donovani*	Pro.	Resistente inducida a anfotericina B	Menor expresión de latosterol oxidasa o C5 desaturada asi como menor expresión de esterol metil tranferasa (SMT) asociado a diferentes SNPs en la secuencia de la enzima	(97.9%) ergosta -7,22-dienol (80.4%, 86.4% y 86.5%) cholesta -5,7,22 -trienol	Deleción del transportador en uno de los clones con inducción de resistencia	Bajas tasas de infeccion en 3 de los 4 clones resistentes inducidos a anfotericina B mientras que uno aumento la infección comparado con WT
(67)	*L. mexicana*	Amas.	La resistencia a anfotericina b inducida en promastigotes no fue mantenida en amastigotes en 3 de los clones mientras que uno fue significativamente menos susceptible comparado con el WT	La disminución en la expresión de SMT fue menos pronunciada que en amastigotes			
(69)	*T. brucei*	formas presentes en sangre	*T. brucei* cultivado en presencia de miltefosina,	Los hallazgos de este trabajo indican que TbVAMP7b y el transportador tipo P-ATPasa son factores importantes en la perdida de susceptibilidad simultanea a miltefosina y anfotericina B.			

			anfotericina B, paromomicina, antimonial, luego tratado con una librería de RNAi				
(84)	*L. donovani*	Pro.	Resistente inducida a miltefosina		Disminución en la cantidad de fosfatidilcolina y de Lisofosfatidilcolina en los parasitos resistentes a miltefosina	Deleciones en el gen del transportador LdMT, además de mutaciones en un solo nucleotido y cambios en la somia	
(84)	*L. donovani*	Amas.	La resistencia inducida a miltefosina se mantuvo en los parásitos que había sido expuestos a una mayor dosis del medicamento (74µM)				
(48,54,55)	Estos estudios sugieren que los esteroles y las balsas lipídicas o *"rafts"* pueden actuar como reservorio del medicamento, para luego ser internalizado por el transportador de miltefosina.						
En el presente proyecto	*L. braziliensis*	Pro.	Resistente inducida a miltefosina	Se observo una disminución significativamente más baja de la latosterol oxidasa en todos los clones resistentes inducidos a miltefosina, mientras que para la esterol metil		Únicamente se observó una disminución estadísticamente significativa de uno de los clones con inducción de resistencia a miltefosina	

				transferasa se observó en 3			

7.1 Conclusiones

- Se generaron parásitos de *Leishmania spp,* con resistencia inducida *in vitro* a miltefosina. Se alcanzo una disminución de 2.8 a 4.9 veces en la susceptibilidad a miltefosina de los cuatro clones de *Leishmania (V.) braziliensis*.
- Se observaron diferencias significativas en la capacidad biologica de dos de los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* con inducción de resistencia a miltefosina, evaluada en términos de crecimiento de los parásitos versus los parásitos sin inducción de resistencia.
- Se observó una disminución en la susceptibilidad a anfotericina B de 2 a 3.6 veces en los clones de *Leishmania (V.) braziliensis* con inducción de resistencia *in vitro* a miltefosina.
- Los aislamientos clínicos presentaron una susceptibilidad mixta tanto a la anfotericina B como a la miltefosina. La susceptibilidad a miltefosina fue menor para el aislamiento 7 en comparación con la cepa de referencia MHOM/BR/75/M2903, mientras que la susceptibilidad del aislamiento 46 fue menor a la anfotericina B igualmente comparado con la cepa de referencia MHOM/BR/75/M2903.
- Se observó la disminución en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos. En todos los clones la expresión de la latosterol oxidasa fue significativamente más baja comparada con el clon sin inducción de resistencia, mientras que la expresión de la enzima esterol metil transaferasa fue significativamente más baja únicamente en tres de los clones. Adicionalmente también se observo una disminución significativa de Vamp en dos de los clones y en uno del transportador de miltefosina.

7.2 Recomendaciones

Para emprender investigaciones similares en el futuro y teniendo en cuenta el principal obstáculo técnico que se presentó en la investigación y que fue descrito a lo largo de los resultados, se sugiere seguir los cultivos de resistencia de una manera continua para evitar la pérdida de los parásitos inducidos durante del proceso de crio congelamiento en los parásitos.

