



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**LEISHMANIASIS CUTÁNEA EXPERIMENTAL:
EFECTO DEL ANTIBIÓTICO CATIÓNICO
ESTEROIDEO CSA-13 SOBRE LA EVOLUCIÓN
DE LAS LESIONES.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Maria de Los Angeles
Montilla Matos como requisito
parcial para optar al título de
Licenciada en Biología.

Tutoras: Lic. Melcenia Moreno N.
Prof. Vicenza Cervino

Caracas, Venezuela
Mayo – 2011

AGRADECIMIENTOS

Cuando emprendí este camino, no tenía la menor idea de lo que implicaba ser científico, sólo quería involucrarme con el mundo de los genes, clonar y ser ucevista. Hoy, me siento orgullosa de la carrera que elegí; la cual no es solo clonar, “ni dibujar planticas” (como dicen por ahí), es un mundo que explica cada detalle del día a día y cada comportamiento del ser vivo.

Es por ello, que agradezco principalmente a Dios por abrirme los caminos y por cada experiencia que viví a lo largo de este tiempo, que me han convertido en la bióloga que soy hoy en día, pero sin olvidar que el principal granito de arena de este logro, son mis padres, quienes incondicionalmente me han brindado todo su apoyo y han hecho hasta lo imposible para que logre todas mis metas. Gracias por levantarme cuando fue necesario en esta carrera de resistencia y sobre todo por soportar mis berrinches, noches de rumba y mis llantos, sin ustedes no hubiese podido... Los AMO infinito.

Agradezco a mi familia por siempre confiar en mí y alentarme a cada momento, a mi segunda mama, sí, tu madrina, GRACIAS por querer darme siempre todo lo mejor y por siempre estar pendiente de mis necesidades. Ahh y por cada librito aportado a mi carrera.

A mi abuela por ser mi cómplice y amiga siempre... TE AMO.

A mi tutora, por ser madre, amiga y “compinche”; mil gracias por todo lo que me enseñaste y por toda la paciencia que siempre tuviste a lo

largo de este Trabajo Especial de Grado, el cual sabemos que no fue nada fácil... Gracias también al profesor Martin Sánchez por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al personal del bioterio, principalmente a Atacho, Fidel y Andrés, gracias por ayudarme con mis ratoncitos y por acompañarme cada domingo y día feriado de experimentos.

A Erika Aguilar por llevar a cabo el estudio hematológico de este trabajo y a Nadia Milani por toda la ayuda prestada tanto en el bioterio como a nivel académico.

A Dennis Lugo y a Roberto Fernandes (“teto”) por controlar mi fobia ante la estadística de esta tesis. También a compañeros y personal de biomedicina que estuvieron ahí durante la realización de este estudio.

A la Profesora Lorena Marquéz por motivarme a estudiar Biología y por siempre tener las puertas abiertas cada vez que recurrí a ella tanto académico como personalmente. Mil gracias profe ¡

También quiero recordar que los amigos han sido parte esencial de este trabajo; sin ellos no hubiese recobrado las fuerzas para continuar en determinados momentos.

Gracias a mi gocho por toda la ayuda incondicional que me ha brindado en toda la carrera y por todas esas decisiones firmes que me ha hecho tomar. Te debo un mundo Amigo mío!

A mis amiguitas y amiguitos de siempre, Dile, Danita, mi Ga, Marce, Yezna, Fredxi, Karlita, Ingrid, Vero, Ana T, Felaquito, Totolo, Jarito y a mi garu bello. Gracias infinitas por siempre estar ahí cuando más los necesite y por levantarme en el momento preciso. LOS ADORO ¡!

Y como olvidar a mis compu amiguitos, quienes resolvían mis problemas con las computadoras y me hacían drenar en cada momento de estrés generado por mi tesis. Gracias a mi papi papi por su amistad e incondicionalidad durante estos 7 años y a tavito por apoyarme siempre, los quiero un montón!

Finalmente agradezco toda la experiencia aprendida durante la realización de este trabajo y al crecimiento personal adquirido. A “mi señora bella” por guiarme y al “brujo” por estar a mi lado en los momentos más difíciles de esta tesis, por enseñarme que nada debe desviarnos de la meta y que en la vida, hay q establecer prioridades para lograr nuestros objetivos... tenías razón ... soy una DURA... LO LOGRE ¡!!

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de alta incidencia en los países tropicales. En los últimos años se ha evidenciado una disminución en la eficacia de las drogas empleadas para su tratamiento, debido al desarrollo de resistencia por parte del parásito a estas drogas y a la elevada toxicidad que estas inducen en el paciente. Por lo tanto, es necesario trabajar en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con actividad leishmanicida, contra los cuales el parásito no desarrolle resistencia, que sean de bajo costo y que no produzcan efectos secundarios severos en el paciente. En este sentido, se planteó evaluar en un modelo murino experimental susceptible a la leishmaniasis cutánea, el efecto del CSA-13 sobre la evolución de las lesiones. Para ello se procedió a infectar ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad con 10^3 amastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* (MHOM/BZ/BEL21) aislados de lesiones cutáneas de hámster. A la semana 3 post-infección se aplicó el CSA-13 (4, 8, 16, 32, 54, 72, 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día) subcutáneamente, intralesional. Se empleó como tratamiento control Miltefosina (2×10^4 ng/gr peso/día) durante 21 días consecutivos. La respuesta al tratamiento se evaluó midiendo semanalmente el tamaño de la lesión cutánea mediante morfometría digital y estimación de la carga parasitaria a través de la técnica de diluciones limitantes, adicionalmente se evaluó la influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* y se realizaron análisis de química sanguínea. Se observó disminución en el tamaño de las lesiones cutáneas en el grupo de ratones infectados y tratados con 4, 8, 16 y 32 ng/gr peso/día; mientras que en los grupos infectados y tratados con 54, 72, 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día, se observó incremento en el tamaño de las lesiones. El CSA-13 incrementó el tamaño de la almohadilla plantar en los ratones no infectados. Los efectos observados del CSA-13 a 54 y 5×10^3 ng/gr peso/día, sobre el tamaño de la lesión y la carga parasitaria, en los ratones infectados con *L. (L.) mexicana* son debido al DMSO. El DMSO no incrementó el tamaño de la almohadilla plantar de los ratones no infectados con *L. (L.) mexicana*. El CSA-13 no tiene influencia sobre el peso de los ratones BALB/c y altera los niveles sanguíneos de transaminasas, amilasa y glicemia de los ratones BALB/c, lo que compromete la función hepática y pancreática de estos animales experimentales.

INDICE

Contenido	Páginas
Introducción.....	1
Antecedentes.....	15
Objetivos.....	18
Metodología.....	19
Diseño experimental.....	19
Ratones.....	21
Parásitos.....	22
Infección de los ratones con amastigotes de <i>Leishmania (L.) mexicana</i>	22
Aplicación de los tratamientos.....	22
Medición del grosor de la lesión cutánea mediante morfometría digital.....	23
Estimación de la carga parasitaria de las lesiones cutáneas	24
Análisis estadístico.....	25
Resultados.....	26
Medición del grosor de la lesión cutánea mediante morfometría digital.....	26
Estimación de la carga parasitaria de las lesiones cutáneas	36
Discusiones.....	50
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58
Web consultadas	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación gráfica del ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	5
Figura 2: Representación esquemática de la infección de los ratones, aplicación del tratamiento y obtención de tejido durante el periodo de estudio.....	21
Figura 3: Medición del grosor de las lesiones cutáneas en la almohadilla plantar mediante morfometría digital.....	24
Figura 4: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 4 y 8 ng/gr peso/día.....	28
Figura 5: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 8 y 16 ng/gr peso/día.....	30
Figura 6: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 32, 54 y 72 ng/gr peso/día.....	33
Figura 7: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día.....	35
Figura 8: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con <i>L. (L.) mexicana</i> , mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 4 y 8 ng/gr peso/día.....	37
Figura 9: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con <i>L. (L.) mexicana</i> , mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 8 y 16 ng/gr peso/día.....	39
Figura 10: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con <i>L. (L.) mexicana</i> , mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 32, 54 y 72 ng/gr peso/día.....	41

Figura 11: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con <i>L. (L.) mexicana</i> , mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día.....	43
Figura 12: Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con <i>L. (L.) mexicana</i> . Dosis aplicadas de CSA-13: 4 y 8 ng/gr peso/día.....	45
Figura 13: Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con <i>L. (L.) mexicana</i> . Dosis aplicadas de CSA-13: 32, 54 y 72 ng/gr peso/día.....	46
Figura 14: Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con <i>L. (L.) mexicana</i> . Dosis aplicadas de CSA-13: 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de química sanguínea de ratones BALB/c no infectados tratados con CSA-13. Dosis aplicadas: 8 y 16 ng/gr peso/día..... 48

Tabla 2: Valores de química sanguínea de ratones BALB/c no infectados tratados con CSA-13. Dosis aplicadas: 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día..... 49

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una patología que comprende un conjunto de enfermedades causadas por parásitos intracelulares pertenecientes al género *Leishmania*; cuya localización es intracelular, específicamente en macrófagos, ocasionando diferentes manifestaciones clínicas, las cuales son: Leishmaniasis Cutánea Localizada, Leishmaniasis Cutánea Difusa, Leishmaniasis Cutánea Intermedia, Leishmaniasis Mucocutánea y Leishmaniasis Visceral (Kala-azar). Todas estas enfermedades son transmitidas a través de la picadura de insectos de los géneros *Phlebotomus sp.* (Viejo mundo) y *Lutzomyia sp.* (Nuevo mundo), distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales del planeta.

La Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) es causada, entre otras especies, por *Leishmania mexicana* y *Leishmania major*. Las lesiones desarrolladas pueden formar úlceras cutáneas caracterizadas por una inflamación con macrófagos cargados de parásitos, lo cual conlleva a la formación de un tejido granulomatoso y necrótico (Leiby y col., 1994). Ocasionalmente, las lesiones no se ulceran y se transforman en una placa infiltrada o atrófica. La LCL tiende a la curación espontánea entre 6 y 12 meses, excepto cuando se localiza en el pabellón auricular, donde se vuelve crónica y mutilante (Tanimoto, 2007).

La Leishmaniasis Cutánea Intermedia (LCI) es causada por *Leishmania* del subgénero *Vianna*. Se caracteriza por incluir formas mucocutáneas, verrugosas y recaídas secundarias en donde la respuesta inmune es exacerbada. Presenta un granuloma con características similares al de la forma localizada, pero con menos diferenciación epitelial y más alteraciones a nivel de la epidermis (Díaz y col., 2002).

La Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) es causada por *Leishmania mexicana* y *Leishmania tropica*, está asociada con metástasis de las lesiones cutáneas iniciales (Leiby y col., 1994) y se caracteriza por presentar una anergia selectiva en la inmunidad celular del individuo afectado, con la presencia de nódulos no ulcerados, ricos en parásitos y a menudo diseminados por toda la superficie cutánea (Chaudhary y col., 2008). En este tipo de manifestación clínica, el parásito invade todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal y de los genitales externos (Tanimoto, 2007).

La Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) es una enfermedad del Nuevo Mundo causada por *Leishmania braziliensis*, con una alta hipersensibilidad retardada y una respuesta proliferativa de linfocitos (Marsden, 1986). Se caracteriza por la invasión y destrucción por parte del parásito de las membranas nasofaríngeas (Tanimoto, 2007). Las lesiones son crónicas y necróticas, con pocos parásitos o macrófagos presentes. La patología resulta de una respuesta inmunitaria mediada

por células, con reacciones de hipersensibilidad a antígenos de *Leishmania* (Leiby y col., 1994).

La Leishmaniasis Visceral o Kala Azar (LV) es causada por las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum/chagasi* (Leiby y col., 1994). En la LV el parásito invade órganos internos (bazo, hígado y médula ósea), lo cual trae consecuencias usualmente fatales si no es tratada (Mendoza-León y col., 1996). La sintomatología más común es la presencia de fiebre crónica irregular, malestar general, pérdida de peso, anorexia, tos seca, diarrea, descamación, palidez de membranas, hepatomegalia y esplenomegalia (Tanimoto, 2007).

Las especies del género *Leishmania* son miembros del Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida y Familia Trypanosomatidae. Son organismos unicelulares, con núcleo definido y un Kinetoplasto; este último es un paquete de ADN que corresponde a entre el 10-20 % del ADN total del parásito (Liew y col., 1993).

El género *Leishmania* presenta dos estadíos en su ciclo evolutivo, el amastigote que es intracelular en los hospedadores vertebrados y el promastigote que se multiplica tanto en el aparato digestivo de los flebotominos vectores como en los medios de cultivo. Dicho ciclo, se caracteriza por ser de tipo diheteroxeno (Figura 1), en él participan un hospedador vertebrado, representado por diversos mamíferos, entre ellos el hombre, y un hospedador invertebrado, los insectos hematófagos

de la familia Psychodidae: *Phlebotomus sp.* y *Lutzomyia sp.*, los cuales cuando se alimentan de sangre, ingieren tanto células del hospedador, como amastigotes libres, que provienen de células rotas como consecuencia de la distensión ocasionada por los parásitos en multiplicación o por efecto traumático de la probóscide del insecto, durante la picadura. Dentro del intestino del insecto, los macrófagos se lisan liberando los amastigotes, los cuales se caracterizan por presentar una forma ovoide o esférica, miden de 2 a 6 μm de largo por 1.8 a 4 μm de ancho, poseen núcleo redondo, el Kinetoplasto en forma de bastón y no tienen flagelo libre. (Bonfante y Barroeta, 2002)

Posteriormente a la liberación de los amastigotes, dentro del intestino del insecto, estos se transforman en promastigotes, los cuales a diferencia del amastigote, se caracterizan por presentar forma fusiforme, miden aproximadamente de 15 a 20 μm de largo por 2 a 4 μm ancho (Bonfante y Barroeta, 2002), presentan un núcleo ovoide y un flagelo que emerge del extremo anterior del cuerpo (Mendoza-León y col., 1996). Los promastigotes comienzan a replicarse por fisión binaria y se adhieren al epitelio intestinal donde continúa su replicación logarítmicamente. En esta fase los parásitos son denominados promastigotes procíclicos, los cuales no son infectivos para el hospedador vertebrado. Al cabo de 4 – 7 días los promastigotes presentan cambios morfológicos y modulan la expresión de moléculas implicadas en la virulencia (Muskus y Marín, 2002), desarrollando así, formas infectantes o metacíclicas en el intestino medio del vector,

posteriormente se trasladan hacia la faringe y probóscide del insecto. Cuando los promastigotes son introducidos en el hospedador, éstos son fagocitados por macrófagos, se transforman en amastigotes y comienzan a multiplicarse por fisión binaria (killick-Kendrik y Molineux, 1981; Leiby y col., 1994; Rey, 2001). En unos días, los amastigotes migran a muchas partes del cuerpo donde son liberados e ingeridos por células fagocíticas fijas (macrófagos residentes), en el caso de las especies que causan Leishmaniasis Visceral, migran a la médula ósea, bazo e hígado. Consistentemente los amastigotes infectan células fagocíticas circulantes o de las capas superficiales de la piel donde son tomados por otro insecto vector durante su alimentación (Marquardt y col., 2000).

