

Tesis de Maestría en Parasitología

**Reciclaje farmacológico como estrategia
promisoria en el descubrimiento de
nuevos productos con actividad
antileishmanial**

Autora: Lic. Kirenía Oliva Pereiro

La Habana

2024



Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

Tesis de Maestría en Parasitología

**Reciclaje farmacológico como estrategia
promisoria en el descubrimiento de nuevos
productos con actividad antileishmanial**

Autora: Lic. Kirenia Oliva Pereiro

Tutora: Lic. Lianet Monzote Fidalgo, DrC.

La Habana

2024

Para la niña más hermosa de este mundo, hija mía, agradezco cada una de tus sonrisas y cada momento que compartimos juntas. Tú eres mi mayor motivación y todos mis esfuerzos han valido la pena porque has estado a mi lado, iluminándome con tu amor. Estoy muy orgullosa de ser tu madre.

Agradecimientos...

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutora de tesis, Lianet Monzote. Su experiencia, comprensión y paciencia contribuyeron que todo fuera posible.

Gracias infinitas a mis padres, por su amor incondicional y su apoyo moral. También a mi tía y abuela Bárbara que siempre me motivan a ser mejor.

Un sincero agradecimiento a todos mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino. Su apoyo, confianza, soporte y cariño han sido invaluable. A Niurka y Laura ya que su ayuda ha sido indispensable. A Ana, Rosemary, Amanda, Daniela y Claudia que son mi equipo de aliento y la familia que yo elegí.

A Harold que ha sido mi soporte en todo el proceso, gracias por brindarme apoyo incondicional en todos los aspectos.

A Idalia Sariego por sus oportunas revisiones y consejos.

A Hilda por su intensidad continua y por velar de este proceso para que los resultados fueran satisfactorios, a Mabel por su apoyo en el proceso experimental, acompañado de su paciencia.

A Dora Emma y Pedro que han sido partes fundamentales de mi formación.

La autora.

Resumen...

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoarios de diferentes especies del género *Leishmania*. El tratamiento se basa principalmente en la quimioterapia. Sin embargo, los fármacos disponibles para la leishmaniosis no satisfacen las necesidades, pues tienen diversos inconvenientes y limitaciones. En la actualidad, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniosis es una prioridad. En este sentido, el reciclaje farmacológico ha ido ganando espacio dentro de la industria farmacéutica para tratar enfermedades infecciosas. Este trabajo, tiene como objetivo evaluar la actividad antileishmanial de fármacos que se utilizan en la clínica para diferentes enfermedades. En este trabajo, se evaluó la actividad inhibitoria de 26 fármacos sobre promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*, así como su citotoxicidad en macrófagos de ratones BALB/c. De los productos seleccionados, se obtuvo la predicción de su diana molecular a través del programa computacional en línea 'PASS online'. El grupo farmacológico que mostró mayor actividad sobre promastigotes fueron los antineoplásicos, seguido de los antifúngicos y por último los antiparasitarios. Sin embargo, en general se observó poca selectividad, excepto para los fármacos de referencia y otros tres compuestos correspondientes a cada uno de los grupos farmacológicos. Estos compuestos selectivos, fueron evaluados sobre amastigotes de *L. amazonensis*, de los cuales los fármacos de referencia, el itraconazol y el cisplatino mostraron valores de $CI_{50} < 10 \mu M$. Mediante el programa 'PASS online' se identificó la lanosterol 14- α desmetilasa como posibles diana terapéutica antileishmanial para el itraconazol. Estos resultados brindan evidencias que motivan el reciclaje farmacológico como estrategia promisoriosa y se sugieren estudios futuros con otros grupos farmacológicos, así como corroborar los mecanismos de acción y los efectos en modelos animales de los productos seleccionados.

Palabras clave: *Leishmania amazonensis*, promastigotes, macrófagos, amastigotes, 'PASS online'.

Abreviaturas...

Abreviaturas

A

Abs: Absorbancias promedio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

C

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media

CEI: Comité de Ética Institucional

CENPALAB: Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio

CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media

CIDR: Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia

CITMA: Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente

D

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

E

ELISA: Ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida, de sus siglas en inglés *enzyme linked immune sorbent assay*

ETD: Enfermedad tropical desatendida

G

GDP: Guanosín difosfato

I

Ic: Inhibición de la viabilidad celular

IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

IS: Índice de selectividad

L

LC: Leishmaniosis cutánea

LCD: Leishmaniosis cutánea difusa

LDPK: Leishmaniosis dérmica post kala-azar

LMC: Leishmaniosis Mucocutánea

LR: Leishmaniosis recidivans

LV: Leishmaniosis visceral

M

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

O

OMS: Organización Mundial de Salud

P

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*

R

RI: Reducción de la infección

RPMI: medio de cultivo celular del inglés *Roswell Park Memorial Institute*

S

SFB: Suero fetal bovino

SSFE: Solución salina fisiológica estéril

Índice...

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	4
	II.1. Objetivo general.....	4
	II.2. Objetivos específicos.....	4
III.	MARCO TEÓRICO.....	5
	III.1. <i>Leishmania</i> y leishmaniosis.....	5
	III.1.1 Transmisión y ciclo de vida.....	6
	III.1.2 Formas clínicas.....	7
	III.1.3 Epidemiología.....	9
	III.1.4. Diagnóstico.....	10
	III.1.5. Control.....	11
	III.2. Tratamiento.....	12
	III.2.1. Tratamiento convencional.....	12
	III.2.2 Desarrollo de nuevos tratamientos.....	14
	III.3. RECICLAJE FARMACOLÓGICO.....	15
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
	IV.1. Cepa de <i>Leishmania</i> , obtención y mantenimiento.....	20
	IV.2. Productos a evaluar.....	21
	IV.3. Animales.....	22
	IV.4. Determinación de la actividad de los productos convencionales sobre promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>	23
	IV.5. Selección de los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.....	24
	IV.6. Evaluación de los fármacos antileishmaniales con mayor selectividad sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i>	25
	IV.7. Identificación las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio <i>in silico</i>	27
	IV.8. Operacionalización de las variables	27
	IV.9. Consideraciones éticas	28
	IV.10. Análisis estadístico	28
V.	RESULTADOS.....	29

V.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los fármacos sobre promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>	29
V.2. Selección de los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.....	31
V.3. Evaluación de los fármacos con mayor selectividad sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i>	34
V.4. Identificación las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio <i>in silico</i>	35
VI. DISCUSIÓN.....	37
VI.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los fármacos sobre promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>	38
VI.2. Selección de los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.....	41
VI.3. Evaluación de los fármacos con mayor selectividad sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i>	42
VI.4. Identificación las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio <i>in silico</i>	43
VI.5. Consideraciones generales.....	45
VII. CONCLUSIONES.....	47
VIII. RECOMENDACIONES.....	48
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

I. Introducción...

I. Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoarios intracelulares de diferentes especies del género *Leishmania* y representa un problema de Salud Pública en los países en vías de desarrollo de áreas tropicales y subtropicales y es considerada una enfermedad tropical desatendida (ETD) por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El parásito es transmitido por la picadura de insectos que actúan como vectores, siendo del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Andrade-Neto *et al.*, 2018; Bustamante *et al.*, 2019).