Adicionalmente se requiere realizar un análisis de lipidoma de los clones obtenidos en el presente trabajo, pues como se nombró en la discusión es necesario determinar la influencia de la inducción de resistencia a miltefosina en el cambio del perfil de lípidos en la membrana plasmática. Así mismo en otros trabajos se ha descrito la adquisición de mutaciones en el transportador de miltefosina que también contribuyen a la resistencia cruzada entre los dos medicamentos, dado que en este trabajo se encontró una reducción en la susceptibilidad a anfotericina B luego de la inducción de resistencia a miltefosina, acompañado de la menor expresión del transportador de miltefosina en uno de los clones, sería necesario realizar un análisis del genoma y del transcriptoma de todos los clones generados en la presente investigación para determinar otros cambios a nivel genético que estén contribuyendo a la disminución de la susceptibilidad.

Se sugiere ampliar la muestra de los aislamientos clínicos de parásitos pertenecientes al subgénero *Viannia*, pues en este trabajo se determino una menor susceptibilidad a cada uno de los fármacos en dos de los cuatro aislamientos evaluados comparados con la cepa de referencia de *Leishmania (V) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903.

Bibliografía

1. Bañuls, A.-L., M. Hide and FP. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. 2007 [cited 2017 Jul 7];64:1–458. Available from: https://www.mivegec.ird.fr/images/stories/PDF_files/0013.pdf
2. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT CE et, Al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990;42:206–14.
3. Echeverry, Maria Clara Jenny Gaona Narvaez, Sandra Milena Gualtero Trujillo et al. Guía de atención de la leishmaniasis. Med y Lab. 2011;17(11–12):553–75.
4. Croft SL, Sundar * Shyam, Fairlamb and AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Rev. 2006;111–126.
5. Perez-Franco J, Cruz-Barrera M, Robayo M et al. Clinical and parasitological features of patients with American cutaneous leishmaniasis 1that did not respond to treatment with meglumine antimoniate. PLoS Negl Trop Dis. 2016;(Accepted for publication.).
6. Dumetz F, Cuypers B, Imamura H, Zander D, D'Haenens E, Maes I, et al. Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in Leishmania donovani on the Indian Subcontinent . mSphere. 2018 Apr 18;3(2):e00548-17.
7. Rugani JN, Gontijo CMF, Frézard F, Soares RP, Do Monte-Neto RL. Antimony resistance in leishmania (Viannia) braziliensis clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019 Jul 1;114(7).
8. Fernandez-Prada C, Sharma M, Plourde M, Bresson E, Roy G, Leprohon P, et al. High-throughput Cos-Seq screen with intracellular Leishmania infantum for the discovery of novel drug-resistance mechanisms. IJP Drugs Drug Resist [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 7];8:165–73. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.03.004
9. Hendrickx S, Guerin PJ, Caljon G, Croft SL, Maes L. Evaluating drug resistance in

visceral leishmaniasis: The challenges. Parasitology. 2018 Apr 1;145(4):453–63.

10. Ponte-Sucre A. Introduction: Leishmaniasis -- The Biology of a Parasite. In: Ponte-Sucre A, Diaz E, Padrón-Nieves M, editors. Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 1–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_1
11. Campino L, Maia C. The Role of Reservoirs: Canine Leishmaniasis. In: Ponte-Sucre A, Diaz E, Padrón-Nieves M, editors. Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 45–64. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_3
12. D. Sereno, P. Holzmuller JLL. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of Leishmania infantum. Acta Trop. 2000;74:25–31.
13. Protección. GDCM de S y, INS IN de S, Alimentaria D general de salud y seguridad. Boletín Epidemologico Semanal. 2019;
14. Instituto Nacional de Salud – Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Boletin epidemiologico semanal. 2016;Número 52:103–5.
15. Echeverry, M.C. et al. Guía de atención de la leishmaniasis. 2007;175-213.
16. Novais PS and FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev | Immunol. 2016;1–12.
17. Carlos Gustavo Vieira de Morais, 1, 2 Ana Karina Castro Lima 1, Rodrigo Terra, 1, 3 Rosiane Freire dos Santos, 2 4, Silvia Amaral Gonçalves Da-Silva 4 and Patrícia Maria Lourenço Dutra1. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection. Biomed Res Int. 2015;
18. Louis Maes, Raquel Andreia Inocencio da Luz PC, Yardley and V. Classical Versus Novel Treatment Regimens. Drug Resist Leishmania Parasites. 2013;301–15.
19. Vásquez L, Scorza Dagert JV, Scorza JV, Vicuña-Fernández N, de Peña YP, López S et al. Pharmacokinetics of experimental pentavalent antimony after intramuscular administration in adult volunteers. Curr Ther Res Clin Exp. 2006;67(3):193–203.
20. HC M. Drug resistance in visceral leishmaniasis. Drug Resist Visc leishmaniasis.