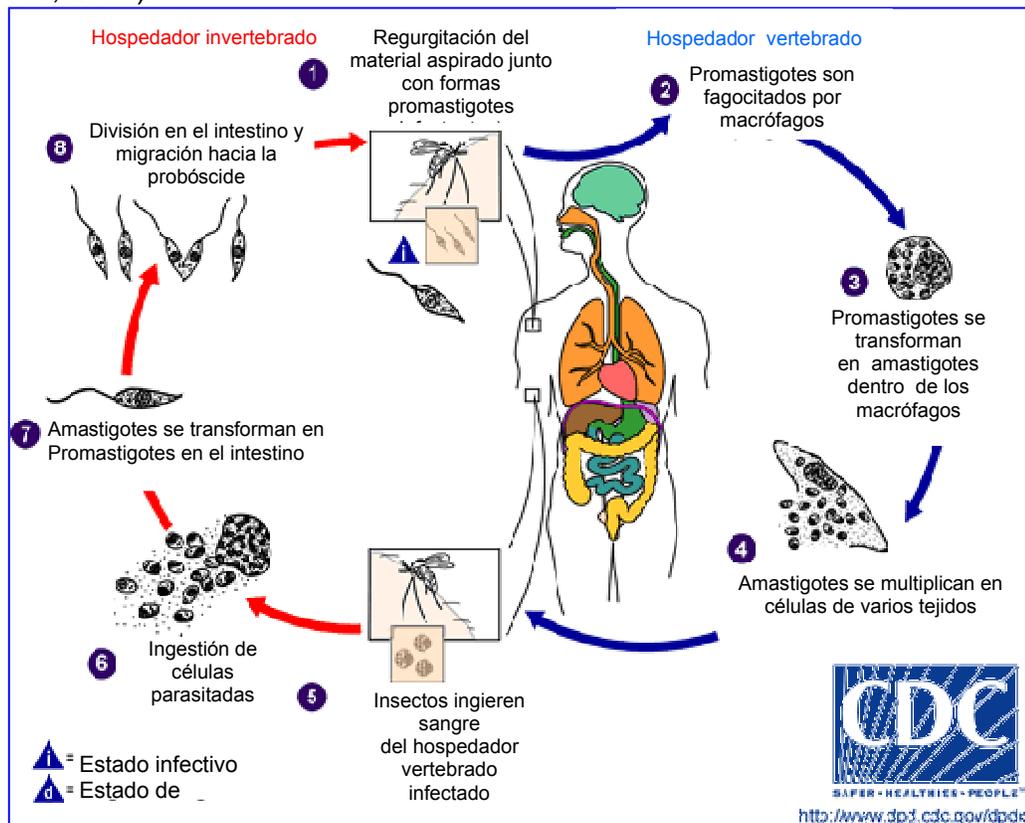


Figura 1: Representación gráfica del ciclo de vida de *Leishmania sp.*

Tomado de www.dpd.cdc.gov/dpdx.

Para estudiar las diferentes manifestaciones clínicas producidas por la infección por *Leishmania*, se han establecido modelos muridos experimentales. Los roedores son los hospedadores naturales más frecuentes de *Leishmania* en la región neotropical, lo cual es una evidencia biológica para considerar a los modelos muridos como ejemplares en estudios *in vivo* de la leishmaniasis. Los inventarios faunísticos en estudios de leishmaniasis indican que las familias Echimyidae, Cricetidae y Muridae son las más representativas (Reyes y Arrivillaga, 2009).

Las cepas de ratones (*Mus musculus*) BALB/c y C57BL/6 son los modelos experimentales frecuentemente utilizados para el estudio de la leishmaniasis. El fenotipo BALB/c es más susceptible inmunológicamente a la infección por *Leishmania*, dado que desarrollan lesiones cutáneas crónicas y progresivas, parecidas a las presentadas en la LCD, a diferencia del fenotipo C57BL/6, los cuales desarrollan lesiones cutáneas que se resuelven espontáneamente, simulando las desarrolladas en la LCL.

En la Leishmaniasis Cutánea murida, el control de la infección causada por las especies de *Leishmania*, depende del desarrollo de células T efectoras, capaces de inducir actividad microbicida en los macrófagos. Por otra parte, en algunos modelos de infección la

resistencia y la susceptibilidad a *Leishmania* se ha correlacionado al tipo de respuesta inmunitaria desarrollada por los linfocitos T CD4+. La respuesta inmunitaria tipo Th1 y Th2, difiere en los patrones de producción de citocinas, lo cual está asociado con las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis (Mosmann y col., 1986; Sánchez, 2000). La respuesta inmunitaria tipo Th1 es importante para controlar la infección con *Leishmania*. Los ratones C57BL/6 desarrollan una respuesta inmunitaria tipo Th1, en donde la expresión de iNOS es importante como mecanismo de eliminación de *L. (L.) mexicana*; mientras que ratones BALB/c desarrollan una respuesta inmunitaria Th2 predominante (Sánchez, 2000).

La leishmaniasis en Venezuela presenta, como en el resto del continente, una distribución de carácter focal, con transmisión activa en las regiones geográficas donde circula el parásito. De esta forma la leishmaniasis es clásicamente considerada como una enfermedad selvática, peri-selvática, rural y solo secundariamente de carácter suburbano y urbano. En nuestro país han sido notificados 50.108 casos de LC entre los años 1988-2008, con un promedio de 2.388 casos por año, de este total 98,5% correspondían a la forma Cutánea Localizada (LCL), 0,84% de Leishmaniasis Mucosa (LM), 0,50% de Leishmaniasis Cutáneo Intermedia (LCI) y 0,16% de Leishmaniasis Cutáneo Difusa (LCD) (Instituto de Biomedicina. Dpto. Informática, 2009).

Para el tratamiento de la Leishmaniasis se han usado numerosos medicamentos y medidas terapéuticas de diversa índole. En 1915 Di Cristina y Caronia emplearon el Tártrato doble de antimonio y potasio con el fin de tratar la LV; observándose que este compuesto reduce la letalidad de la enfermedad y modifica sustancialmente su pronóstico (Bonfante y Barroeta, 2002). Desde entonces se vienen usando los compuestos orgánicos tri y pentavalentes de antimonio, comprobándose que los últimos son mejor tolerados por el paciente y menos tóxicos (Bonfante y Barroeta, 2002). De los antimoniales pentavalentes, los más utilizados son el antimonio de N-metilglucamina (Glucantime®) y el estiboglunato sódico (Pentostan®). Los antimoniales pentavalentes actúan sobre los amastigotes, inhibiendo enzimas de la vía glicolítica, de la vía oxidativa de los ácidos grasos (Berman, 1988) y disminuyendo la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) y del guanosin difosfato (GDP), con lo cual reducen la síntesis macromolecular y la viabilidad de las leishmanias (Soto, 1995). La droga más utilizada en Latino América para el tratamiento de la LC es el Glucantime®, pero se reportan recidivas y en algunos casos, se producen efectos colaterales como manifestaciones tóxicas, artrialgias, mialgias, anorexia, náuseas, vómitos, cefaleas, urticarias, entre otros.

La vía de administración de las sales antimoniales pentavalentes debe ser parenteral: intramuscular o intravenosa, aplicada en una sola dosis. Cabe destacar que no debe ser utilizada la vía intradérmica

(intralesional); ya que puede ocasionar recidivas (Bonfante y Barroeta, 2002).

Apartando su toxicidad, los antimoniales han sido efectivos y han estado disponibles en regiones endémicas. Para mantener su efectividad se ha incrementado la concentración y duración del tratamiento sobre los años; ya que se ha evidenciado que el parásito ha estado adquiriendo mutaciones lentamente, con el fin de disminuir la susceptibilidad a la droga. La resistencia de leishmania a los tratamientos ha sido reportado en el sur de Europa, en Irán, en Suramérica y al noroeste de la India (Fasel y Myler, 2008). Las evidencias sugieren que la resistencia adquirida a los antimoniales pentavalentes por leishmania depende de la transformación de compuestos pentavalentes a compuestos trivalentes, la formación de un conjugado con thiol intracelular y a la presencia de transportadores ABC, los cuales usan la energía liberada durante la hidrólisis de ATP para mover iones y otras moléculas en contra de un gradiente de concentración (Arana y col., 1998; Lira y col., 1999).

Cuando los pacientes no presentan mejorías al ser tratados con los fármacos mencionados anteriormente, se emplean otros medicamentos, como Anfotericina B (AnB) y Pentamidina, los cuales producen efectos secundarios considerables pero con menor toxicidad; sin embargo su alto costo impide su uso generalizado en los países en desarrollo (Luque-Ortega y col., 2003).

El mecanismo de acción de la AnB se basa en la unión de la molécula de AnB al ergosterol presente en la membrana celular de hongos o protozoarios, esto produce un agregado que da origen a un canal transmembrana por el cual se libera el contenido citoplasmático, lo cual conlleva a la muerte celular (Laniado-Laborín y col., 2009).

La administración de la AnB es principalmente por vía parenteral, otras formas de administración pueden ser a través de cremas, lociones, colirios, soluciones por inhalación o nebulización, entre otras. Este tratamiento está indicado cuando fracasan los antimoniales pentavalentes, y en especial en las complicaciones mucosas de la leishmaniasis; aparte de generar grandes efectos colaterales y tener alto costo, con AnB se ha observado cierta resistencia del parásito al igual que con los antimoniales. Entre los efectos secundarios producidos por la AnB, se encuentran: nefrotoxicidad, fiebre, escalofríos, tromboflebitis y efectos hematológicos (López, 2000).

Por otra parte, la Pentamidina, sustancia orgánica que posee dos grupos amidina o guanilo, es tripanocida y leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo* y se utiliza para el tratamiento de la LV resistente a los antimoniales; sin embargo se ha reportado que en la India, el parásito se ha vuelto resistente a dicho tratamiento (Bonfante y Barroeta, 2002).

Existen otras estrategias terapéuticas disponibles contra la leishmaniasis, como es el tratamiento con Miltefosina, el primer

medicamento de leishmaniasis de preinscripción oral en el mercado, lo cual elimina la necesidad de hospitalización para la administración intravenosa de otros medicamentos (Croft y Enjel, 2006; Cedeño y col., 2009). La Miltefosina aparece, representando un avance importante en el tratamiento de la LV y la LC, a pesar de sus características teratogénicas, las cuales limitan su uso durante el embarazo (Serrano-Martín y col., 2009).

La Miltefosina, inicialmente fue desarrollada como un agente antitumoral, posteriormente se demostró *in vitro* su efecto leishmanicida contra *Leishmania donovani*. Basándose en esto, se desarrollaron estudios en la India para medir la efectividad contra La LV y se demostró que en adultos la Miltefosina tiene alta efectividad para controlar la enfermedad. El modo de acción de este tratamiento no está precisado; sin embargo, está asociado con cambios en el metabolismo de lípidos y biosíntesis de fosfolípidos. En el estadio promastigote del parásito, se ha observado que la Miltefosina puede inducir apoptosis (Fasel y Myler, 2008).

Se ha reportado que la tasa de parásitos resistentes es muy baja, aunque puede estar progresando rápidamente (Croft y col., 2006). Otros estudios han revelado que en *Leishmania donovani* existe una correlación entre la resistencia y la reducción en la acumulación de la Miltefosina. La dosis recomendada de esta droga en adultos es de 2,5 mg/Kg/día por 28 días (Pérez y col., 2003).

Paralelamente a los tratamientos antes mencionados, se han evaluado otros medicamentos contra la leishmaniasis, dado que esta representa un problema de salud pública a nivel mundial por su alta incidencia en regiones endémicas. Entre estos tratamientos podemos encontrar: Paromicina, Nifurtimox, Metronidazol, Clofazimina, Pamoato de Cicloguanilo, Alopurinol, Ketaconazol, Itraconazol, Levamizol y Fenotiazinas.

Actualmente muchas investigaciones se han enfocado en el uso de compuestos derivados de plantas como posibles agentes terapéuticos contra la leishmaniasis. Se ha demostrado que los alcaloides de *Galipea longiflora* (Evanta) causan una reducción en el tamaño de las lesiones en ratones infectados con *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania venezuelensis* (Calla, 2009). Estudios *in vitro* sugieren que extractos derivados de plantas como *Raputia heptaphylla* (Granados y col., 2009), *Xylopiya discreta* (Delgado y col., 2009) y *Esembeckia alata* (Muñoz y col., 2009), presentan actividad leishmanicida.

Con respecto a las terapias se practica cirugía, criocirugía, termoterapia, termocirugía, fototerapia, crioterapia e inmunoterapia; esta última se ha realizado basándose en los resultados obtenidos en los pacientes con lepra (Convit y col., 1988). En este estudio se utilizó un procedimiento similar para el tratamiento de la LCL usando una mezcla de

BCG con promastigotes muertos de *L. amazonensis*. El método de la inmunoterapia fue comparado con el de la quimioterapia que utiliza el Glucantime[®], observándose que salvo las cicatrices que dejan los puntos de la inoculación, no produce los efectos de los antimoniales pentavalentes (Bonfante y Barroeta, 2002). En Venezuela se utiliza principalmente la inmunoterapia y Glucantime[®] como tratamiento de primera línea (Departamento de informática, Instituto de Biomedicina, 2009).

Dada la alta incidencia de la enfermedad en nuestro país, los esfuerzos se enfocan en la búsqueda de otros tratamientos alternativos como: Glibenclamida (Gb), Amiodarona y Sales de Arylisoquinolinium. La Glibenclamida es un inhibidor de canales de K + ATP y P-glicoproteína, se ha demostrado que estos canales inhiben la infección y la multiplicación *in vitro* de *Leishmania mexicana* en los macrófagos (Ponte-Sucre y col., 1998). Posteriormente se evidenció que la Glibenclamida reduce la tasa de crecimiento de las lesiones cutáneas en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana*. La combinación de Glibenclamida y Glucantime[®] aumentó el efecto leishmanicida tanto *in vitro* como *en vivo* (Serrano-Martin y Col., 2009).

Es importante resaltar los estudios realizados con la droga antiarrítmica Amiodarona, la cual es eficaz contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, actúa tras la interrupción de la homeostasis de los niveles de calcio intracelular, específicamente en las

mitocondrias y en los acidocalcisomas del parásito (Serrano-Martín y col., 2009); también se ha reportado la eficacia de las Sales de Arylisoquinolinium como leishmanicida, sales que tienen una alta capacidad de acumulación y precipitación en los organelos intracelulares, ocasionando la formación de una gran vacuola que promueve la lisis celular (Ponte-Sucre y col., 2010).

Es una necesidad a nivel mundial el trabajar en la búsqueda de nuevas drogas con actividad leishmanicida que sean de bajo costo, que no produzcan efectos secundarios severos en el paciente, que sean de fácil administración y que no desarrollen resistencia parasitaria; en este sentido se ha planteado evaluar en el modelo experimental de la Leishmaniasis Cutánea el efecto del Antibiótico Catiónico Esteroideo 13 (CSA-13) sobre la evolución de las lesiones.

ANTECEDENTES

Los Antibióticos Catiónicos Esteroideos (CSAs) también conocidos como Cerageninas, son compuestos sintéticos anfífilos (presentan una cara hidrofóbica y otra hidrofílica), que se caracterizan por presentar grupos de aminoácidos conectados a una red de esteroides, tienen rápida actividad bactericida y habilidad de permeabilizar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La selectividad celular de los CSA está directamente relacionada a la afinidad de estos compuestos por el lípido A, el cual es un componente de las bacterias como *Escherichia coli*. El efecto de los CSA es similar al de los péptidos antimicrobianos endógenos. Estudios previos sugieren que estos compuestos poseen un amplio espectro de actividad contra bacterias resistentes a diversos antibióticos, tales como *Acinetobacter baumannii* (Gram-negativa) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-positiva).