La enfermedad se presenta con una importante variabilidad clínica y epidemiológica. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis pueden variar desde lesiones cutáneas o mucocutáneas hasta lesiones viscerales mortales (Keighobadi *et al.*, 2019). En la leishmaniosis cutánea (LC) se produce una lesión que se desarrollan como una pápula en el sitio de la picadura y en la leishmaniosis mucocutánea (LMC) tiene lugar la destrucción de la mucosa y el cartílago oronasofaríngeo en la etapa tardía (Araujo *et al.*, 2016); mientras que la leishmaniosis visceral (LV) se caracteriza por la acumulación de parásitos en el hígado y el bazo que puede conducir a la muerte si no se trata (Bezerra-Souza *et al.*, 2019).

La enfermedad afecta aproximadamente a 300 millones de personas y causa de 20 a 30 mil muertes anuales. Aunque la leishmaniosis tiene una amplia distribución geográfica, se considera endémica en 98 países, siete de ellos representan el 90 % de los casos: Bangladesh, Brasil, India, Etiopía, Kenia, Nepal y Sudán. El número de casos nuevos de la enfermedad es incierto, pero es posible estimar un aumento de 200.000 a 400.000 nuevos casos de LV y 700.000–1.200.000 nuevos casos de LC por año (Andrade-Neto *et al.*, 2018). En general, estos nuevos casos causan dificultades socioeconómicas considerables, con un impacto mayor en las comunidades más pobres, lo que significa que los nuevos tratamientos antileishmaniales que se necesitan urgentemente tienen que ser asequibles y accesibles (Charlton *et al.*, 2018).

En la actualidad, no existe una vacuna efectiva para la leishmaniosis. El tratamiento se basa principalmente en la quimioterapia, con un número limitado de medicamentos que se emplean para el control de las infecciones por *Leishmania* (Keighobadi *et al.*, 2019). Los fármacos de primera línea son los derivados de antimonio pentavalente, y en casos

de fracaso terapéutico, se recomienda utilizar opciones de segunda línea como son la anfotericina B, la pentamidina, la paromomicina y la miltefosina (Braga, 2019; Bustamante *et al.*, 2019; Yamamoto *et al.*, 2020). Sin embargo, en general estos tratamientos no satisfacen las necesidades, pues tienen diversos inconvenientes y limitaciones, siendo los más importantes las numerosas reacciones indeseables debido a la alta toxicidad de la mayoría de fármacos y la necesidad de administración parenteral (Bustamante *et al.*, 2019; Yamamoto *et al.*, 2020). Además, los tratamientos requieren de varias semanas y muchas veces el paciente necesita ser hospitalizado para controlar los efectos tóxicos, lo que implica costos muy elevados. Estos factores hacen que la terapia sea inaccesible para muchos pacientes o luego resulten en acciones terapéuticas incompletas, ya sea por falta del seguimiento de la medicación o por desánimo del paciente, por lo que urge el desarrollo de nuevos medicamentos (Braga, 2019).

Para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, la reutilización o reposicionamiento de fármacos ha emergido como una estrategia prometedora (da Silva Rodrigues *et al.*, 2019) y ha demostrado ser exitosa para tratar las ETD, incluyendo la leishmaniosis (Abou-El-Naga *et al.*, 2020). Esta estrategia se basa en demostrar una nueva actividad terapéutica para un medicamento que existe para el tratamiento de otra enfermedad. En este caso, la reutilización de medicamentos es aquella investigación donde se demuestra una nueva actividad terapéutica para un medicamento que existe para el tratamiento de otra enfermedad (Andrade-Neto *et al.*, 2018).

El descubrimiento de nuevas aplicaciones clínicas para medicamentos es estratégico para reducir el costo y el tiempo de disponibilidad, dado que existe un conocimiento sobre los perfiles de seguridad toxicológica de las moléculas en estudio (Braga, 2019). En el caso de la leishmaniosis, la reutilización de fármacos se pone de manifiesto en la mayoría de los fármacos que hoy se utilizan en el manejo clínico de esta enfermedad, ya que surgieron a partir de esta estrategia. Ejemplo de ello son: (i) la anfotericina B, la cual es un antifúngico por excelencia; (ii) la pentamidina, un medicamento hipoglicemiante, (iii) la paromomicina, un antibiótico de amplio espectro y (ii) la miltefosina, diseñada como anticancerígeno (Andrade-Neto *et al.*, 2018; Braga, 2019).

Durante la pandemia de la COVID-19, se observó una explosión en el número de productos evaluados mediante el reposicionamiento farmacológico, lo que a su vez marcó pautas para la evolución de los estudios farmacológicos. Sin embargo, el reciclaje

farmacológico no debe aplicarse sin una estrategia llevada a cabo con racionalidad (Hamid *et al.*, 2024).

Aunque para la leishmaniosis se han evaluado un elevado número de medicamentos de diferentes aplicaciones clínicas, es conocido que para el reciclaje pudieran utilizarse fármacos de patógenos que sean cercanos desde el punto de vista filogenético, entre los que se encuentran parásitos de la misma familia como *Trypanosoma*, aquellos de la familia Apicomplexa (especies de *Plasmodium* y *Toxoplasma*), distantes como los protozoos extracelulares (*Giardia*, *Trichomonas*, etc...) o incluso aquellos de otros reinos pero que guardan similitudes como los hongos (Urbina, 2015). Finalmente, los anticancerígenos constituyen los principales compuestos que han demostrado su eficacia sobre agentes infecciosos, lo cual ha sido explicado por las características comunes entre los parásitos y las células tumorales (Hamid *et al.*, 2024).