2010;61(75):21.

21. Carlos E. Muskus MMV. Metaciclogénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania. Biomédica. 2002;22.
22. Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB. Ultrastructural biology of Leishmania (Viannia) panamensis (=Leishmania braziliensis panamensis) in Lutzomyia gomezi (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1989 Jan [cited 2017 Nov 27];40(1):19–39. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2916730
23. Ralph Lainson. The Neotropical Leishmania species a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;1:13–32.
24. Alexa Kaufer1*, John Ellis1 DS and JB. The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasit Vectors. 2017;10(287):1–17.
25. P.A. Bates and M.E. Rogers. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. Curr Mol Med. 2004;4:601–9.
26. SACKS DL. Metacyclogenesis in Leishmania Promastigotes. Exp Parasitol. 1989;69:100–3.
27. Schlein Y RH. Leishmania major and L. donovani: effects on proteolytic enzymes of Phlebotomus papatasi (Diptera, Psychodidae). Exp Parasitol. 1986;62(3):376–80.
28. Guillermo Arango Duque and Albert Descoteaux. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2015 [cited 2017 Sep 1];26:32–40. Available from: http://ac.els-cdn.com.ezproxy.unal.edu.co/S1369527415000508/1-s2.0-S1369527415000508-main.pdf?_tid=646feda4-8f6c-11e7-bcdf-00000aab0f27&acdnat=1504308316_81679cdc767f6454fcf37a40f4495263
29. Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, et al. Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. Cell Immunol [Internet]. 2016 Nov [cited 2017 Sep 2];309:7–18. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874916300624
30. Olivier Séguin AD. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. Cell Immunol [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 1];309:1–6. Available from: http://ac.els-cdn.com.ezproxy.unal.edu.co/S0008874916300764/1-s2.0-

S0008874916300764-main.pdf?_tid=41481f5e-8f6c-11e7-a88f-00000aab0f02&acdnat=1504308257_412b00527029f9b0fdf9bfd2f397b7cb

31. Handman E. Cell Biology of Leishmania. In 1999 [cited 2017 Jul 6]. p. 1–39. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08602298
32. Scott PK& P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011;9:604–15.
33. Kai Zhang1, 2 and SMB. Phospholipid and sphingolipid metabolism in Leishmania. Mol Biochem Parasitol. 2010;55(170(2)):1–22.
34. Denny PW, Smith DF. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. Molecular Microbiology. 2004.
35. Bouazizi-Ben Messaoud H, Guichard M, Lawton P, Delton I, Azzouz-Maache S. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of Leishmania donovani Complex Promastigotes into Amastigotes. Lipids. 2017;52:433–41.
36. Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. Biochem Biophys Res Commun. 2011;416:7–12.
37. Palacios DS, Dailey I, Siebert DM, Wilcock BC, Burke MD. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2011;108(17):6733–8. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1015023108
38. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2012 Feb 14 [cited 2017 Oct 28];109(7):2234–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308411
39. Thomas M Anderson, Mary C Clay, Alexander G Cioffi, Katrina A Diaz GSH, Marcus D Tuttle, Andrew J Nieuwkoop, Gemma Comellas, Nashrah Maryum1 SW, Brice E Uno, Erin L Wildeman, Tamir Gonen CMR& MDB. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. Nat Chem Biol. 2014;
40. Leprohon P, Fernandez-Prada C, Gazanion É, Monte-Neto R, Ouellette M. Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania. Int J Parasitol Drugs Drug Resist [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Sep 3];5(1):26–35. Available