Los factores que contribuyen al mecanismo de acción de estos agentes están en estudio (Li y col., 1999; Schmidt y col., 2001; Scott y col., 2002; Díaz y col., 2004; Ding y col., 2004; Epanand y col., 2008).

Los CSAs se caracterizan por mostrar dos tipos de actividad antibacteriana. La primera es una actividad letal; mientras que, la segunda actividad es no letal, lo que sugiere la permeabilización de la membrana de bacterias Gram-negativas, sensibilizándolas contra la acción de los antibióticos hidrofóbicos, los cuales son incapaces de atravesar la

membrana (Savage, 2002). Considerando que estos compuestos tienen actividad sobre las membranas celulares, es poco probable que surjan organismos resistentes al antibiótico.

Resultados no publicados obtenidos por nuestro grupo, han evaluado el efecto de CSA-8 y CSA-13 sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* y *Leishmania infantum/chagasi* en cultivo, observándose que el CSA-8 tiene un mayor efecto leishmanicida sobre *Leishmania infantum/chagasi* y CSA-13 sobre *L. (L.) mexicana* con un efecto dosis/tiempo dependiente; se observó el 51,9% de promastigotes vivos de *L. infantum/chagasi* al ser incubados con 10 µg/ml de CSA-8 (tanto a las 2 como a las 24 horas), mientras que en presencia del CSA-13 el 50% (2 horas de incubación) y el 7,4% (24 horas de incubación) de los parásitos sobrevivieron a 20 µg/ml. Por otra parte, *L. (L.) mexicana* mostró 80% de supervivencia a 40µg/ml de CSA-8, y 16,7% a 20µg/ml de CSA-13 (2hrs), ambos CSA causaron la muerte de *L. (L.) mexicana* a altas concentraciones (80 µg/ml). Posteriormente se reportó el efecto de CSA-8 sobre la proliferación de promastigotes de *L. infantum/chagasi*, determinándose que este compuesto a bajas dosis (5µg/ml) puede inhibir la multiplicación del parásito. Al estudiar el efecto de estos CSA sobre la viabilidad de macrófagos J774A.1 se observó 31% células viables al ser tratadas con 40µg/ml de CSA-8 y 15% a 20µg/ml de CSA-13. En cuanto a la acción de los CSA sobre macrófagos infectados con promastigotes de *L. infantum/chagasi* y *L. (L.) mexicana*, se evidenció una disminución en el número de células infectadas con *L. infantum/chagasi* (18.6%) y *L. (L.)*

mexicana (23.8%) al ser tratadas con CSA-8 (10µg/ml) y CSA-13 (2.5µg/ml) respectivamente, lo que sugiere que los CSA podrían representar una herramienta para el desarrollo de nuevas drogas contra la leishmaniasis en el hospedador vertebrado (Chirinos y col., 2007; Chirinos y col., 2008; Sánchez y col., 2009).

Se ha sugerido que el CSA-13 puede ser un agente quimioterapéutico contra los tripanosomátidos, debido a que se evidenció que este compuesto es eficaz contra promastigotes de *Leishmania major* y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Lara y col., 2010).

Basándonos en estas evidencias nos propusimos evaluar el efecto del Antibiótico Catiónico Esteroideo (CSA-13) sobre la evolución de las lesiones en el modelo murino experimental de la Leishmaniasis Cutánea, causada por *Leishmania mexicana*, en ratones BALB/c.

OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar el efecto del Antibiótico Catiónico Esteroideo (CSA-13) sobre la evolución de las lesiones en un modelo murino experimental susceptible a la Leishmaniasis Cutánea.

ESPECÍFICOS:

1. Determinar los cambios en la evolución del tamaño de las lesiones cutáneas en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*, posterior a la aplicación del tratamiento mediante medición del grosor de la almohadilla plantar.
2. Determinar cambios en la carga parasitaria de los animales infectados como consecuencia del tratamiento.

METODOLOGÍA

Diseño experimental:

Para llevar a cabo este estudio se procedió a infectar ratones hembras BALB/c, con amastigotes de *L. (L.) mexicana* vía subcutánea. Semanalmente se midió el tamaño de las lesiones cutáneas desarrolladas y a la semana 3 post-infección se aplicaron los tratamientos correspondientes, empleando 12 ratones según los grupos experimentales que se describen a continuación:

- Grupo 1:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados intralesional con el vehículo de administración de CSA-13 (PBS): control de la infección.
- Grupo 2:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 4 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 3:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 8 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 4:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 16 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).

- Grupo 5:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 32 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 6:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 54 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 7:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 72 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 8:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 5×10^3 ng/gr peso/día de CSA-1. (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 9:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con 10×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13 (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional).
- Grupo 10:** 12 Ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con Miltefosina (2×10^4 ng/gr peso/día) (21 tratamientos, vía oral): Control del tratamiento.
- Grupo 11:** 12 Ratones BALB/c no infectados tratados con PBS (vía subcutánea): Control.
- Grupo 12:** 12 Ratones BALB/c no infectados tratados con CSA-13 con diferentes dosis según sea el caso (4, 8, 16, 32, 54, 72, 5×10^3 ó 10×10^3 ng/gr peso/día) (3 tratamientos, vía subcutánea, intralesional): Controles

Grupo 13: 12 Ratones BALB/c no infectados tratados con Miltefosina (2×10^4 ng/gr peso/día) (21 tratamientos, vía oral): Control.

En varios puntos subsiguientes a la infección se sacrificaron ejemplares por dislocación cervical y fueron removidas las almohadillas plantares para cuantificar la carga parasitaria.

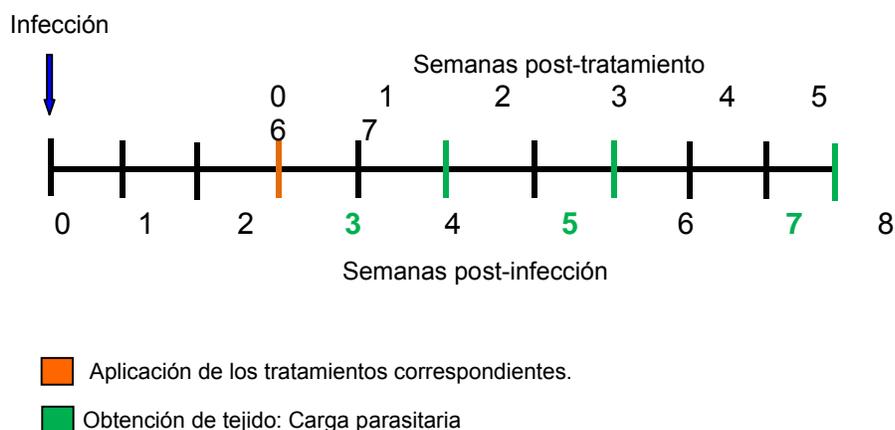


Figura 2: Representación esquemática de la infección de los ratones, aplicación del tratamiento y obtención de tejido durante el periodo de estudio.

Ratones

Ratones hembras BALB/c entre 4 y 6 semanas de edad, obtenidos de las colonias producidas en la sección del Bioterio del Instituto de Biomedicina, los cuales fueron mantenidos bajo condiciones convencionales con alimento y agua *ad libitum*, durante el tiempo de estudio. Se utilizó este modelo experimental, previamente establecido y comprobado (Sánchez y col., 1993). *L. (L.) mexicana* desarrolla en ratones BALB/c lesiones cutáneas crónicas que no se curan

espontáneamente y terminan por visceralizar (Alexander y Kaye, 1985; Bradley, 1987; Castes y Tapia, 1998; Aguilar y col., 2002).

Parásitos

Los ratones se infectaron con la cepa de referencia internacional MHOM/BR/82BEL21. Se extrajeron amastigotes de *L. (L.) mexicana* de lesiones cutáneas (nódulos) en la almohadilla plantar de un hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Los nódulos se obtuvieron asépticamente por disección, posteriormente el tejido fue dilacerado en Buffer Fosfato salino (PBS: 80mM de NaHPO₄, 20mM NaH₂PO₄ y 100 mM NaCl) a pH 7,2 con Penicilina/Estreptomicina (100 U/ml/100 µg/ml). Con la finalidad de eliminar los restos del tejido, la suspensión celular obtenida se centrifugó a 1620 x g a 15°C durante 2 min a temperatura ambiente y finalmente se determinó el número de amastigotes presentes en el tejido en la cámara de Neubauer.

Infección de los ratones con amastigotes de *L. (L.) mexicana*:

Los ratones fueron inoculados subcutáneamente en la almohadilla plantar izquierda con 10³ amastigotes de *L. (L.) mexicana*. La pata derecha contralateral permaneció intacta.

Aplicación de los tratamientos:

Los tratamientos se aplicaron a la tercera semana post-infección (al aparecer las lesiones cutáneas). La aplicación del CSA-13 se realizó por vía subcutánea, intralesional, en los grupos experimentales

correspondientes. Esta droga fue donada gentilmente por el Dr. Paul Savage, Ph.D, Brigham Young University, Provo, UTA, USA.

Como tratamiento control se administró Miltefosina (Impávido[®], NOLVER) por vía oral a razón de 2×10^4 ng/gr peso/día, durante 21 días consecutivos, esto se realizó con ayuda de una sonda gástrica (Serrano-Martín y col., 2009). Esta droga fue donada por la sección de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, UCV, MPPS.

La respuesta al tratamiento se evaluó mediante medición del grosor de la lesión cutánea y estimación de la carga parasitaria.

Medición del grosor de la lesión cutánea mediante morfometría digital: Seguimiento del curso de la infección.

El calibrador milimetrado (caliper), es la técnica tradicionalmente usada para evaluar el desarrollo de lesiones cutáneas en animales de experimentación causadas por diferentes especies de Leishmania. En nuestro grupo, hemos estandarizado un método de morfometría digital, basado en un software que permite realizar medidas sobre imágenes obtenidas de los ejemplares estudiados (Milani y col., 2009).

La evolución de las lesiones se evaluó semanalmente durante el periodo de estudio por medición del grosor de la almohadilla plantar usando morfometría digital. El método digital consistió en la captura de imágenes de cada uno de los ratones experimentales. Las fotografías

fueron procesadas con el programa Adobe® Photoshop® CS5, realizándose en cada uno de ellos: ajuste de brillo, contraste para mejorar la nitidez de las imágenes, eliminación de los bordes de las fotos y la normalización del tamaño de cada una de ellas a 10 x 14 cm.

Sobre cada una de estas imágenes (Figura 3) se realizó la medida de las almohadillas plantares tanto de la pata izquierda (inoculada con los parásitos) como de la derecha (no inoculada) con el tps Dig programa (C), Versión 2.12 (Rohlf, 2008). Todas las imágenes se escalaron utilizando una herramienta de medida en mm, incorporada en la imagen digital.

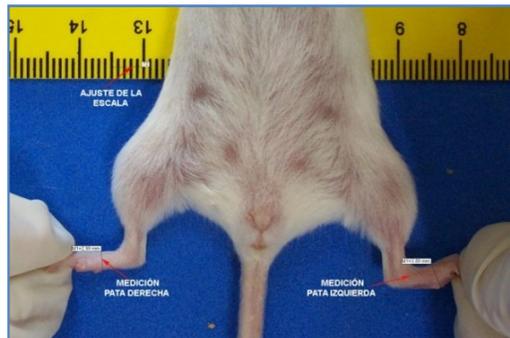


Figura3: Medición del grosor de las lesiones cutáneas en la almohadilla plantar mediante morfometría digital.

Estimación de la carga parasitaria en las lesiones cutáneas:

La cuantificación del número de parásitos en los tejidos infectados del ratón, se llevó a cabo mediante la técnica de diluciones limitantes (Titus y col., 1985, Méndez y col., 2004).

Una vez sacrificado el ratón por dislocación cervical, se seccionaron las almohadillas plantares lesionadas de los ratones, se pesaron y se disgregaron en medio Schneider's (Sigma-Aldrich, Inc.) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (56°C), Penicilina/Estreptomina (100 U/ml /100 µg/ml) y 0,05% de EDTA. Se incubaron a 37°C durante 40 min. El homogenizado obtenido, se diluyó seriadamente en una placa de 96 pozos de fondo plano contentivo de medio bifásico: 50µl de Agar base (20% sangre de conejo desfibrinada) y 100 µl de medio Schneider's suplementado de la manera indicada anteriormente (excepto EDTA). Después de 7 días de incubación a 26 °C, se determinó la carga parasitaria en las lesiones, relacionando el título de parásitos con los mg de tejido de la lesión. El título de parásito se expresó como el $-\log$ de la mayor dilución en la que se observó al menos un parásito vivo.

Análisis Estadístico:

La comparación entre grupos se realizó aplicando el análisis de varianza (ANOVA de una vía); para comparar los diferentes grupos se utilizó la prueba *a posteriori* de Duncan. Los resultados fueron expresados como la media, más o menos la desviación estándar (SD). Las medias fueron calculadas en base a los valores individuales para cada ratón. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Statistica v8.0 de Statsoft®.

RESULTADOS

1. Medición del grosor de la lesión cutánea mediante morfometría digital: Seguimiento del curso de la infección.

El seguimiento del curso de la infección se llevó a cabo, mediante la medición del tamaño de las lesiones en ratones BALB/c, infectados subcutáneamente con 10^3 amastigotes de *L. (L.) mexicana* en la almohadilla plantar izquierda. Dicha medición se realizó durante 10 semanas post-infección (7 semanas post-tratamientos).

La aplicación del CSA-13 se realizó por vía subcutánea, intralesional, en los grupos experimentales correspondientes a las diferentes dosis (4, 8, 16, 32, 54, 72, 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día). Por otra parte, como tratamiento control se administró Miltefosina (Impavido[®], NOLVER) por vía oral a razón de 2×10^4 ng/gr peso/día, durante 21 días consecutivos.

En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó a partir de la semana 3 post-infección un incremento significativo ($p < 0,05$) del tamaño de la lesión ($2,02 \pm 0,29$ mm), en el grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* a quienes se administró PBS (Figura 4).

Por otra parte, los grupos de ratones no infectados y tratados con 4 y 8 ng/gr peso/día de CSA-13, presentaron un incremento significativo ($p = 0,000018$ y $p = 0,000017$, respectivamente) en el tamaño de la almohadilla

plantar ($3,20 \pm 0,10$ mm y $3,40 \pm 0,11$ mm, respectivamente) en la semana 4 post-infección (1 post-tratamiento); el cual decae bruscamente a la semana 5 post-infección (Figura 4).

En la Figura 4, se muestra que en la semana 4 post-tratamiento el tamaño de la lesión ($3,20 \pm 0,12$ mm) en el grupo de ratones infectados y tratados con 8 ng/gr peso/día de CSA-13 es significativamente menor ($p=0,000061$), con respecto al grupo de los ratones infectados y tratados con PBS. De igual manera, se observó disminución significativa ($p=0,00113$) en el tamaño de la lesión ($3,46 \pm 0,17$ mm) en el grupo de ratones infectados y tratados con 4 ng/gr peso/día. Este comportamiento observado a partir de la semana 4 post- tratamiento se mantuvo hasta el final del estudio (semana 7 post- tratamiento).