Recientemente, se han descrito varios estudios utilizando la evaluación simultánea de un alto número de compuestos basados en tecnologías de avanzada que contribuyen a esta estrategia. Sin embargo, los resultados prometedores en el descubrimiento de nuevas alternativas antileishmaniales incluyen los ensayos clásicos de evaluación *in vitro* para la elección de los posibles candidatos para la reutilización (Braga, 2019). En este sentido, la diversidad biológica celular y la compleja interacción parásito-hospedero son aspectos relevantes (Weng *et al.*, 2018). Por otra parte, para lograr un mayor éxito en el desarrollo de fármacos es necesario tener en cuenta además los criterios internacionalmente establecidos para este fin (Hamid *et al.*, 2024).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos, en este estudio se evaluaron medicamentos que se utilizan como antiparasitarios, antifúngicos y antineoplásicos sobre *L. amazonensis*.

II. Objetivos...

II. Objetivos

II.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antileishmanial de fármacos que se utilizan en la clínica para el tratamiento de diferentes enfermedades.

II.2. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antileishmanial de fármacos que se utilizan en la clínica para el tratamiento de diferentes enfermedades sobre promastigotes de *L. amazonensis*.
2. Seleccionar los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.
3. Evaluar la actividad antileishmanial de fármacos que se utilizan en la clínica para diferentes enfermedades sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.
4. Identificar las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio *in silico*.

III. Marco Teórico...

III. Marco teórico

III.1. *Leishmania* y leishmaniosis

Los protozoos parásitos obligados del género *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae), son los agentes causales de la leishmaniosis. Se han descrito aproximadamente 53 especies de *Leishmania*, de ellas, 31 especies se conocen como parásitos de mamíferos y 20 especies son patógenas para los seres humanos (Akhoundi *et al.*, 2016). La OMS clasifica la leishmaniosis como una ETD, que afecta principalmente a la población de bajos ingresos de países en desarrollo (OMS, 2010). La leishmaniosis es endémica en aproximadamente 100 países de todo el mundo. Anualmente, se notifican más de 1,3 millones de casos nuevos, de los cuales entre 20.000 y 30.000 son mortales (Bustamante *et al.*, 2019).

El descubrimiento y la primera descripción del agente causal de la enfermedad fue en 1898 y 1901 por P. Borovsky, W. B. Leishman y C. Donovan (Weyers, 2016). No obstante, la clasificación taxonómica de este género es muy compleja y se divide en subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Ramírez *et al.*, 2016) (Figura 1). La clasificación de subdivisión fue propuesta por Lainson y Shaw (1987), que se basa en su ubicación dentro del tracto alimentario de los insectos. Las especies de *Leishmania* que pertenecen al subgénero *Viannia* maduran en el intestino posterior del flebótomo; mientras que las especies que pertenecen al subgénero *Leishmania* maduran en el intestino medio y anterior del flebótomo (Akhoundi *et al.*, 2016).

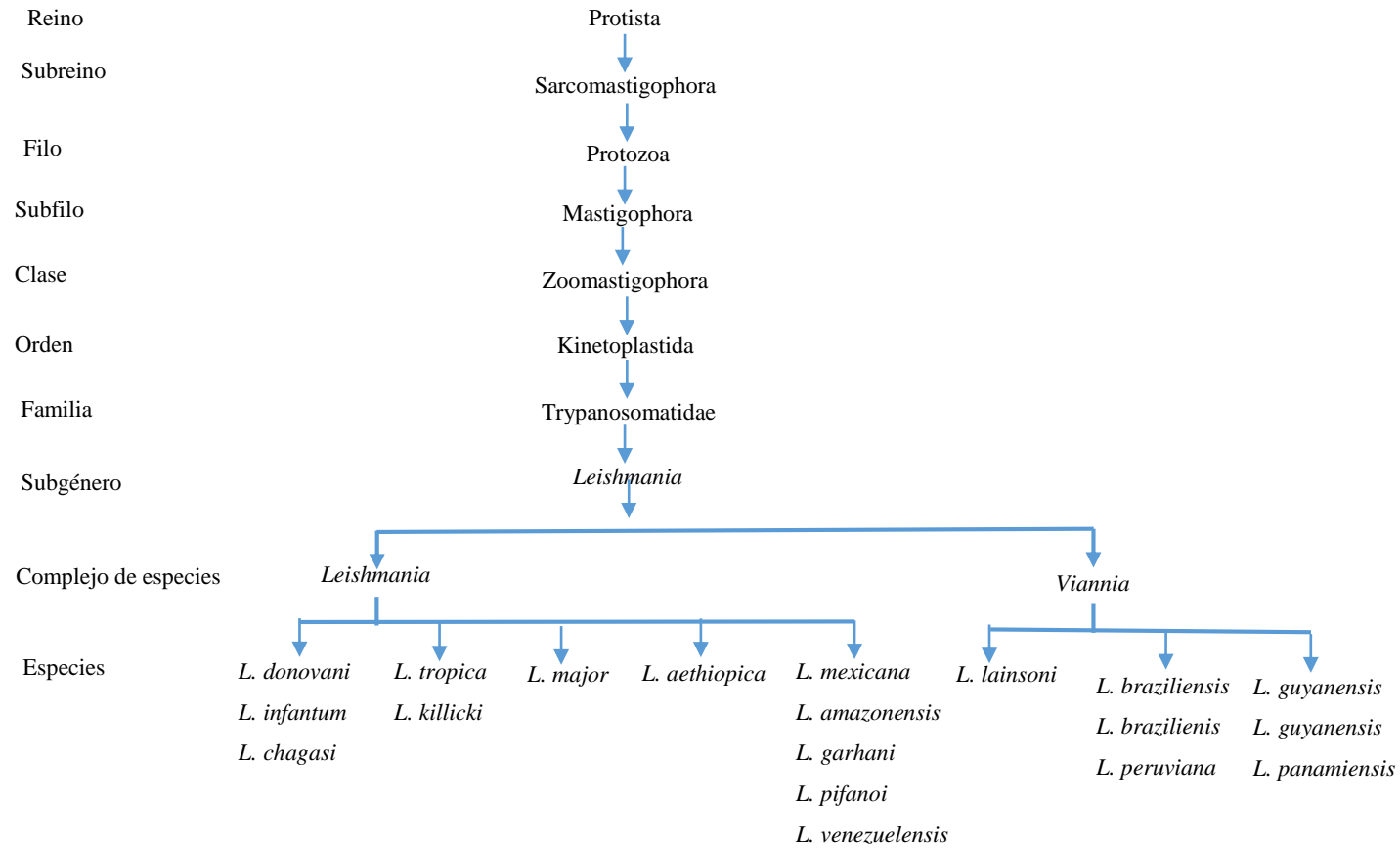


Figura 1. Clasificación taxonómica jerárquica del género *Leishmania* (Fuente: Raj *et al.*, 2020).