from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320714000281

41. Patricia Escobar, Sangeeta Matu, Cla´udia Marques SLC. Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH3 (edelfosine) and amphotericin B. Acta Trop. 2002;81:151–7.
42. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, et al. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates ofLeishmania donovani. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:1030–41.
43. Cohen B. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. Int J Pharm [Internet]. 1998 [cited 2017 May 20];162(1):95–106. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517397004171
44. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M. Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 1998;
45. Jiménez-López JM, Ríos-Marco P, Marco C, Segovia JL, Carrasco MP. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. Lipids Health Dis [Internet]. 2010 Mar 25 [cited 2017 May 20];9:33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338039
46. Center for Tropical Medicine and Travel Medicine, Division of Infectious Diseases, Academic Medical Center U of A, Amsterdam TN, Department of Pharmacy and Pharmacology SHNCI, Amsterdam TN, Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), Geneva S. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2576–2597.
47. Barratt G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. Curr Drug Metab [Internet]. 2009 Mar [cited 2017 May 20];10(3):247–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442087
48. Gamarro F, Sánchez-Cañete MP, Castanys S. Mechanisms of Miltefosine Resistance in Leishmania. In: Drug Resistance in Leishmania Parasites [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2013 [cited 2017 May 20]. p. 351–79. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7091-1125-3_17
49. Diomede L, Piovani B, Modest EJ, Noseda A, Salmona M. Increased ether lipid cytotoxicity by reducing membrane cholesterol content. Int J Cancer. 1991;49(3):409–13.

50. García-Hernández R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. Leishmania donovani develops resistance to drug combinations. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2012 [cited 2017 Sep 4];6(12):e1974. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285310
51. Fernández OL, Diaz-Toro Y, Ovalle C et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of Leishmania Viannia species and populations in regions of high transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:8:e2871.
52. Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant Leishmania donovani Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2017 May 20];49(7):2677–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980336
53. Fernandez-Prada1 C, Vincent1¤ IM, Brotherton1 M-C, Roberts2 M, Roy1 G, Rivas3 L, et al. Different Mutations in a P-type ATPase Transporter in Leishmania Parasites are Associated with Cross-resistance to Two Leading Drugs by Distinct Mechanisms. PLoS Negl Trop Dis. 2016;1–20.
54. Saint-Pierre-Chazalet M, Ben Brahim M, Le Moyec L, Bories C, Rakotomanga M, Loiseau PM. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2017 May 20];64(5):993–1001. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749205
55. Van Der Luit AH, Budde M, Ruurs P, Verheij M, Van Blitterswijk WJ. Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. J Biol Chem. 2002 Oct 18;277(42):39541–7.
56. Franco-Muñoz C, Manjarré S-Estremor M, Ovalle-Bracho C. Intraspecies differences in natural susceptibility to amphotericine B of clinical isolates of Leishmania subgenus Viannia. 2018 [cited 2020 Feb 5]; Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196247
57. Bezerra-Souza A, Yamamoto ES, Laurenti MD, Ribeiro SP, Passero LFD. The antifungal compound butenafine eliminates promastigote and amastigote forms of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis.

Parasitol Int [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Oct 26];65(6 Pt A):702–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546158