En cuanto al grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* y tratados con Miltefosina (2×10^4 ng/gr peso/día), se observó a partir de la semana 1 post-tratamiento, que el tamaño de la lesión disminuyó significativamente ($p<0,05$) al compararse con el grupo de ratones infectados y tratados con PBS (Figura 4). Este comportamiento se observó en todo el estudio.

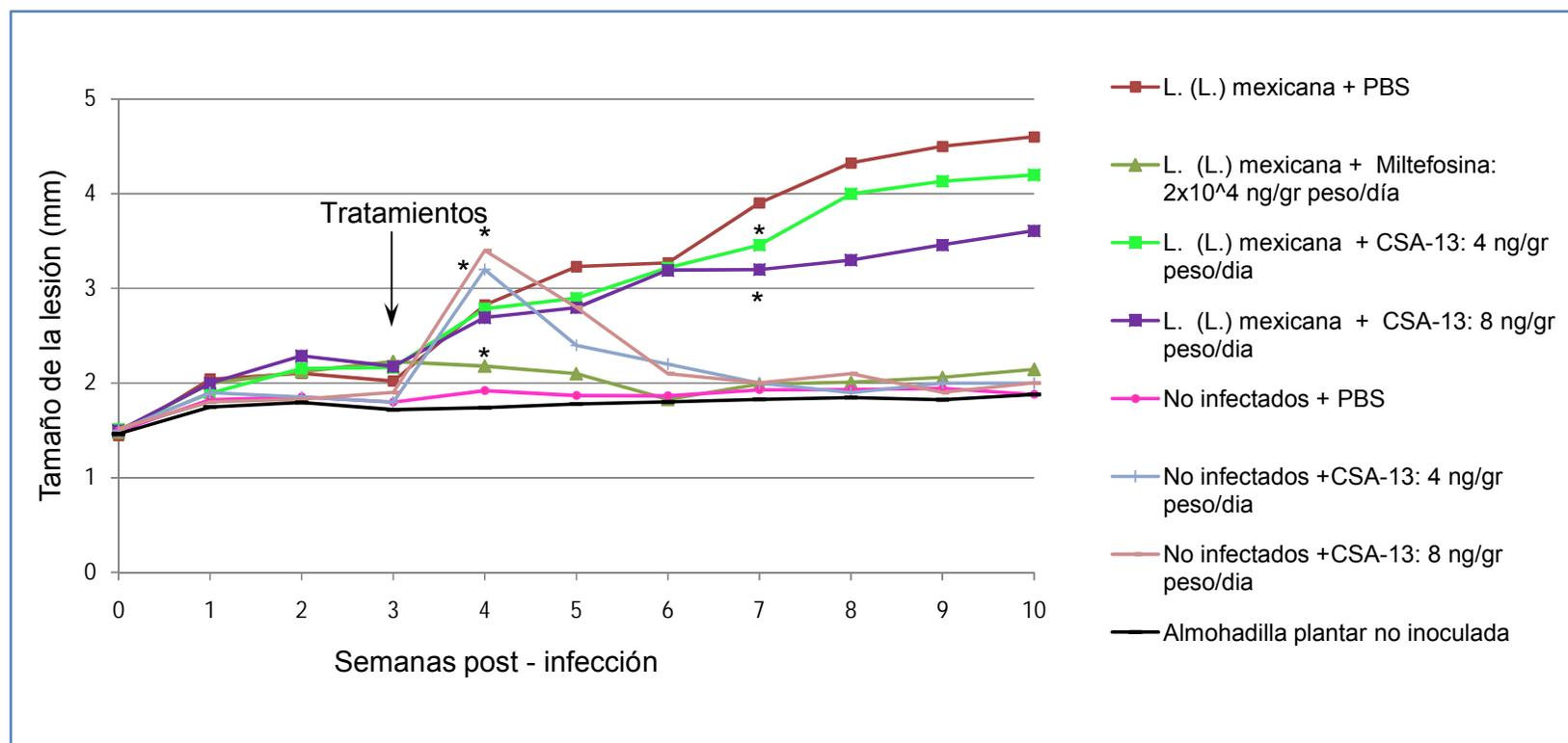


Figura 4: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 4 y 8 ng/gr peso/día. * P<0,05: Comparación de los grupos *L. (L.) mexicana* tratados con 4 y 8 ng/gr peso/día y *L. (L.) mexicana* tratado con Miltefosina (2x10⁴ ng/gr peso/día) con respecto a *L.(L.) mexicana* tratados con PBS. Comparación en la semana 4 post-infección con respecto a la semana 3 post-infección en los grupos no infectados tratados con

En cuanto al grupo de ratones infectados y tratados con 8 y 16 ng/gr peso/día de CSA-13 (Figura 5), se evidenció un comportamiento similar en cuanto a la disminución del tamaño de la lesión ($3,59 \pm 0,14$ mm y $3,50 \pm 0,07$ mm, respectivamente) a partir de la semana 7 post-infección; observándose una disminución significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con PBS. Sin embargo, entre los grupos de ratones infectados y tratados con 8 y 16 ng/gr peso/día de CSA-13 no se observaron diferencias significativas.

Con respecto al grupo de ratones no infectados y tratados con 8 y 16 ng/gr peso/día (Figura 5), se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en el tamaño de la almohadilla plantar ($3,42 \pm 0,05$ mm y $3,75 \pm 0,07$ mm, respectivamente) en la semana 1 post-tratamiento; este incremento decae considerablemente en la semana 2 post-tratamiento en el grupo de ratones no infectados y tratados con 8 ng/gr peso/día; a diferencia del grupo de ratones no infectados y tratados con 16 ng/gr peso/día que disminuyó paulatinamente.

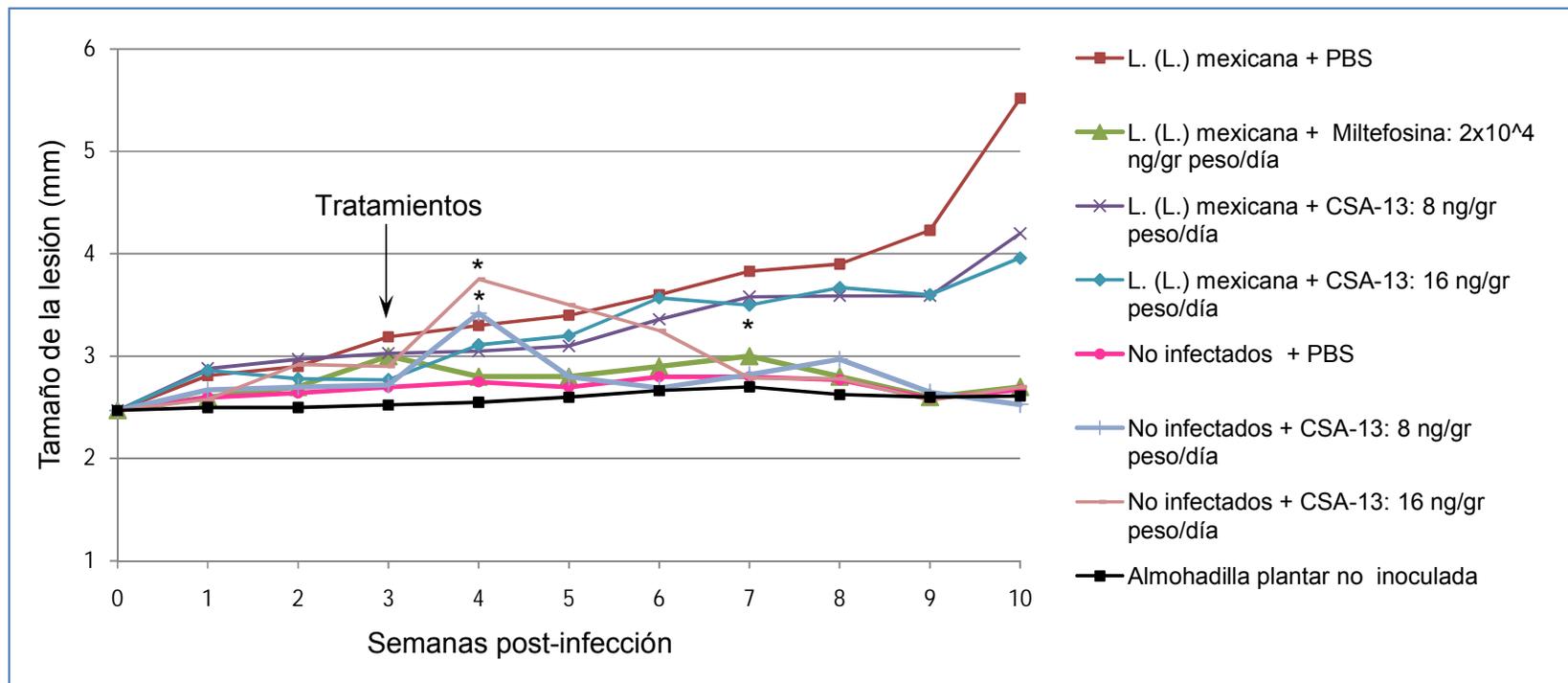


Figura 5: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 8 y 16 ng/gr peso/día. * P<0,05: Comparación de los grupos *L. (L.) mexicana* tratados con 4 y 8 ng/gr peso/día con respecto a *L.(L.) mexicana* tratados con PBS. Comparación en la semana 4 post-infección con respecto a la semana 3 post-infección en los grupos no infectados tratados con 4 y 8 ng/gr peso/día

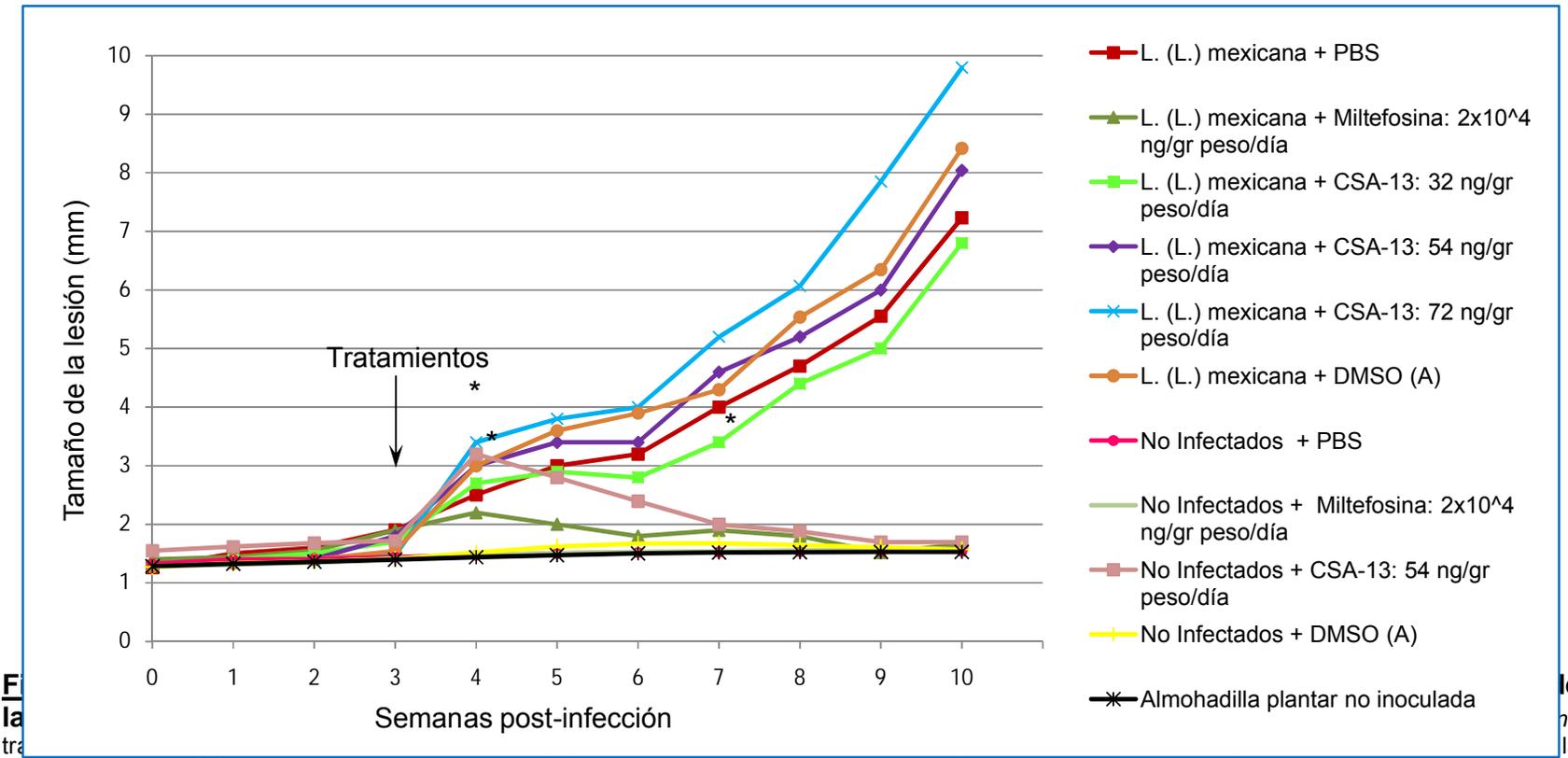
Por otro lado, en la figura 6, en el grupo de ratones infectados y tratados con 32 ng/gr peso/día, se observó disminución del tamaño de la lesión, con respecto al grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* y tratados con PBS, a partir de la semana 6 post – infección (3 post-tratamiento), siendo esta disminución significativa ($p=0,000117$) en la semana 4 post-tratamiento. A diferencia del grupo de ratones infectados y tratados con 54 y 72 ng/gr peso/día; los cuales presentaron incremento en el tamaño de la lesión a partir de la semana 1 post- tratamiento, con respecto al grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* y tratados con PBS. Es importante destacar que en el grupo de ratones infectados y tratados con 72 ng/gr peso/día de CSA-13, dicho incremento fue mucho mayor en relación al grupo de ratones infectados y tratados con 54 ng/gr peso/día de CSA-13, observándose así una diferencia significativa ($p<0,05$) a partir de la semana 3 post-tratamiento.

En el grupo de ratones no infectados y tratados con 54 ng/gr peso/día de CSA-13, se observó en la semana 1 post – tratamiento un incremento significativo ($p< 0,05$) del tamaño de la almohadilla plantar; el cual decae paulatinamente en la semana 2 post- tratamiento (Figura 6).

Adicionalmente, se incluyó en el estudio, un grupo de ratones infectados y tratados con Dimetil Sulfóxido (DMSO), administrado vía

subcutánea, intralesional, y otro grupo de ratones no infectados y tratados de igual manera. El DMSO es un solvente polar, en el cual inicialmente se resuspendió el CSA -13 a alta concentración. Seguidamente para preparar las soluciones de CSA-13 a administrar en los diferentes grupos experimentales se realizaron diluciones del mismo en PBS; sin embargo, en estas diluciones quedan restos de DMSO; por lo que se evaluó el posible efecto de estos restos de DMSO en el tamaño de las lesiones cutáneas.