III.1.1. Transmisión y ciclo de vida

El parásito tiene un ciclo de vida digenético que alterna entre un huésped mamífero e insectos vectores (Figura 2). Se transmite por la picadura de insectos infectados de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Bustamante *et al.*, 2019). Estos son insectos pequeños (generalmente de 1,5 a 2 mm de longitud corporal) que se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Las hembras de los dos géneros son reconocidos como los únicos vectores comprobados de especies de *Leishmania* patógenas para los humanos (Dostálová y Volf, 2012).

El ciclo de vida de *Leishmania* consta de dos etapas sin fase sexual. El parásito sufre una diferenciación morfológica cada vez que se desplaza entre el huésped y el vector, en amastigotes y promastigotes. En los insectos vectores, el parásito se presenta en forma de promastigote, que se caracteriza por ser alargado, móvil y extracelular; mientras que en los vertebrados el parásito se encuentra en forma de amastigote. Los amastigotes son ovoides, inmóviles y de estadio intracelular (Sharma y Singh, 2008). Los insectos vectores al alimentarse de un hospedero vertebrado infectado, toman a los amastigotes de *Leishmania* junto con la sangre. Dentro del flebótomo, ocurre la primera diferenciación de los parásitos a promastigotes procíclicos (Gossage *et al.*, 2003). Las formas procíclicas se dividen en el intestino medio abdominal. Los promastigotes migran desde el intestino medio abdominal hacia la parte anterior del intestino medio donde finalmente se diferencian en promastigotes metacíclicos que pasan a la probóscide del insecto donde están listos para la transmisión al huésped (Sasidharan y Saudagar, 2021). El vector inyecta los promastigotes en la piel del huésped y poco después el parásito es absorbido por los macrófagos de la piel, donde se transforman en amastigotes entre 12 a 24 horas posteriores a la inoculación. Después de la transformación, los amastigotes se multiplican dentro del macrófago y, finalmente, el macrófago estalla liberando los amastigotes para infectar a otros macrófagos. Esta etapa es de naturaleza crónica y puede continuar durante meses o años, e incluso durante toda la vida sin signos ni síntomas perceptibles, dependiendo de la susceptibilidad del huésped y su estado inmunológico (Sharma y Singh, 2008).

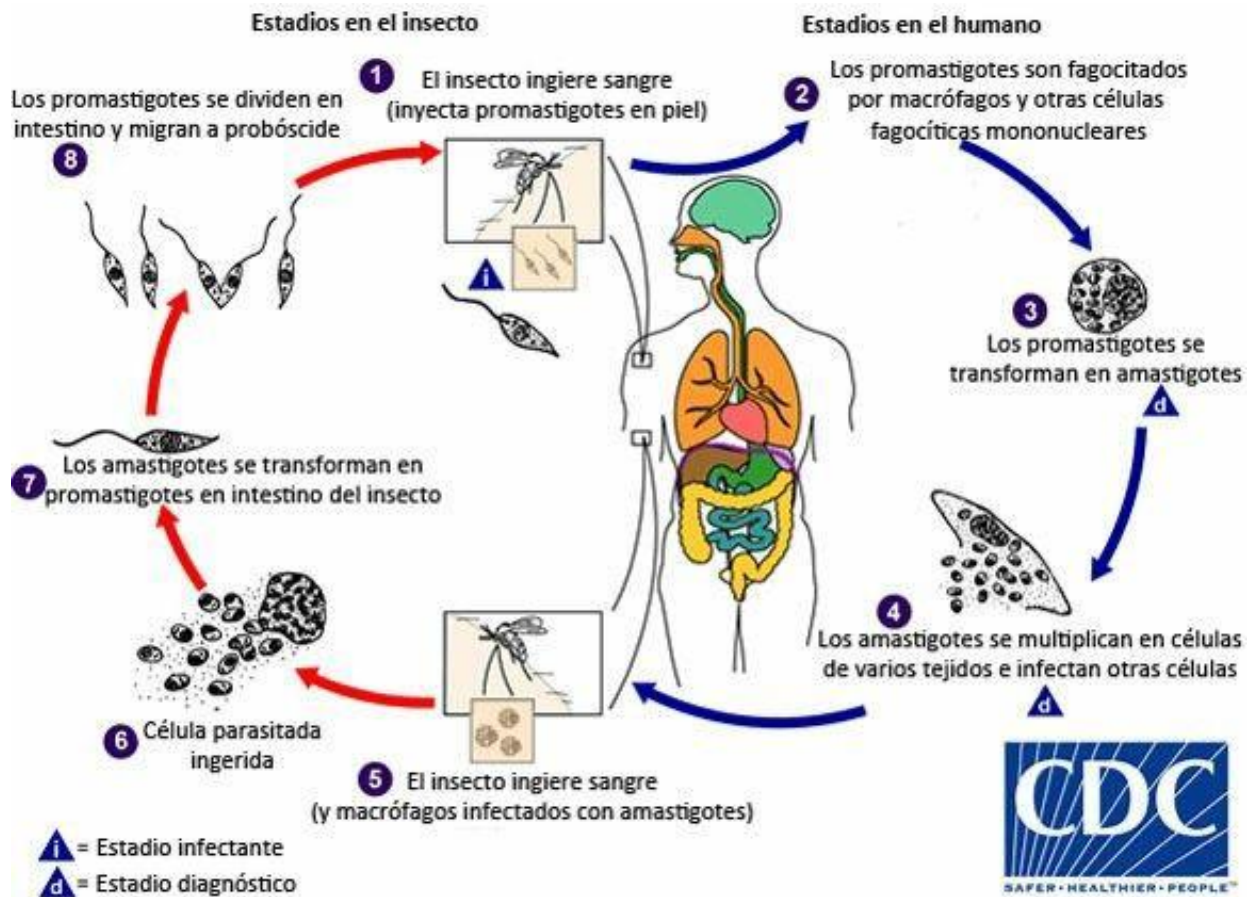


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>, acceso 27 de agosto de 2024).