58. Nieto-Meneses R, Castillo R, Hernández-Campos A, Maldonado-Rangel A, Matius-Ruiz JB, Trejo-Soto PJ, et al. In vitro activity of new N-benzyl-1H-benzimidazol-2-amine derivatives against cutaneous, mucocutaneous and visceral Leishmania species. Exp Parasitol [Internet]. 2018 Jan [cited 2019 Oct 26];184:82–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191699
59. Espada CR, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, De Araújo Pereira LI, De Carvalho EM, Machado PR, et al. Susceptibility to miltefosine in Brazilian clinical isolates of Leishmania (Viannia) braziliensis. Am J Trop Med Hyg. 2017;96(3):656–9.
60. Fernández O, Diaz-Toro Y, Valderrama L, Ovalle C, Valderrama M, Castillo H, et al. Novel approach to in vitro drug susceptibility assessment of clinical strains of Leishmania spp. J Clin Microbiol. 2012 Jul;50(7):2207–11.
61. Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH 3 (edelfosine) and amphotericin B. Acta Trop [Internet]. 2002;81:151–7. Available from: www.parasitology-online.com
62. Louis Maes, Paul Cos SLC. The relevance os susceptibility tests, breakpoints and markers. Drug Resist Leishmania Parasites. 2013;407–29.
63. Alicia Ponte-Sucre, Emilia Diaz MP-N. The concept of fitness and drug resistance in Leishmania. Drug Resist Leishmania Parasites. 2013;431–49.
64. Hendrickx S, Beyers J, Mondelaers A, Eberhardt E, Lachaud L, Delputte P, et al. Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in Leishmania infantum. [cited 2020 Feb 4]; Available from: https://academic.oup.com/jac/article-abstract/71/7/1914/1751521
65. García-Hernández R, Gómez-Pérez V, Castanys S, Gamarro F. Fitness of Leishmania donovani Parasites Resistant to Drug Combinations. 2015;
66. Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA. Production and Characterization of Stable Amphotericin-Resistant Amastigotes and Promastigotes of Leishmania mexicana. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2017 May 20];49(8):3274–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048936
67. Pountain AW, Weidt SK, Regnault C, Bates PA, Donachie AM, Dickens NJ, et al.

Genomic instability at the locus of sterol C24-methyltransferase promotes amphotericin B resistance in leishmania parasites. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Feb 1;13(2).

68. Verma A, Bhandari V, Deep DK, Sundar S, Dujardin JC, Singh R, et al. Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in Leishmania donovani. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2017 Dec 1;7(3):370–7.
69. Collett CF, Kitson C, Baker N, Steele-Stallard HB, Santrot M-V, Hutchinson S, et al. Chemogenomic Profiling of Antileishmanial Efficacy and Resistance in the Related Kinetoplastid Parasite Trypanosoma brucei. 2019 [cited 2020 Feb 3]; Available from: https://doi.org/10.1128/AAC
70. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. Clin Infect Dis [Internet]. 2008 Jan 15 [cited 2020 Feb 13];46(2):223–31. Available from: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/524042
71. Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC AN V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis—a systematic review with a meta-analysis. Int J Dermatol. 2008;47:109– 124.
72. Srivastava P, Prajapati VK, Rai M, Sundar S. Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. J Clin Microbiol [Internet]. 2011 Aug [cited 2017 May 20];49(8):3088–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613432
73. Rahman M, Ahmed BN, Faiz MA, Chowdhury MZU, Islam QT, Sayeedur R, et al. Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg. 2011 Jul;85(1):66–9.
74. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. Vol. 16, Expert Opinion on Pharmacotherapy. Informa Healthcare; 2015. p. 237–52.
75. Rai K, Cuypers B, Bhattarai NR, Uranw S, Berg M, Ostyn B, et al. Relapse after treatment with Miltefosine for visceral Leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting Leishmania donovani strain. MBio. 2013 Nov 1;4(5).
76. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C S-CG,

Ramirez L et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. Clin Infect Dis. 2008;46:223–231.

77. Salgado-almario J, Ovalle-bracho C. Geographical distribution of Leishmania species in. 2019;278–90.

78. Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia : A Longitudinal Study of the Natural History , Prevalence , and Incidence of Infection and Clinical Manifestations. :699–708.

79. Obonaga R, Fernández OL, Valderrama L, Rubiano LC, Castro MDM, Barrera MC, et al. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by leishmania subgenus viannia species. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jan;58(1):144–52.

80. Fernández OL, Diaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of Leishmania Viannia Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5).

81. Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. Clin Infect Dis [Internet]. 2004 May 1 [cited 2020 Feb 14];38(9):1266–72. Available from: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/383321

82. Steglitz K. ANALOGS OF ALKYLLYSOPHOSPHOLIPIDS : CHEMISTRY , EFFECTS ON THE MOLECULAR LEVEL AND THEIR CONSEQUENCES FOR NORMAL AND MALIGNANT. 1995;66(95):39–82.

83. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Preserv Hum Oocytes From Cryobiol Sci to Clin Appl. 2009;368:12–24.

84. Shaw CD, Lonchamp † J, Downing † T, Imamura ‡ H, Freeman † T M, Cotton JA, et al. In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of Leishmania donovani from Nepal: genomic and metabolomic characterization.

85. Revisión A DE, Mábel Ávila-Portillo L, Madero JI, López C, Fernanda León M, Acosta L, et al. Fundamentos De Criopreservación. Rev Colomb Obstet Ginecol [Internet]. 2006;57(4):291–300. Available from: http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf

86. Id JH. Modification of cellular membranes conveys cryoprotection to cells during

rapid, non-equilibrium cryopreservation. 2018 [cited 2020 Feb 17]; Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205520

87. Hendrickx S, Beyers J, Mondelaers A, Eberhardt E, Lachaud L, Delputte P, et al. Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2016 Jul [cited 2020 Feb 4];71(7):1914–21. Available from: https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkw096
88. Hendrickx S, Leemans A, Mondelaers A, Rijal S, Khanal B, Dujardin J-C, et al. Comparative Fitness of a Parent Leishmania donovani Clinical Isolate and Its Experimentally Derived Paromomycin-Resistant Strain. 2015;
89. Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, Sundar S, Speybroeck N, Kestens L, et al. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant Leishmania donovani clinical lines. Parasitology. 2011;138(11):1392–9.
90. Sánchez-Cañete MP, Carvalho L, Javier Pérez-Victoria F, Gamarro F, Castanys S. Low Plasma Membrane Expression of the Miltefosine Transport Complex Renders Leishmania braziliensis Refractory to the Drug. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(4):1305–13.
91. Espada CR, Magalhães RM, Cruz MC, Machado PR, Schriefer A, Carvalho EM, et al. Investigation of the pathways related to intrinsic miltefosine tolerance in Leishmania (Viannia) braziliensis clinical isolates reveals differences in drug uptake. 2019 [cited 2020 Feb 11]; Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.02.005
92. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M. Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 1998 Feb [cited 2017 May 20];42(2):352–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527785
93. Nakagawa Y, Umegawa Y, Takano T, Tsuchikawa H, Matsumori N, Murata M. Effect of sterol side chain on ion channel formation by amphotericin b in lipid bilayers. Biochemistry [Internet]. 2014 May 20 [cited 2020 Feb 11];53(19):3088–94. Available from: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi500122c
94. Laffitte MCN, Leprohon P, Légaré D, Ouellette M. Deep-sequencing revealing mutation dynamics in the miltefosine transporter gene in Leishmania infantum

selected for miltefosine resistance. Parasitol Res [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Feb 9];115(10):3699–703. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00436-016-5195-y

95. Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites. J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23766–75.

96. Aires B. Genetic Profiling of the Isoprenoid and Sterol Biosynthesis Pathway Genes of Trypanosoma cruzi. 2014;9(5).

97. Murungi E, Barlow LD, Venkatesh D, Adung'a C, VO, Dacks JB, Field MC, et al. A comparative analysis of trypanosomatid SNARE proteins. Parasitol Int [Internet]. 2014 [cited 2020 Feb 16];63:341–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.11.002

98. Currier 1¤ RB, Cooper A, Burrell-Saward H, Macleod A, Alsford S. Decoding the network of Trypanosoma brucei proteins that determines sensitivity to apolipoprotein-L1. 2018 [cited 2020 Feb 16]; Available from: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006855

99. Vanwalleghem G, Fontaine F, Lecordier L, Tebabi P, Klewe K, Nolan DP, et al. ARTICLE Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. Nat Commun [Internet]. 2015 [cited 2020 Feb 16];6. Available from: www.nature.com/naturecommunications

100. Obonaga R, Fernández OL, Valderrama L, Rubiano LC, Castro MDM, Barrera MC, et al. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by leishmania subgenus viannia species. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):144–52.