En la Figura 6, a los grupos de ratones (infectados o no infectados) tratados con DMSO (A), se les administró una cantidad de DMSO correspondiente a la cantidad de DMSO que se tiene en la dosis de 54 ng/gr peso/día del CSA-13. En esta figura se observa que el grupo de ratones infectados y tratados con DMSO (A), tienen un incremento significativo ($p= 0,000054$) en el tamaño de la lesión ($3,00 \pm 0,05$ mm) en relación al grupo de ratones infectados y tratados con PBS a partir de la semana 4 post-infección (semana 1 post-tratamiento); sin embargo, este incremento fue similar al grupo de ratones infectados y tratados con 54 ng/gr peso/día de CSA-13. Por otra parte, en el grupo de ratones no infectados y tratados con DMSO (A), no se evidenciaron cambios en el tamaño de la almohadilla plantar.



El
la
tra

le
na
la

semana 3 post-infección en el grupo no infectados tratado 54 ng/gr peso/día. Comparación del grupo *L. (L.) mexicana* tratados con DMSO (A) con respecto a *L. (L.) mexicana* tratados con PBS.

En la Figura 7, se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) a partir de la semana 1 post- tratamiento en el tamaño de la lesión, del grupo de ratones infectados y tratados con 10×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13, al compararse con el grupo de ratones infectados y tratados con PBS; mientras que, en el grupo de ratones infectados y tratados con 5×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de la lesión, con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS.

El comportamiento anteriormente descrito en el grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* y tratados con 5×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13, fue similar al observado en el grupo de ratones infectados y tratados con DMSO (B) a una dosis correspondiente a la que se tiene cuando se aplica 5×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13; el cual no presentó diferencias significativas con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS; de igual manera no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con 5×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13.

En cuanto al grupo de ratones no infectados y tratados con 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13 (Figura 7), se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en el tamaño de la almohadilla plantar en la semana 1 post-tratamiento; el cual disminuyó lentamente.

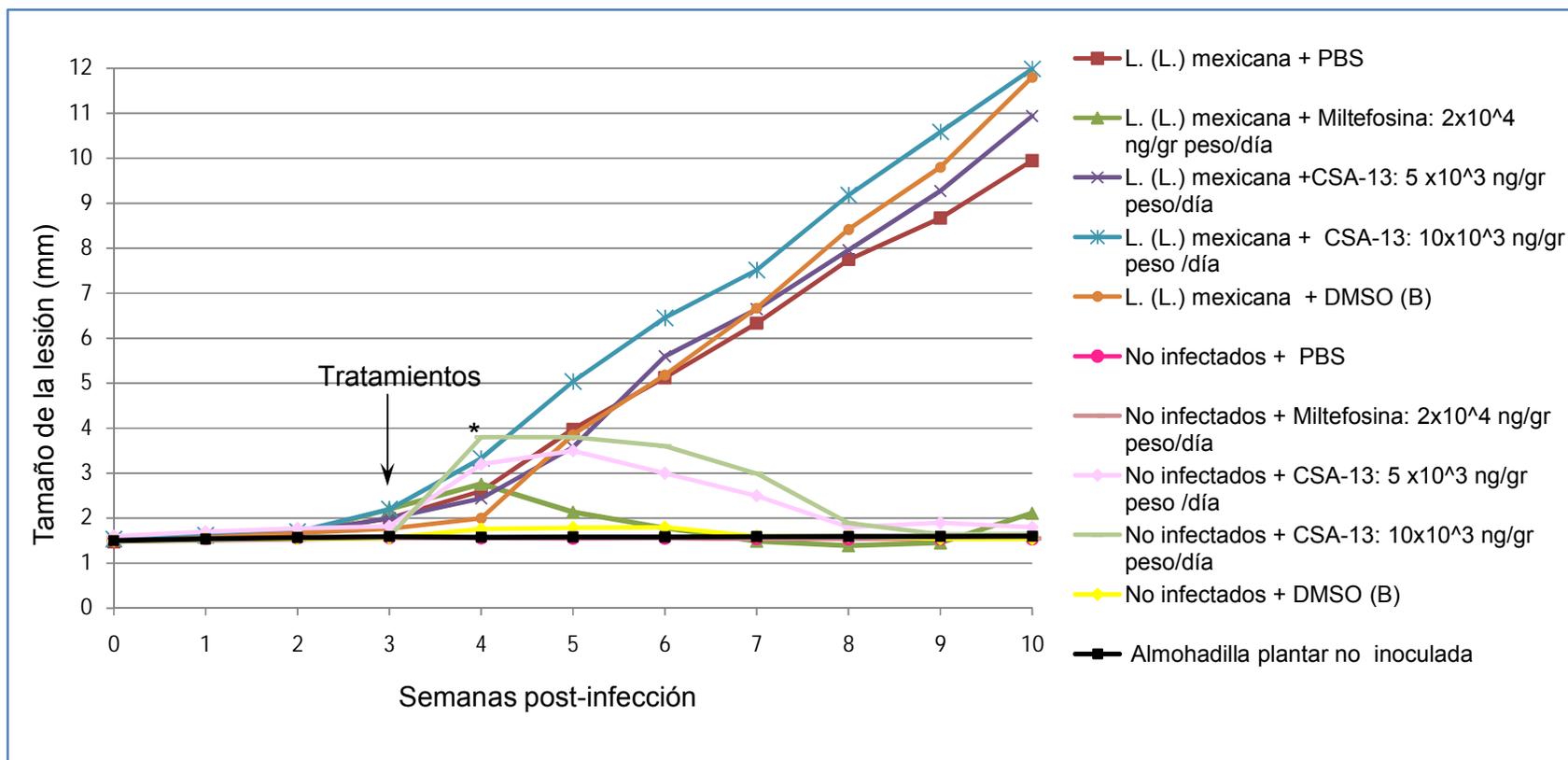


Figura 7: Evolución de las lesiones cutáneas post-infección y post-tratamientos mediante la medición del grosor de la almohadilla plantar. Dosis aplicadas de CSA-13: 5 x 10³ y 10 x 10³ ng/gr peso/día.*P<0,05: Comparación del grupo *L. (L.) mexicana* tratados con 10x10³ ng/gr peso/día con respecto a *L. (L.) mexicana* tratados con PBS. Comparación en la semana 4 post-infección con respecto a la semana 3 post-infección en el grupo no infectados tratados 5 x10³ ng/gr peso/día.

2. Estimación de la carga parasitaria en las lesiones cutáneas.

Se estimó la carga parasitaria en los tejidos infectados de los diferentes grupos experimentales mediante la técnica de diluciones limitantes.

En la Figura 8, se observa un incremento constante en la carga parasitaria tanto en el grupo de ratones infectados y tratados con PBS como en los grupos de ratones infectados y tratados con 4 y 8 ng/gr peso/día, durante las 7 semanas post-tratamientos; sin embargo, a partir de la semana 3 post-tratamiento, se observó disminución de la carga parasitaria en los grupos de ratones infectados y tratados con 4 y 8 ng/gr peso/día, con respecto a los ratones infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con PBS, siendo mayor la disminución de la carga parasitaria en el grupo de ratones tratados con 8 ng/gr peso/día.

En cuanto al grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* y tratados con Miltefosina, se observó una disminución de la carga parasitaria a partir de la semana 1 post- tratamiento, en la semana 3 y 5 post-tratamiento la carga parasita no es detectable. Finalmente, se observó un aumento de la carga parasitaria en la semana 7 post-tratamiento (Figura 8, 9, 10 y 11).

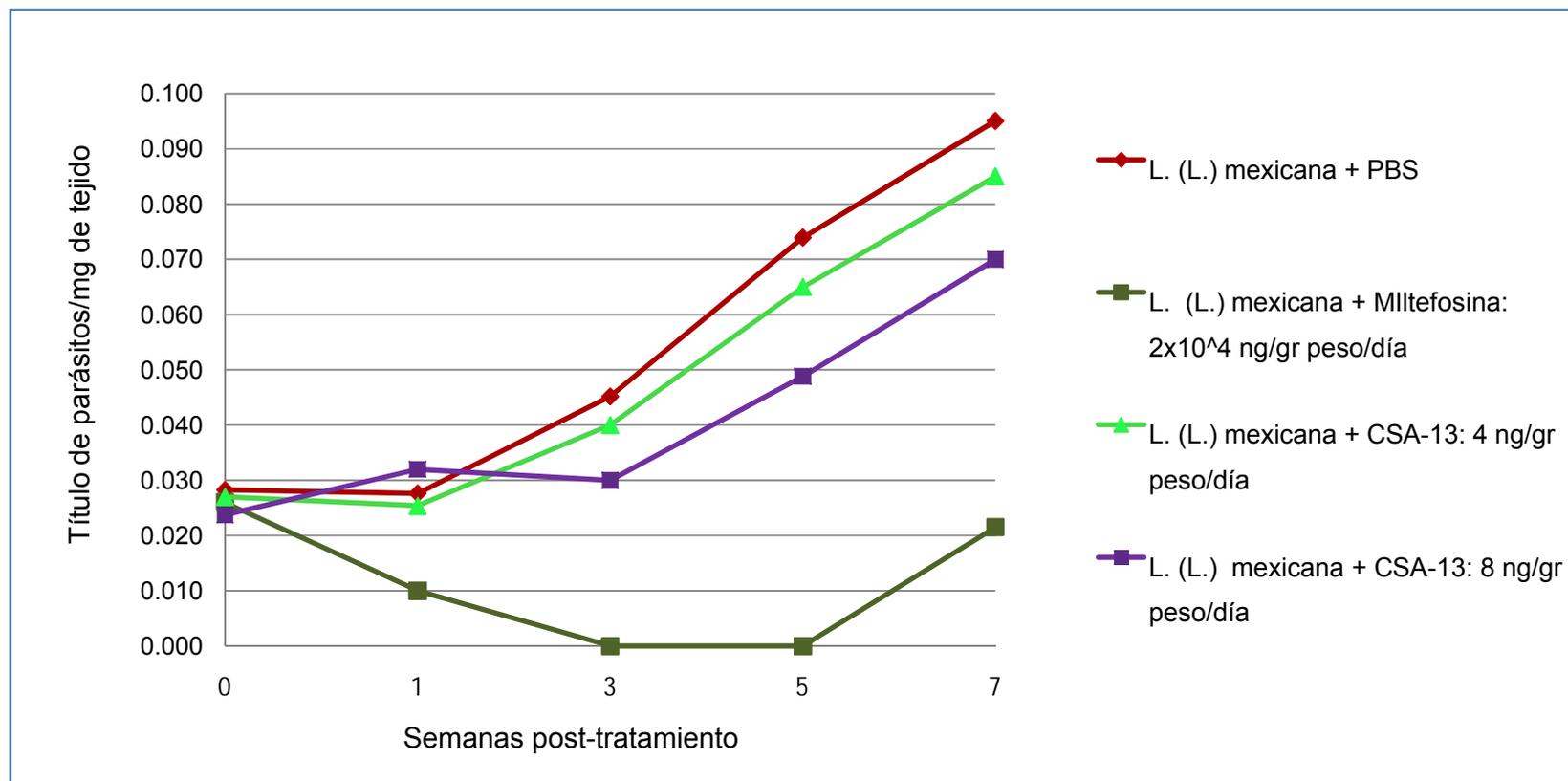


Figura 8: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con *L. (L.) mexicana*, mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 4 y 8 ng/gr peso/día.

Por otro lado, cabe señalar que los grupos de ratones infectados y tratados con las dosis correspondientes a 8 y 16 ng/gr peso/día de CSA-13, presentaron un aumento constante en el título de parásitos/mg de tejido; no obstante, a partir de la semana 3 post-tratamiento el grupo de ratones infectados y tratados con 8 ng/gr peso/día presentaron una leve disminución de la carga parasitaria con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS. En cuanto al grupo de ratones infectados y tratados con 16 ng/gr peso/día, la carga parasitaria fue mayor durante las 2 primeras semanas post-tratamiento, al compararse con el grupo de ratones infectados y no tratados con el CSA-13 (Figura 9).

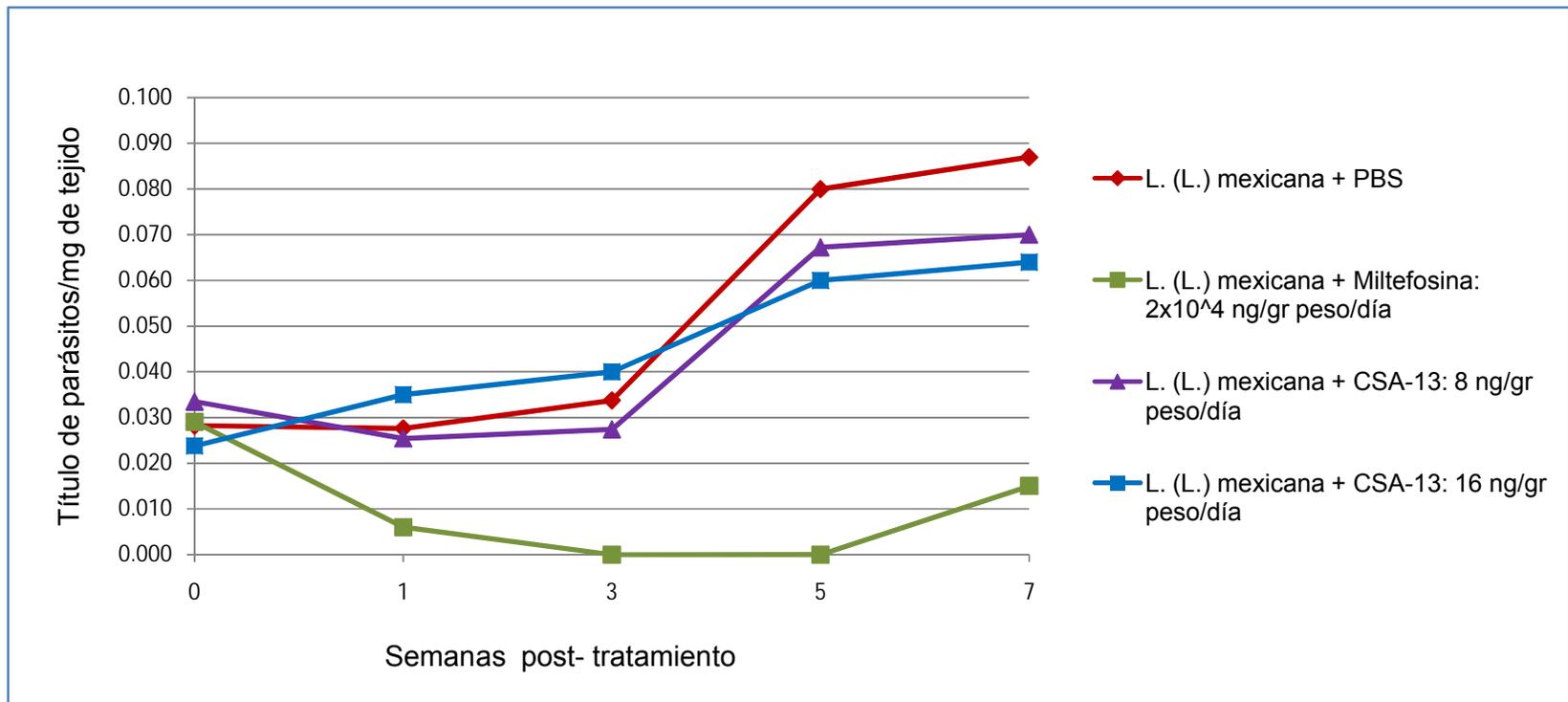


Figura 9: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con *L. (L.) mexicana*, mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 8 y 16 ng/gr peso/día.