III.1.2. Formas clínicas

Hay tres manifestaciones clínicas principales de la enfermedad: la LC, la LMC y la LV (Figura 3). Otros tipos raros se ramificaron más tarde como leishmaniosis cutánea difusa (LCD), leishmaniosis recidivans (LR) y leishmaniosis dérmica post kala-azar (LDPK) (Sasidharan y Saudagar, 2021).

La LC es la forma más común de leishmaniosis y suele autocurarse. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen úlceras crónicas en los sitios de picadura de insectos, que a menudo dejan cicatrices para toda la vida. La extensión de los síntomas varía dependiendo de la especie (de Vries y Schallig, 2022). *Leishmania major*, *L. aethiops* y *L. tropica* son las especies responsable de los casos de LC en el Región mediterránea, América, Asia central y Oriente Medio; mientras que en

América del Sur las especies responsables son *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Pavli y Maltezos, 2010).

La LMC es una variante rara y grave de LC, entre las cuales la mayoría de los casos son causados por *L. braziliensis*, aunque *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* también pueden producir esta manifestación clínica (Abadías-Granado *et al.*, 2021). Es caracterizado por lesiones de la mucosa que conducen a la destrucción parcial o completa de la mucosa de la nariz, garganta y boca. En este caso, la LMC pone en peligro la vida del paciente y causa lesiones masivas, que conducen a una desfiguración permanente. Requiere un diagnóstico precoz y un tratamiento rápido. La LMC es endémica de regiones de América Latina, especialmente Bolivia, Brasil y Perú (Gupta *et al.*, 2022a).

La LV también llamada kala-azar o fiebre negra es la forma más grave de leishmaniosis, donde se afectan órganos como la médula ósea, el bazo y el hígado, siendo fatal si no se trata. Los agentes causantes de la LV en el Viejo Mundo incluyen *L. donovani* y *L. infantum*; mientras que en el Nuevo Mundo es *L. chagasi* (sinonimia de *L. infantum*). Los síntomas clínicos de la enfermedad incluyen fiebre, pérdida de peso, anemia, y hepatoesplenomegalia, debido principalmente al aumento de la carga parasitaria en estos órganos. La hipersecreción de la hormona adrenocorticotrópica en LV conduce al ennegrecimiento de la piel de los pacientes, de lo cual se deriva su nombre local en la India como kala-azar (ELkhair, 2014). En la mayoría de los casos, los pacientes son asintomáticos durante la fase inicial de la infección y pueden desarrollarse hasta años más tarde (Gupta *et al.*, 2022a).



Figura 3. Principales manifestaciones clínicas de la leishmaniosis. A: leishmaniosis cutánea (Fuente: <https://images.app.goo.gl/KTTCQx4bhYFsth7w7>, acceso 27 de agosto de 2024); B: leishmaniosis mucocutánea (Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Leishmaniasis-mucocutanea-antes-del-tratamiento-Lesion-destructiva-del-labio_fig1_26811784, acceso 27 de agosto de 2024); C: leishmaniosis visceral. (Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Caso-de-Leishmaniasis-visceral_fig1_367624968, acceso 27 de agosto de 2024).

III.1.3. Epidemiología

Es endémica en más de 98 países, donde hay un total de 350 millones de personas en riesgo y 12 millones de casos de infección (Akhoundi *et al.*, 2016). No obstante, se reconoce que las cifras de casos de leishmaniosis notificados son inferiores a la carga real (Alvar *et al.*, 2012). A nivel mundial, la mayoría de los casos anuales ocurren en Asia occidental, Asia central, las Américas y la cuenca del Mediterráneo, pero se encuentra principalmente en el sudeste asiático, el este de África y Brasil (Sharma y Singh, 2008).

En este escenario, la leishmaniosis constituye actualmente un importante problema de salud pública mundial, mostrando una carga creciente durante la última década. Los

diez países que juntos representan entre el 70 % y el 75 % de la incidencia global estimada de LC son Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Siria y Sudán del Norte. La LMC se presenta exclusivamente en América del Sur, mostrando una mayor incidencia en Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Paraguay y Venezuela (Akhoundi *et al.*, 2016); aunque cabe destacar que alrededor del 90 % de los casos de LMC ocurren en Bolivia, Brasil y Perú (Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Más del 90 % de todos los casos de LV ocurren en solo seis países, entre ellos la Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur, siendo responsable de miles de muertes cada año (Akhoundi *et al.*, 2016). Sin embargo, en Cuba, no se reportan casos autóctonos de leishmaniosis, aunque se han presentado casos importados provenientes de diferentes áreas endémicas (Montalvo *et al.*, 2018).

III.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico inicial, sencillo, preciso y fiable es decisivo para el tratamiento adecuado, cura y erradicación de cualquier enfermedad en todo el mundo. Para el diagnóstico de la leishmaniosis existen varios métodos como parasitológicos, inmunológicos y moleculares (De Brito *et al.*, 2020). Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado ser un enfoque ideal debido al amplio espectro de características clínicas y variedades de especies involucradas en el desarrollo de la enfermedad (Kumari *et al.*, 2021). Los métodos de diagnóstico parasitológico detectan los amastigotes ya sea por microscopía directa o histopatología y la forma promastigote en cultivos (Sakkas *et al.*, 2016). Estos métodos se utilizan principalmente debido al bajo costo y el procedimiento sencillo. Se puede detectar parásitos a nivel de género, pero no a nivel de especie (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Por otra parte, los métodos inmunológicos son rápidos, no invasivos y detectan antígenos o anticuerpos de *Leishmania* en pacientes humanos (Kumari *et al.*, 2021). Sin embargo, la tuberculosis glandular y la lepra muestran cierta reactividad cruzada (Singh y Sivakumar, 2003). Dentro de estos métodos podemos encontrar la prueba de aglutinación directa, que constituye un ensayo semicuantitativo, rápido, sencillo y rentable. Los altos valores de sensibilidad y especificidad asociados a esta prueba la hacen perfecta para trabajos de campo y estudios de laboratorio (do Vale *et al.*, 2020). Otro de los métodos es la inmunofluorescencia, el cual constituye una técnica diagnóstica estándar para detectar la presencia de los parásitos durante la fase activa de