En cuanto al grupo de ratones infectados con *L. (L) mexicana* y tratados con 32, 54 y 72 ng/gr peso/día de CSA-13, se observó disminución de la carga parasitaria con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS, a partir de la semana 3 post- tratamiento; en esta semana, fue mayor la disminución de la carga parasitaria en el grupo de ratones infectados y tratados con 32 ng/gr peso/día de CSA-13 (Figura 10).

Con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con DMSO (A), se observó un comportamiento similar al grupo de ratones infectados y tratados con 54 ng/gr peso/día de CSA-13 (Figura 10).

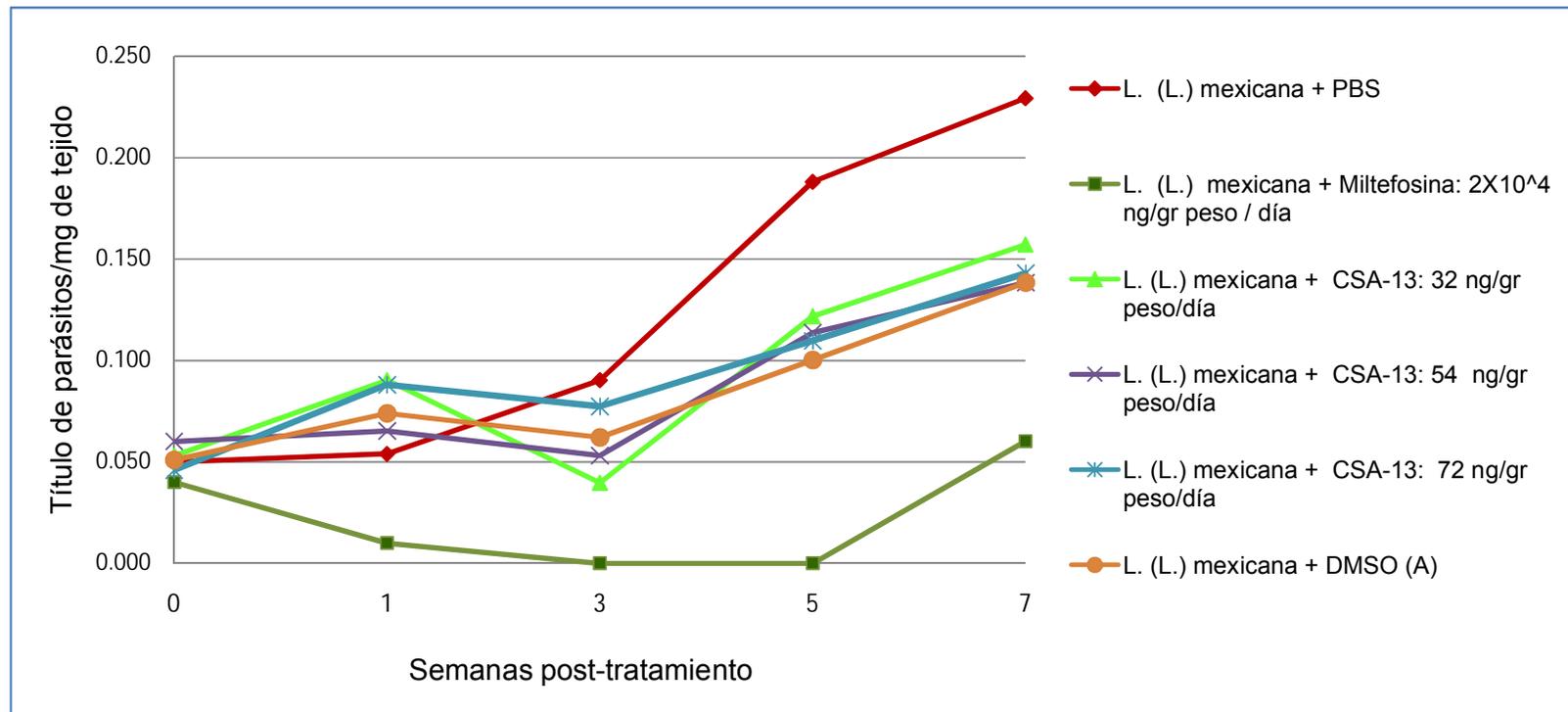


Figura 10: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con *L. (L.) mexicana*, mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 32, 54 y 72 ng/gr peso/día.

En la Figura 11, se observa que los grupos de ratones infectados con *L. (L) mexicana* y tratados 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13, así como también, el grupo infectado y tratado con DMSO (B), tienen un comportamiento similar durante las 7 semanas post-tratamiento, evidenciándose en estos grupos de ratones disminución de la carga parasitaria a partir de la semana 1 post-tratamiento, con respecto al grupo infectado y tratado con PBS. Cabe destacar, que en esta primera semana post-tratamiento la carga parasitaria en el grupo de ratones infectados y tratados con 32 ng/ gr peso/día de CSA-13 fue menor.

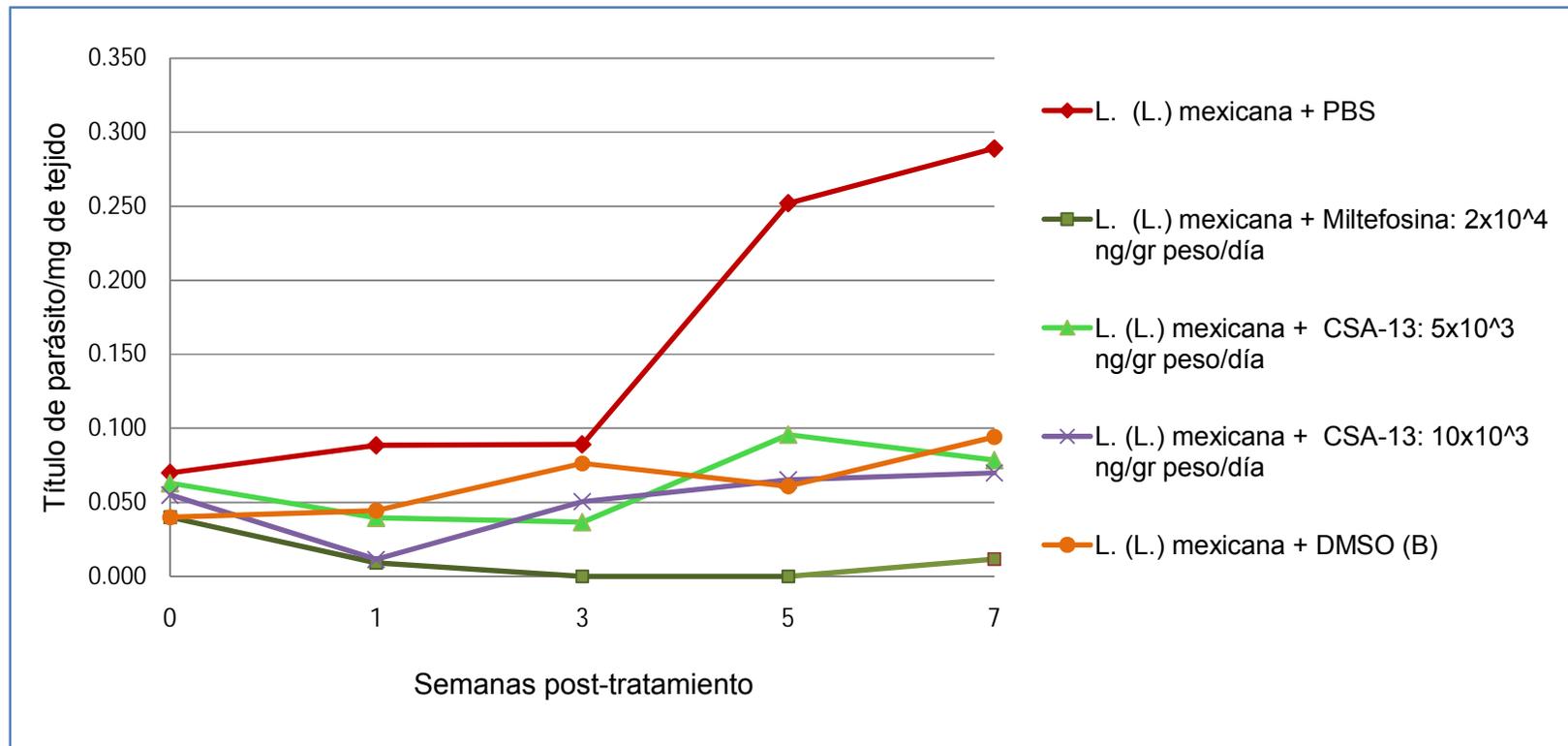


Figura 11: Evaluación del progreso de la infección en ratones BALB/c con *L. (L.) mexicana*, mediante la determinación de la carga parasitaria. Dosis aplicadas de CSA-13: 5x10³ y 10x10³ ng/gr peso/día.

Adicionalmente, se evaluó la influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones experimentales. Durante las 10 semanas de estudio, los ratones fueron pesados en una balanza digital Ohaus (sensibilidad (g): 0.01 – 1). En las Figuras 12, 13 y 14, puede observarse que todos los grupos experimentales presentaron un comportamiento similar con respecto al peso, donde no se evidenció disminución del mismo, excepto el grupo de ratones infectados con *L. (L.) mexicana* y tratados con Miltefosina; el cual presentó una disminución entre las semanas 1 y 4 post-tratamiento, siendo mayor esta disminución en la semana 3 post-tratamiento.

Por otra parte, de manera complementaria en el estudio se realizaron análisis de química sanguínea en los ratones no infectados al ser tratados con CSA-13 (8, 16, 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día) o con DMSO, evidenciándose valores elevados de glicemia al aplicar dosis superiores a 16ng/gr peso/día y valores elevados de la enzima amilasa en todas las dosis evaluadas. En cuanto a la determinación de las transaminasas (GOT y GPT) se observaron en la semana 1 post-tratamiento valores elevados que posteriormente disminuyen, esto fue consistente en todas las dosis evaluadas del CSA-13 (Tabla 1 y 2).

No se observaron alteraciones en los análisis de química sanguínea en los ratones no infectados tratados con DMSO (Datos no mostrados).

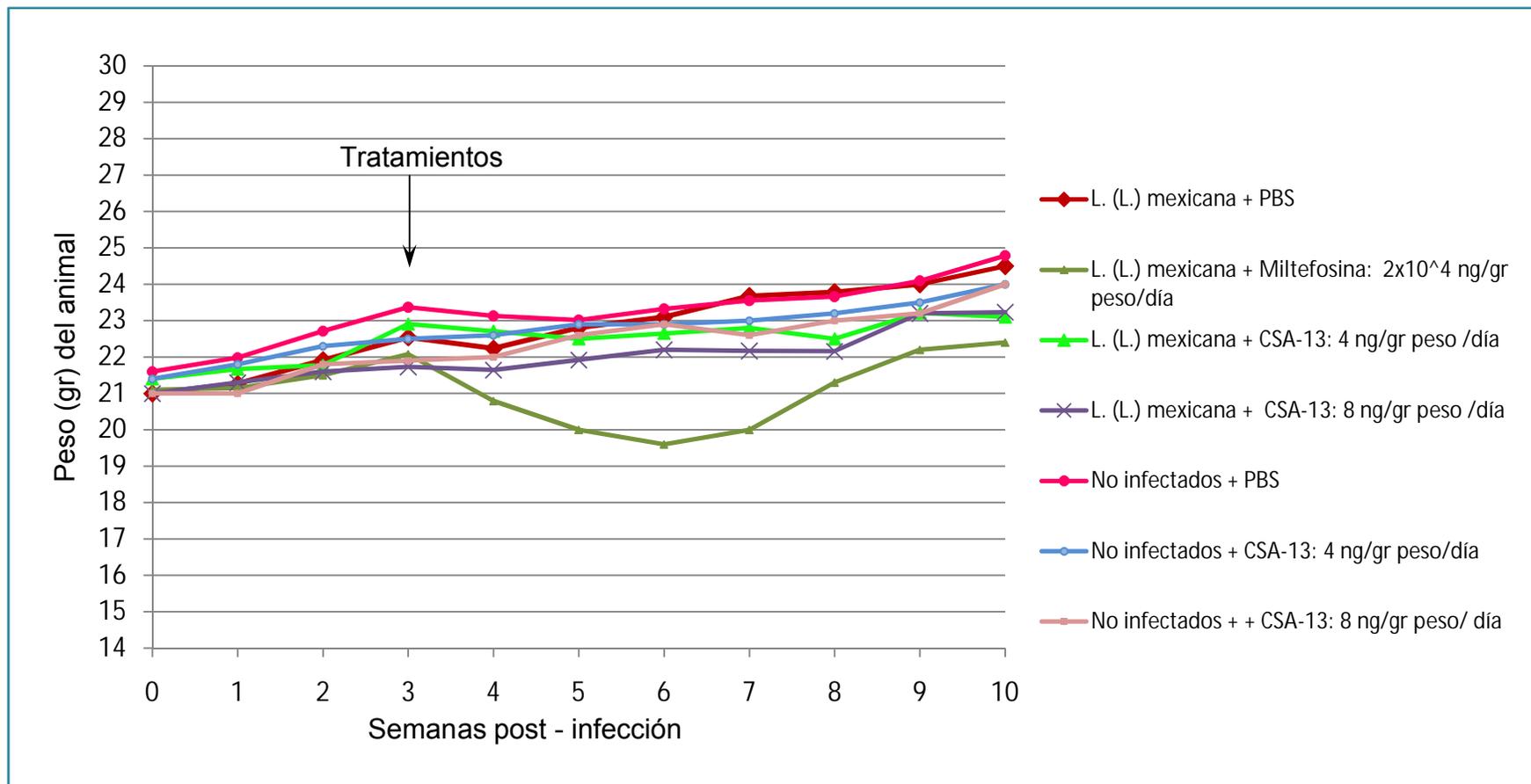


Figura 12: Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*. Dosis aplicadas de CSA-13: 4 y 8 ng/gr peso/día.