la enfermedad. La sensibilidad de esta técnica en pacientes inmunocompetentes oscila entre el 77 % y 100 % (Kumar *et al.*, 2020). El diagnóstico utilizando el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA, de sus siglas en inglés *enzyme linked immune sorbent assay*) es extremadamente sensible, pero la especificidad depende completamente del antígeno utilizado, por lo se requiere un antígeno altamente específico como reactivo inicial (de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). La sensibilidad de esta técnica oscila entre el 80 % y el 100 % (Kumar *et al.*, 2020). Se han registrado reacciones cruzadas entre pacientes con tripanosomiasis, tuberculosis y toxoplasmosis (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Por último, las técnicas de biología molecular son una alternativa eficaz a la detección por métodos convencionales, lo cual ha revolucionado el diagnóstico de la leishmaniosis. Presentan mayor sensibilidad y especificidad junto con la posibilidad de analizar cientos de muestras simultáneamente e identificar la especie infectante (Akhoundi *et al.*, 2016). Aunque se han desarrollado diferentes métodos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*) constituye el ensayo estándar (Akhoundi *et al.*, 2017). No obstante, en la actualidad, la utilización combinada de métodos parasitológicos clásicos con detección basada en la PCR ofrece un enfoque mejorado al diagnóstico de la leishmaniosis (Montalvo *et al.*, 2018).

III.1.5. Control

La estrategia de vacunación es el método más económico para la prevención de enfermedades infecciosas. En el caso de la leishmaniosis, se han desarrollado varios candidatos que aún están bajo investigación (Burza *et al.*, 2018). En este sentido, existen diferentes formas de vacunas: vacunas muertas, atenuadas, de antígenos totales o purificados, proteínas recombinantes o de subunidades y de ADN. Sin embargo, aunque algunos estudios de ensayos clínicos han informado resultados prometedores, en la actualidad no existe una vacuna registrada que prevenga la leishmaniosis (Ghorbani y Farhoudi, 2017).

Otro aspecto importante en el control de la leishmaniosis, son las medidas orientadas hacia los reservorios animales, tanto salvajes (gran jerbo, damanes, rata de arena, meriones, zarigüeya) como antroponóticos (perros). En el caso de los reservorios, en general las medidas van orientadas principalmente al control y eliminación en zonas pobladas o sitios de desarrollo de la agricultura (WHO, 2014).

Una estrategia eficaz para reducir la leishmaniosis humana es controlar los vectores, especialmente en zonas antropogénicas. Existen varios métodos de control, incluidos productos químicos, gestión ambiental y protección personal. Aunque algunos métodos pueden tener un fuerte efecto independiente sobre las poblaciones de flebotomos, se recomienda que el control de los flebotomos involucre más de un método (Stockdale y Newton, 2013).

III.2. Tratamiento

Hay varias terapias para las diversas formas de la leishmaniosis. Las preferencias por tratamientos de primera o segunda línea varían según la manifestación clínica de la enfermedad y a menudo es guiado por la práctica regional. En general, el antimonio pentavalente ha sido considerado el pilar del tratamiento de la leishmaniosis durante décadas; sin embargo, este agente tiene elevada toxicidad y es cada vez más ineficaz debido al desarrollo de resistencia del parásito. Se utilizan otros agentes alternativos en diferentes situaciones clínicas y guiados por la disponibilidad y efectividad en diferentes localidades como son: la anfotericina B, la pentamidina, la miltefosina y la paramomicina (Moafi *et al.*, 2019).

III.2.1. Tratamiento convencional

Los fármacos de elección para el tratamiento de LC y LV son los antimoniales pentavalentes, disponibles comercialmente en forma de antimoniato de meglumina (Glucantime®) o estibogluconato de sodio (Pentostam®) (Santana *et al.*, 2021). Estos fueron introducidos por primera vez en 1945 (Kumari *et al.*, 2021). Aunque son muy eficaces en diferentes partes del mundo, como África, han resultado ineficaces en la India debido a la aparición de cepas resistentes (Sundar *et al.*, 2010). El mecanismo de acción de los antimoniales no está bien estudiado y los autores plantean diferentes vías: (i) la forma pentavalente se reduce a forma trivalente mediante tioles o reductasa dependiente de tior, lo que provoca la inhibición de la tripanotona (factor de virulencia del parásito) que a su vez causa estrés oxidativo, (ii) la forma pentavalente puede estar directamente involucrada en la reducción de ADP y GDP (No, 2016), (iii) puede obstruir las principales vías metabólicas impulsadas por energía (oxidación de ácidos grasos, glucólisis y fosforilación de ADP), (iv) puede inducir estrés oxidativo mediante

el flujo continuo de tioles, lo cual desequilibra el mecanismo de defensa antioxidante del parásito (Ponte-Sucre *et al.*, 2017), y (v) puede causar fragmentación del ADN y muerte celular apoptótica (Roatt *et al.*, 2020). Los antimoniales tienen un costo bajo y se pueden administrar por vía intravenosa o intramuscular, y también se han aplicado por vía intralesional para el tratamiento de la LC. Aunque son efectivos, los informes de efectos secundarios son comunes en la terapia con antimoniales, como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, pancitopenia, niveles elevados de enzimas pancreáticas y en casos raros se ha reportado cardiotoxicidad (arritmia, taquicardia ventricular) (Sasidharan y Saudagar, 2021).

Una vez que las cepas resistentes al antimonio comenzaron a ser prominentes, la anfotericina B comenzó a utilizarse como fármaco de segunda línea. En su mecanismo de acción, se une al ergosterol alterando la fluidez de la membrana, lo que conlleva a la muerte celular (No, 2016). Otros mecanismos como la auto-oxidación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) también detienen la supervivencia del parásito (Singh *et al.*, 2016). Aunque ha mostrado una respuesta excelente en muchos individuos resistentes a los antimoniales, produce efectos secundarios importantes como nefrotoxicidad, hipopotasemia, escalofríos durante la infusión lenta junto con anafilaxia y, por lo tanto, los pacientes deben ser hospitalizados durante períodos largos de tiempo (Santana *et al.*, 2021).