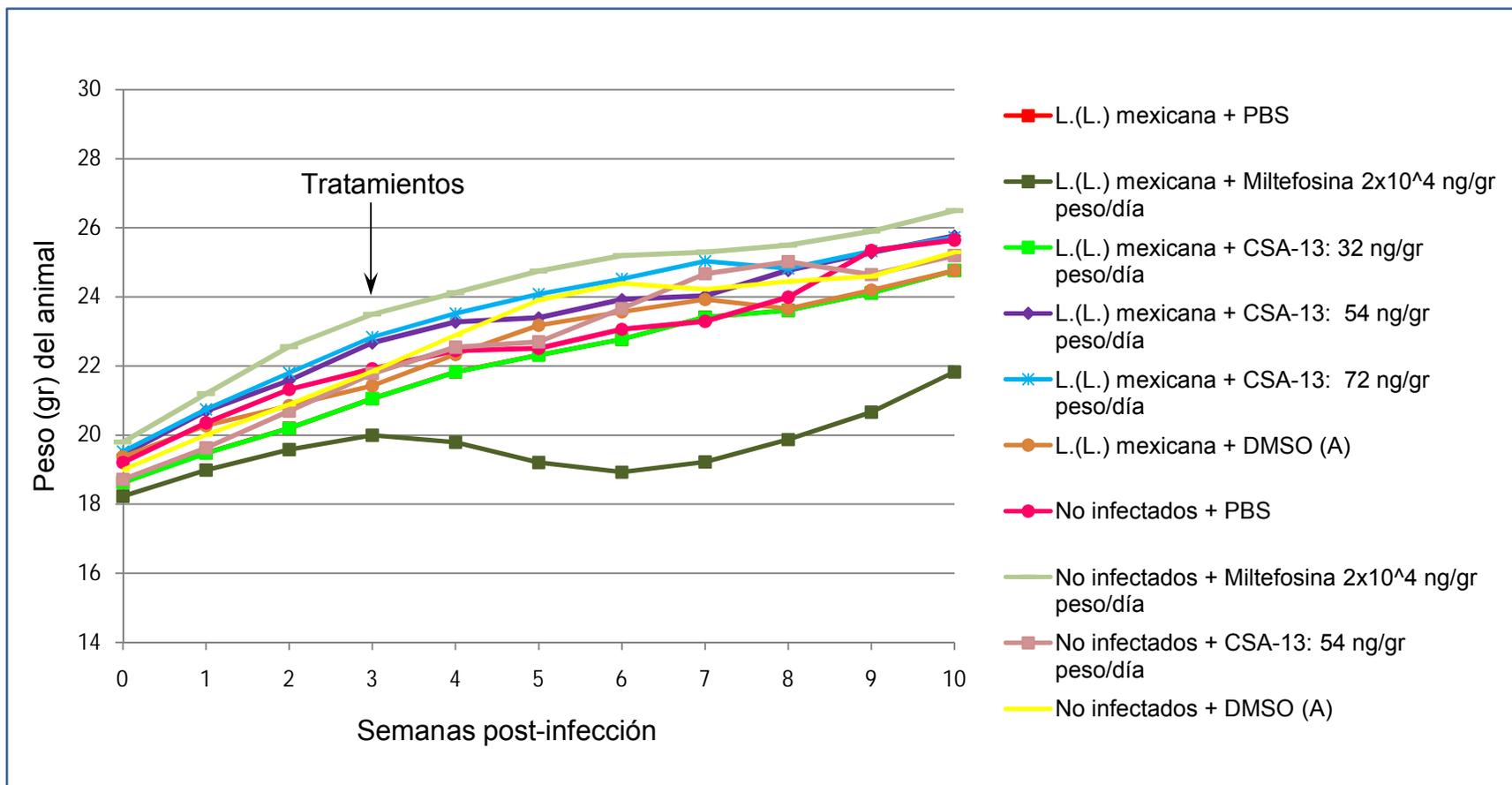


Figura 13: Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*. Dosis aplicadas de CSA-13: 32, 54 y 72 ng/gr peso/día.

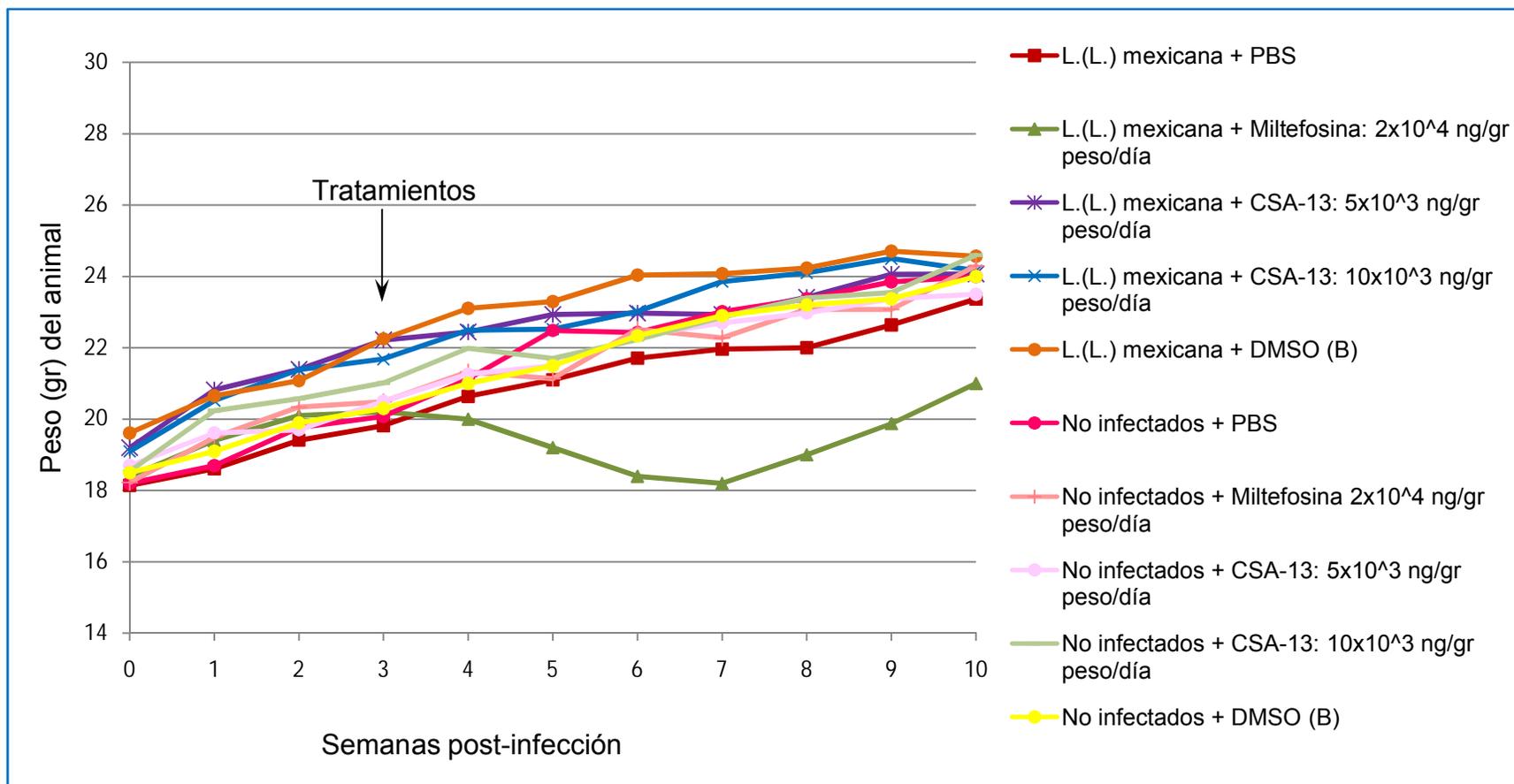


Figura 14: Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*. Dosis aplicadas de CSA-13: 5x10³ y 10x10³ng/gr peso/día.

Tabla 1: Valores de química sanguínea de ratones BALB/c no infectados tratados con CSA-13. Dosis aplicadas: 8 y 16 ng/gr peso/día.

Dosis de CSA-13	BALB/c No infectados								No infectados - No tratados	Valores normales (*)
	8 ng/gr peso/día				16 ng/gr peso/día					
Semanas post-tratamiento	1	3	5	7	1	3	5	7		
BUN (mg/dl) ¹	18	30	28	25	25	28	28	32	28	8 - 33
Creatinina (mg/dl)	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,32	0,2 - 0,9
Glicemia (g/dl)	150	162	119	116	143	134	251	193	141	62-175
Amilasa (U/l)	623	711	685	700	869	809	800	1000	651	No reportado
GOT (U/l) ²	354	119	104	86	627	326	70	61	98	54 - 298
GPT (U/l) ³	90	17	32	36	100	63	21	28	44	17 - 77

*Valores normales reportados en las bases de datos de The Jackson laboratory y Research Animal Resources, University of Minnesota

<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>, <http://www.informatics.jax.org>

¹BUN: Nitrógeno Ureico en Sangre

²GOT: Transaminasa Glutámica Oxalacética

³GPT: Transaminasa Glutámica Pirúvica : Valores sanguíneos elevados

Tabla 2: Valores de química sanguínea de ratones BALB/c no infectados tratados con CSA-13. Dosis aplicadas: 5x10³ y 10x10³ ng/gr peso/día.

Dosis de CSA-13	BALB/c No infectados								No infectados - No tratados	Valores normales (*)
	5x10 ³ ng/gr peso/día				10x10 ³ ng/gr peso/día					
Semanas post-tratamiento	1	3	5	7	1	3	5	7		
BUN (mg/dl)	30	24	29	26	28	24	21	29	28	8-33
Creatinina (mg/dl)	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,32	0,2-0,9
Glicemia (g/dl)	113	152	177	136	165	168	180	130	141	62-175
Amilasa (U/l)	852	770	693	635	800	799	658	489	651	No reportado
GOT (U/l) ¹	334	278	89	71	522	95	80	60	98	54 - 298
GPT (U/l) ²	105	52	32	16	127	52	23	34	44	17 - 77

*Valores normales reportados en las bases de datos de The Jackson laboratory y Research Animal Resources, University of Minnesota

<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>, <http://www.informatics.jax.org>

¹BUN: Nitrógeno Ureico en Sangre

²GOT: Transaminasa Glutámica Oxalacética

³GPT: Transaminasa Glutámica Pirúvica  : Valores sanguíneos elevados

DISCUSIÓN

El Antibiótico Catiónico Esteroideo (CSA)-13, es una pequeña molécula de amino esterol, que presenta un efecto similar a los péptidos endógenos antimicrobianos y cuya actividad bactericida está basada en la disrupción de la membrana. El CSA-13 fue diseñado con la finalidad de imitar el carácter anfifílico de los péptidos antimicrobianos (Savage y col., 2002; Ding y col., 2004). Es importante destacar que los efectos de los CSAs se han evaluado mediante ensayos *in vitro* sobre diferentes microorganismos, tales como: *Actinobacter baumannii* (Gram-negativa), *Pseudomona aeruginosa* (Gram-positiva), *Escherichia coli*, *Leishmania infantum/chagasi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*, también se ha evaluado su efectividad sobre Orthopoxvirus en ensayos *in vivo* (Li y col., 1999; Schmidt y col., 2001; Scott y col., 2002; Díaz y col., 2004; Ding y col., 2004; Chirinos y col., 2007; Chirinos y col., 2008; Epand y col., 2008; Howell y col., 2009; Sánchez y col., 2009; Lara y col., 2010).

En este estudio al determinar los cambios en la evolución del tamaño de las lesiones cutáneas en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* después de aplicarse diferentes dosis de CSA-13, se evidenció disminución en el tamaño de las lesiones cutáneas observadas en los ratones tratados con 4, 8, 16 y 32 ng/gr peso/día, siendo más notoria esta disminución en el grupo de ratones infectados y tratados con 8 ng/gr peso/día, lo cual se relaciona con la disminución de la carga parasitaria observada en el mismo grupo, esto podría indicar que el CSA-13 afecta la supervivencia o la proliferación de los parásitos

presentes en el tejido, siendo estos resultados consistentes con lo reportado en estudios *in vitro*, donde solamente sobrevive el 16,7% de los parásitos luego de 2 horas de tratamiento con 20 µg/ml de CSA-13 (Sánchez y col., 2009).

El incremento del tamaño de la lesión observado en los ratones infectados con *L. (L.) mexicana* tratados con las dosis 54, 72, 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día del CSA-13 podría ser consecuencia de un aumento del proceso inflamatorio local, más no de un aumento en la proliferación del parásito, ya que cuando se relacionan estos resultados con la carga parasitaria, se observó disminución del título de parásitos/mg de tejido, lo cual es más evidente a las dosis más altas del CSA-13 (5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día), lo que sugiere efectividad del CSA-13 contra la replicación del parásito en el tejido.

Adicionalmente, estos resultados pueden sugerir que el CSA-13 aplicado en el tejido infectado por *L. (L.) mexicana* a dosis superiores a 54 ng/gr peso/día pudiera incrementar la inflamación ocasionada por la infección.

Por otra parte, el efecto observado sobre el tamaño de la lesión cutánea y la disminución de la carga parasitaria, está relacionada con el DMSO contenido en las dosis aplicadas de CSA-13; ya que el comportamiento del grupo de ratones infectados y tratados con DMSO, es similar al de los ratones tratados con las dosis de 54 y 5×10^3 ng/gr peso/día de CSA-13, en cuanto al tamaño de la lesión y disminución de la carga parasitaria.

El Dimetil Sulfóxido (DMSO), es un disolvente polar que actúa como agente quelante, posee una habilidad de penetración de membranas; ya que atraviesa la barrera de lipoproteínas de la membrana celular; lo cual se cree es debido a cambios de configuración reversibles en las proteínas. Se han realizado pruebas para determinar la toxicidad del DMSO, usándose al 90 %, comprobándose un bajo nivel de toxicidad; así como también se ha demostrado que no se acumula en los tejidos y se metaboliza en el hígado por enzimas microsomales y se elimina principalmente por la orina y el pulmón, aunque también por vías biliares. Su excreción en el hombre, tras una administración cutánea, es de aproximadamente 48 horas a través de la orina (Roy M., 2002).

En este estudio, pudo comprobarse en el grupo de ratones no infectados y tratados con DMSO; que este compuesto a bajas dosis, no ocasiona daño tisular; ya que no se observó incremento del tamaño de la almohadilla plantar.

El incremento observado en el tamaño de la almohadilla plantar en los ratones no infectados y tratados con el CSA-13 en la semana 1 post-tratamiento, sugiere que las dosis de CSA-13 aplicadas en los diferentes grupos, podrían estar causando un proceso inflamatorio en el tejido tratado, lo cual podría atribuirse a las características químicas del compuesto o desencadenado por el mismo tratamiento, tal como se ha observado con otros compuesto como el Glucantime que incrementa la producción de citocinas pro inflamatorias en el tratamiento contra la Leishmaniasis (Calla-Magarino y col., 2009). En este caso el efecto observado del CSA-13 no es atribuible al DMSO, ya que se evidenció que en ratones no infectados y tratados con diferentes

dosis de DMSO, el mismo no ocasionó variación en el tamaño de la almohadilla plantar.

A lo anteriormente expuesto, también debe agregarse, que la aplicación de los tratamientos se lleva a cabo a través de la inyección en la almohadilla plantar, lo cual también genera respuesta inflamatoria.

Por otra parte, con respecto a la disminución de la carga parasitaria en el grupo de ratones infectados y tratados con el CSA-13, podría atribuirse a que el compuesto probablemente está ocasionando cambios en el parásito, lo cual posiblemente sea a nivel interno o en la membrana del mismo, lo que podría traer como consecuencia una menor supervivencia del parásito; sin embargo, la carga parasitaria también disminuyó al tratar los ratones infectados con DMSO, por lo que este compuesto está afectando de igual manera la supervivencia del parásito.

Estudios previos *in vitro* han demostrado que el CSA-13 ocasiona cambios morfológicos en promastigotes de *L. (L.) mexicana*, evidenciándose a través de estudios con microscopía electrónica, vacuolas de gran tamaño, mitocondrias de tamaños variables; membranas nucleares irregulares, membrana plasmática irregular y cambios en la bolsa flagelar (Chirinos y col., 2010).