Otro fármaco que se utiliza ampliamente como alternativa a la resistencia a los antimoniales es la pentamidina. Este fármaco se utiliza por vía intramuscular e intralesional (Sasidharan y Saudagar, 2021). Se plantea que el mecanismo de acción consiste en la inhibición de la topoisomerasa II mitocondrial, la síntesis de poliaminas e impide el sistema de transporte activo que conduce a la muerte del parásito (Madusanka *et al.*, 2022). Este fármaco presenta reacciones adversas graves, como nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, pancreatitis, hipoglucemia, leucopenia y anemia, que requieren un monitoreo constante del paciente (Santana *et al.*, 2021).

La miltefosina es el único fármaco oral disponible para la quimioterapia contra la leishmaniosis. El fármaco fue desarrollado como agente antineoplásico contra el cáncer de mama metastásico (Madusanka *et al.*, 2022). Los posibles mecanismos de acción son: (i) altera la composición de la membrana plasmática al inhibir el metabolismo de los fosfolípidos y el metabolismo de los alquil-lípidos (Pinto-Martinez *et al.*, 2018), (ii) daña las mitocondrias y obstruye la citocromo c oxidasa, causando la muerte celular

programada (Ponte-Sucre *et al.*, 2017), y (iii) aumenta la expresión de óxido nítrico sintetasa lo cual es tóxico para la supervivencia del parásito (Ortega *et al.*, 2022). Los principales efectos secundarios de este medicamento están asociados con eventos gastrointestinales, nefrotoxicidad y en ocasiones hepatotoxicidad, por lo que es necesario vigilar al paciente durante el tratamiento. Además, tiene efectos teratógenos y propiedades abortivas (Sasidharan y Saudagar, 2021).

La paromomicina es un antibiótico con una amplia gama de aplicabilidad clínica utilizado principalmente para infecciones intestinales. Ha mostrado efectividad contra la LC y la LV (Sasidharan y Saudagar, 2021). El medicamento se administra mediante inyección intramuscular lo que dificulta el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes que generalmente son de poblaciones de bajos recursos (Santana *et al.*, 2021). Al igual que otros fármacos, el mecanismo de acción sigue siendo incierto; aunque se demostró que produce la inhibición de la síntesis de proteínas del parásito, altera la fluidez de la membrana, y el metabolismo de los lípidos (Sasidharan y Saudagar, 2021). También causa efectos secundarios como nefrotoxicidad, ototoxicidad, aumento reversible de las transaminasas hepáticas y dolor en el sitio de la inyección (Santana *et al.*, 2021).

III.2.2. Desarrollo de nuevos tratamientos

La eficacia en el tratamiento de la leishmaniosis depende de una serie de factores relacionados con la susceptibilidad del parásito, la respuesta inmunológica del huésped, el medio ambiente, y el tipo de fármaco administrado (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). En la actualidad, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y compuestos de bajo costo, menos tóxicos y más efectivos para el tratamiento de la leishmaniosis es una prioridad. Sin embargo, hasta la fecha, se han realizado muy pocos avances para su tratamiento, utilizándose las mismas alternativas farmacológicas desde la década de 1940 (Santana *et al.*, 2021).

La creciente incidencia de resistencia a los medicamentos y la tasa de recaída en relación con la terapia de tratamiento convencional han hecho que los investigadores busquen críticamente una mejor alternativa con mayor efectividad y eficiencia. Con este objetivo, se han desarrollado varias estrategias, entre las que se incluye la terapia combinada de fármacos, la utilización de productos naturales la nanotecnología, la inmunoterapia y el reciclaje farmacológico (Kumari *et al.*, 2021).

En el caso de la terapia combinada de fármacos, los principales objetivos son reducir el curso del tratamiento, tasa de recaída, dosis, efectos secundarios letales y superación de la resistencia a los medicamentos (Sundar y Singh, 2018). Se han reportado disminuciones de la carga parasitaria en hígado y bazo en el caso de LV y reducciones del tamaño de la lesión en LC, en un modelo experimental murino (Kumari *et al.*, 2021).

En diferentes culturas y países, las plantas medicinales autóctonas se utilizan para tratar diversas enfermedades, especialmente la leishmaniosis. Muchos productos derivados de plantas, incluidas chalconas, terpenoides, naftoquinonas, neolignanós, lignanos, alcaloides, quinonas, oxilipina, flavonoides, saponinas y terpenos, han mostrado una actividad antileishmanial prometedora (Ghodsian *et al.*, 2020). Adicionalmente, se han aislado productos químicos con actividad antileishmanial de organismos marinos (Nweze *et al.*, 2021) y cianobacterias (Rivas y Rojas, 2019).

El uso de las nanopartículas es una opción viable debido a su biocompatibilidad, solubilidad mejorada del fármaco, distribución eficaz hasta el órgano diana e inmunocompatibilidad. En el caso de la leishmaniosis, las nanopartículas más utilizadas para la administración de fármacos son los derivados liposomales y las poliméricas (Ahmad *et al.*, 2022).

En los últimos años, la inmunoterapia se ha convertido en una opción atractiva ya que causa menos efectos secundarios que el tratamiento convencional, es rentable y potencialmente menos susceptible a la resistencia del parásito. Dentro de esta estrategia se incluyen la terapia con anticuerpos y vacunas basada en citocinas (Divenuto *et al.*, 2023).

III.3. Reciclaje farmacológico

La reutilización de fármacos (también llamada reposicionamiento o reperfilado de medicamentos) es una estrategia para identificar nuevos usos para medicamentos aprobados o en investigación para otras enfermedades distintas a la indicación original (Pushpakom *et al.*, 2018). Esta estrategia ha ido ganando espacio dentro de la industria farmacéutica, permitiendo reducir gastos y al mismo tiempo optimizar el tiempo de liberación por parte de las agencias reguladoras de salud (Santana *et al.*, 2021). Como los medicamentos ya han pasado por ensayos preclínicos se aprovechan sus perfiles de

seguridad conocidos, ya que se han sometido a extensas pruebas de seguridad y eficacia en humanos, lo que reduce el riesgo de efectos adversos inesperados cuando se utilizan para nuevos fines (Breckenridge y Jacob, 2019).

La reutilización de fármacos es una estrategia viable para abordar enfermedades raras y desatendidas, complementando algunas de las limitantes comerciales para el desarrollo de nuevos medicamentos, fundamentalmente en países de bajos recursos (López-Arencibia *et al.*, 2024). Durante la pandemia de la COVID-19, se observó una explosión en el número de productos evaluados mediante el reposicionamiento farmacológico, lo que a su vez marcó pautas para la evolución de los estudios farmacológicos. Sin embargo, el reciclaje farmacológico no debe aplicarse sin una estrategia llevada a cabo con racionalidad, lo cual es necesario para lograr un mayor éxito teniendo en cuenta además los criterios internacionales para el desarrollo de fármacos (Hamid *et al.*, 2024). En este sentido, la diversidad biológica celular, las asociaciones filogenéticas y la compleja interacción parásito-hospedero son algunos de los aspectos relevantes a tener en cuenta (Weng *et al.*, 2018).