La membrana de los amastigotes de *Leishmania* sp. presenta altos niveles de lipofosfoglicano (LPG) y tiene una elevada carga negativa

(Mendonca-Previato y col., 2005); por otra parte, se ha evidenciado que los CSAs que son compuestos catiónicos, tienen la característica de formar complejos con los fosfolípidos (Epanand y col., 2008), por lo que esto podría alterar la estructura y fluidez de la membrana del parásito. En este sentido, Lara y col., 2010, sugieren que el CSA-13 probablemente ocasiona una ruptura de la membrana de promastigotes de *L. major*.

Las dosis a las cuales se observó mejor efectividad del CSA-13 sobre las lesiones cutáneas fueron las más bajas (4, 8, y 16 ng/gr peso/día), las cuales contienen menos DMSO, esto indica un posible efecto del antibiótico. Es posible que el DMSO contenido en estas dosis de CSA-13 no tenga efecto sobre la lesión.

Con respecto a la Influencia de los tratamientos sobre el peso de los ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*, no se observó ningún efecto por parte del CSA-13 sobre el peso durante el tiempo experimental; probablemente este compuesto por vía subcutánea no cause efectos secundarios en el ratón que conlleve a una pérdida del apetito.

Finalmente, la disminución de peso observada en el grupo de ratones infectados y tratados con Miltefosina, puede atribuirse a los efectos adversos producidos por el tratamiento, dentro de los cuales, según estudios realizados en pacientes se encuentran náuseas y dolores abdominales (Machado y col.,

2010); este efecto no fue observado cuando se administró la droga a ratones no infectados.

En cuanto a la determinación de los valores de química sanguínea de ratones BALB/c no infectados tratados con las dosis 8, 16, 5×10^3 y 10×10^3 ng/gr peso/día CSA-13 se evidencia que la función hepática de estos animales experimentales está comprometida en la semana 1 post-tratamiento, probablemente el compuesto está ocasionando una inflamación aguda del hígado en esta semana que luego aparentemente disminuye, lo cual se refleja en los valores elevados de transaminasas en la semana 1 post-tratamiento que después disminuyen ubicándose dentro de los valores normales.

También se observaron valores elevados de la enzima amilasa (en todas las dosis evaluadas de CSA-13) y de la glicemia (a partir de 16 ng/gr peso/día de CSA-13), lo que puede indicar posible efecto del CSA-13 sobre la función pancreática.

Los valores de BUN, creatinina, glicemia, amilasa transaminasa en los ratones no infectados tratados con DMSO se ubicaron entre el rango de valores normales de los mismos, lo que puede sugerir que las alteraciones mostradas anteriormente en cuanto a transaminasas, amilasa, glicemia en los ratones tratados con CSA-13 sean debidas al mismo y no al DMSO. Diversos estudios han demostrado que en el hombre el DMSO se metaboliza en el hígado por enzimas microsomales y se elimina a través de la orina a las 48 horas (Roy M., 2002).

La evaluación de la influencia del CSA-13 sobre el peso y la determinación de los valores de química sanguínea son considerados información adicional en el estudio.

CONCLUSIONES

1. El CSA-13 incrementa el tamaño de la almohadilla plantar de ratones BALB/c no infectados.
2. Las dosis más bajas de CSA-13 (4, 8 y 16 ng/gr peso/día) son más efectivas en cuanto a la disminución del tamaño de la lesión en los ratones infectados con *L. (L.) mexicana*.
3. Los efectos observados del CSA-13 a 54 y 5×10^3 ng/gr peso/día, sobre el tamaño de la lesión y la carga parasitaria, en los ratones infectados con *L. (L.) mexicana* son debido al DMSO.
4. El DMSO no incrementa el tamaño de la almohadilla plantar de los ratones no infectados con *L. (L.) mexicana*.
5. El CSA-13 no influencia sobre el peso de los ratones BALB/c.
6. El CSA-13 altera los niveles sanguíneos de transaminasas, amilasa y glicemia de los ratones BALB/c, lo que compromete la función hepática y pancreática.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, F., Lambot, M., Laman, J., Meurs, M., Kiss, R., Noel, J.C., Carlier, Y. 2002. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, splen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania (L.) mexicana*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 273-279.
- Alexander, J., Kaye, P. 1985. Immunoregulatory pathways in murine Leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin Exp Immunol.* **61**: 674-682.
- Alvar, J. 1997. Impacto epidemiológico. El protozoo Clínica y ecoepidemiología. Editorial Junta de Castilla y León, Madrid.
- Arana, F., Pérez-Victoria, J., Repetto, Y., Morillo, A., Castanys, S., Gamarro, F. 1998. Involvement of Thiol Metabolism in Resistance to Glucantime in *Leishmania Tropica*. *Biochem Pharmacol.* **56**: 1201-1208
- Berman, J., Waddell D., Hanson B.D. 1985. Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med Hyg.* **40**:159-164.
- Bonfante, R., Barroeta, S. 2002. Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Tipografía y Litografía Horizonte C.A., Primera Edición, Barquisimeto, Venezuela.
- Calla-Magarino, J., Troye-Blomberg, M., Fernandez, C. (2009). An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as anti-Leishmania agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells. *Scand J Immunol.* **69(3)**: 251-8.
- Castes, M., Tapia, F. (1998). Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis. *Acta Cient Venez.* **49**: 42-56.
- Cedeño, D., Friesen J., Lash, T.D., Jones, M.A., Bahamon, N., Gannavaram, S., Hon, S. y colaboradores. 2009. Desarrollos recientes en estrategias terapéuticas contra la Leishmaniasis. *Biomédica.* **29**: 83-88.

- Chaudhary, R., Bilimoria, F., Katare, S. 2008. Diffuse cutaneous leishmaniasis: co-infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **74 (6)**:641-3.
- Chirinos, Y., Rodríguez, O., Moreno, M., Savage P., Sanchez, M. 2007. Efecto del Antibiótico Catiónico Esteroideo - 8 (CSA-8) sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania infantum/chagasi*. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **236**: 229.
- Chirinos, Y., Velasco, E., Mejía, E., Savage, P., Sanchez, M. 2010. Análisis ultraestructural de la acción leishmanioestática de los antibióticos catiónicos esteroideos. XIV Congreso Venezolano de Microscopía y microanálisis. Universidad de los Andes.
- Chirinos, Y., Rodríguez, O., Moreno, M., Savage P., Sanchez, M. 2008. Antibióticos Catiónicos Esteroideos (CSA-8, CSA-13) sobre Macrófagos infectados con *L. mexicana* y *L. infantum/chagasi*. *Acta Cient. Venez.* **59**.
- Convit, J., Castellanos, P., Ulrich, M. 1988. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet.* **1**: 401-5
- Croft, S., Engel, J. 2006. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trop. Med. Hyg.* **100**: S4-8
- Delgado, G., López, R.,Cuca, L. 2009. Búsqueda de principios activos antileishmania e inmunomoduladores en plantas colombianas de la Familia Annonaceae. *Biomédica.* **29**:239.
- Díaz, N., Fernandez, M., Figueira, E., Ramírez, R., Monsalve, I., Tapia, F. 2003. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* **28**: 1-6.
- Diaz, N., Zerpa, O., Ponce, L., Convit, J., Rondon, A., Tapia, F. 2002. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol.* **11(1)**:34-41.
- Ding, B., Ning, Y., Yang, L., Cardenas-García, J., Evanson, R., Orsak, T. y colaboradores. 2004. Origins of cell selectivity of Cationic Steroid Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 13642-13648.

- Epanand, R., Epanand, R., Savage, P. 2008. Ceragenins (cationic steroid compounds), a novel class of antimicrobial agents. *Drug News Perspect.* **21(6)**: 307-11.
- Fasel, N., Myler, P. 2008. *Leishmania: After the Genome*. Horizon Scientific Press, Edición ilustrada, Norfolk, UK.
- Granados, D., Coy, C., Cuca, L., Delgado, G. 2009. Actividad leishmanicida e inmunomoduladora de compuestos alcaloides y limonoides aislados de *Raputia heptaphyla* (Familia Rutacea). *Biomédica.* **29**:241.
- Howell, M., Streib, J., Kim, B., 2009. Ceragenins: A Class of Antiviral Compounds to Treat Orthopox Infections. *Journal of Investigative Dermatology.* **129**: 2668–2675.
- Killick-Kendrick, R., Molineux, W. 1981. Trasmision of leishmaniasis by the bite of a phlebotomine, possible mechanisms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 152-154.
- Laniado-Laborín, R., Cabrales-Vargas, M. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol.* **26(4)**:223-7.
- Lara, D., Feng, Y., Bader, J., Savage, P., Maldonado, R. 2010. Anti-Trypanosomatidae Activity of Ceragenins. *J Parasitol.* **96(3)**: 638-642.
- Launois, P., Swihart, K., Conceicao-Silva, F., Milon, G., Louis, J. 1996. T cell responses elicited by *Leishmania major* in mice. Págs. 129-137 en: Tapia, F., Mendoza, A., Cáceres-Dittmar, G., Sanchez, M.(eds). *Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis*. R.G. Landes Company, Primera Edición, Austin, Texas.
- Leiby, D., Kanasa-thasan, N., Scott, P., Nancy, C. 1994. Leishmaniasis. Págs. 87-117 en: Kierszenbaum, F. (Ed.). *Parasitic Infections and the Immune System*. Ac Press, San Diego, California.
- Li, C., Lewis, M, Gilbert, A., Noel, M., Scoville, D., Allman, G., Savage, P. 1999. Antimicrobial activities of amine and guanidine-functionalized cholic and acid derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **43**:1347-1351.

- Liew, F., O'Donnel, A. 1993. Immunology of Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. **32**: 194-259.
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., Sacks, D. 1999. Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* **180**: 564-7.
- López, R. 2000. Anfotericina B: Determinación en diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación a estudios farmacéuticos y de estabilidad química. Tesis de Doctorado. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona. España.
- Luque-Ortega, J., Sauger, J., Chiva, C., Andreu, D., Rivas, L. 2003. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem J.* **375**:221-230.
- Machado, P., Ampuero, J., Guimarães, L., Villasboas, L., Rocha, A., Schriefer, A., Sousa, R., Talhari, A., Penna, G., Carvalho, E. 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *Plos Negl Trop Dis.* **4(12)**: e912.
- Marsden, P. 1986. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80(6)**:859-76
- Marquardt, W., Demaree, R., Nieve, R. 2000. Parasite Vector Biology. Academic Press, Segunda Edición, San Diego, California.
- Mendez, S., Reckling, S., Piccirillo, C., Sacks, D., Belkaid, Y. 2004. Role for CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. *J. Exp. Med.* **200(2)**: 201-210.
- Mendonça-Previato, L., Todeschini, A., Heise, N., Previato, J. 2005. Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. *Curr Opin Struct Biol.* **15(5)**:499-505.

- Mendoza-León, A., Shaw, J., Tapia, F. 1996. A Guide for the Cutaneous Leishmaniasis Connoisseur. Págs. 1-23 en: Tapia, F., Cáceres-Dittmar, G., Sanchez, M., (Eds.). *Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis*. R.G. Landes Company, Primera Edición, Austin, Texas.
- Milani, N, Moreno M., Dorta A., Sanchez M. 2009. Use of digital morphometry to measure lesion size in *Leishmania (L.) mexicana* infected BALB/c mice. *International Symposium on Laboratory Animal Science ILAS. Abstract Book*. p9.
- Mosmann, T., Cherwinski H., Bond, M. 1986. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**: 2348-57.
- Muñoz, L., Delgado, G., Cuca, L., Robledo, S. 2009. Actividad leishmanicida de extractos de plantas colombianas de las familias Rutacea y Anonnaceae. *Biomédica.* **29**:236.
- Muskus, C., Marin, M. 2002. Metaciclogenesis: Un proceso fundamental en la biología de leishmania. *Biomédica.* **22**:167-177
- Pérez-Victoria, F., Castanys, S., Gamarro, F. 2003. *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective inward Translocation of the drug. *Antimicrob. Agents. Chemother.***47**: 2397-2403.
- Polat, Z., Savage, P., Genberg C. 2010. In Vitro Amoebicidal Activity of a Ceragenin, Cationic Steroid Antibiotic-13, Against *Acanthamoeba castellanii* and Its Cytotoxic Potential. *J Ocul Pharmacol Ther.*
- Ponte-Sucre, A., Gulder, T., Vollmers, G., Bringmann, G., Moll, H. 2010. Alterations to the structure of *Leishmania major* induced by N-arylisoquinolines correlate with compound accumulation in disposition. *J. Med. Microbiol.***59**: 69-75.
- Reyes, A., Arrivillaga, J. 2009. Fauna Mammalia asociada a los focos de leishmaniasis neotropical. Situación en Venezuela. *Bol. Mal. Salud.Amb.* **49**.
- Rey, L. 2001. Parasitos e Doencas Parasitarias Do Homen Nas Ameritas e Na Africa. *Leishmania e Leishmaniasis Os Parasitos*. Guanabara Koogan S.A, Brazil.

- Roy, M. 2002. Sulfonas y Sulfóxidos. Enciclopedia de Química Industrial. Wiley-VCH, Weinheim.
- Sanchez, M. 2000. Analysis of local T cell responses in experimental visceral leishmaniasis. Thesis submitted for the degree of doctor of philosophy at the faculty of medicine, University of London.
- Sanchez, M., Caceres-Dittmar, G., Oriol, O., Mosca, W., Kraal, G., Tapia, F. 1993. Epidermal Langerhans Cells and Dendritic Epidermal T Cells in murine cutaneous Leishmaniasis. Immunocytochemical study. *Acta microscópica*. **2(2)**: 180-187.
- Sanchez, M., Chirinos, Y., Rodríguez, O., Moreno, M., Savage P. 2009. Effect of two cationic steroid antibiotics (CSA-8, CSA-13) against *Leishmania infantum/chagasi* and *Leishmania mexicana*. *4th World congresss on Leishmaniasis. Abstract Book*. p15.
- Savage, P., Li, Ch., Taotafa, U., Ding, B., Guan Q. 2002. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*. **217**: 1-7.
- Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J., Mendoza-León, A., Benaim, G. 2009. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania Mexicana* and can induce parasitological cure in murine model of cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53(12)**: 5208-5113
- Schmidt, E., Boswell, S., Walsh, J., Schellenberg, M., Winter, T., Li, C. y colaboradores. 2001. Activities of cholic acid- derive antimicrobial agents against multidrug- resistant bacteria. *J.Antimicrob. Chem*. **47**: 671-674.
- Scott, P., Artis, D., Uzonna, J., Zaph C. 2004. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunological Reviews*. **201**: 318–338.
- Soto, J., Hernández, N., Mejía H., Groot, M., Berman J. 1995. Successful treatment of new World Cutaneous Leishmaniasis with a combination of topical paromycin/metilbenzetonium chloride and injectable meglumineantimoniate. *Infect. Dis*. **20**: 17-41.

- Tanimoto, M., 2007. El ejercicio de la medicina en la segunda mitad del siglo XX (tercera parte). Editorial siglo XXI, Segunda edición, D.F, México.
- Titus, R.G., Marchand, M., Boon, T., Lois, J.A. 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology*. **7(5)**: 545-555.

Web consultadas:

- <http://www.springerlink.com/content/qw3462752k20676j/>
- <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/reprints.html>.
- <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm>.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>,
- <http://www.informatics.jax.org>
- <http://www.jacoblab.com>
- <http://www.laberma.com>
- <http://www.vademecum.es>