En el tratamiento de la leishmaniosis, se han perfilado varios fármacos que hoy constituyen parte del arsenal terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad (Braga, 2019). Como se mencionó anteriormente, la anfotericina B es un agente antifúngico, la pentamidina, un medicamento hipoglicemiante, la paromomicina es un antibiótico aminoglucósido que se desarrolló para tratar infecciones intestinales; y la miltefosina se diseñó como agente antineoplásico (Braga, 2019; Kumari *et al.*, 2021). Actualmente, en la literatura científica, se pueden apreciar diferentes estudios de compuestos de diversos grupos farmacológicos que han sido estudiados sobre *Leishmania*, partiendo de la estrategia de reciclaje farmacológico (Tabla I).

Tabla I. Reportes en los últimos cinco años de compuestos activos sobre *Leishmania* spp. utilizando la estrategia de reciclaje farmacológico, según indicación para la que se utilizan en la clínica.

Indicación	Compuesto	Especie de <i>Leishmania</i>	Referencia
Antiarrítmico	Amiodarone	<i>L. major</i>	Bahrami <i>et al.</i> , 2021
Antibacteriano	Triclosan	<i>L. amazonensis</i>	Mesquita <i>et al.</i> , 2022
Antidepresivos	Clomipramina	<i>L. amazonensis</i>	da Silva <i>et al.</i> , 2019
	Escitalopram	<i>L. infantum</i>	Lima <i>et al.</i> , 2022
	Imipramina	<i>L. donovani</i>	Mukherjee <i>et al.</i> , 2021
	Tioridazina	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> y <i>L. major</i>	Sifontes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2024
Antifúngicos	Butenafina	<i>L. infantum</i>	Bezerra-Souza <i>et al.</i> , 2019
	Fluconazol	<i>L. major</i>	Keighobadi <i>et al.</i> , 2019
	Terconazol	<i>L. donovani</i> y <i>L. amazonensis</i>	López-Arencibia <i>et al.</i> , 2024
	Tolnaftato	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> y <i>L. infantum</i>	Yamamoto <i>et al.</i> , 2020
	Voriconazol	<i>L. major</i>	Bahrami <i>et al.</i> , 2021
Antihistamínico	ABT-239	<i>L. donovani</i> y <i>L. amazonensis</i>	López-Arencibia <i>et al.</i> , 2024
Antineoplásicos	Bortezomib	<i>L. donovani</i> y <i>L. amazonensis</i>	López-Arencibia <i>et al.</i> , 2024
	Ibrutinib	<i>L. donovani</i>	Varikuti <i>et al.</i> , 2019
	Sorafenib	<i>L. infantum</i>	Abou-El-Naga <i>et al.</i> , 2020
Antiparasitarios	Fexinidazol	<i>L. infantum</i>	De Moraes-Teixeira <i>et al.</i> , 2019
	Triclabendazol	<i>L. amazonensis</i>	Borges <i>et al.</i> , 2023
	Suramina	<i>L. donovani</i>	Khanra <i>et al.</i> , 2020
Antirreumatóides	Auranofin	<i>L. infantum</i>	Abou-El-Naga <i>et al.</i> , 2020

Tabla I. Continuación.

Indicación	Compuesto	Especie de <i>Leishmania</i>	Referencia
Antituberculoso	Rifabutin	<i>L. braziliensis</i>	Bustamante <i>et al.</i> , 2019
Antivirales	Lamivudina	<i>L. braziliensis</i>	Bustamante <i>et al.</i> , 2019
	Tenofovir	<i>L. braziliensis</i>	Bustamante <i>et al.</i> , 2019
Estimulante respiratorio	Almitrina	<i>L. donovani</i> y <i>L. amazonensis</i>	López-Arencibia <i>et al.</i> , 2024

Como se puede apreciar, en la actualidad, han sido explorados un amplio rango de fármacos sobre diferentes especies de *Leishmania* basada en la estrategia de reciclaje farmacológico, lo cual demuestra su utilidad (Charlton *et al.*, 2018). Tomando como evidencia las ventajas de la estrategia de reciclaje farmacológico y los estudios previos, resulta interesante continuar investigando los fármacos disponibles en el mercado para ampliar el arsenal terapéutico contra esta enfermedad. En particular, los antiparasitarios, antifúngicos y antineoplásicos, podrían constituir un intento exitoso en la evaluación de nuevos fármacos sobre *Leishmania*.

Los antiparasitarios constituyen una importante fuente de compuestos que han sido explorados como antileishmaniales. Por ejemplo, debido al linaje de taxonomía más cercano, algunos medicamentos antitripanosómicos se han reciclado para la leishmaniosis. En este caso, se encuentra la pentamidina (Charlton *et al.*, 2018) y el fexinidazol (Wyllie *et al.*, 2012; De Moraes-Teixeira *et al.*, 2019), utilizados para tratar la Tripanosomiasis Africana. Otro estudio interesante, está relacionado con la colección de 400 compuestos obtenidos de Medicamentos para Malaria, de los cuales se identificaron 14 medicamentos activos sobre *L. major* (Khraiwesh *et al.*, 2016).

Una segunda fuente de compuestos que han sido explorados como antileishmaniales son los antifúngicos, debido a que tanto los hongos como los tripanosomátidos tienen ergosterol como componente de su membrana citoplasmática y no colesterol (Urbina, 2015). En este sentido, los azoles antifúngicos representan un potencial grupo para ser evaluados sobre *Leishmania*. Entre ellos, por ejemplo, el fluconazol (Emad *et al.*, 2011), el terbinafine (Farajzadeh *et al.*, 2015) y el ketoconazol (Salmanpour *et al.*, 2001) han demostrado ser activos.

Finalmente, los anticancerígenos han demostrado su eficacia sobre *Leishmania*, identificados como los principales compuestos a ser reciclados sobre agentes infecciosos, lo cual ha sido explicado por las características comunes entre los parásitos y las células tumorales (Hamid *et al.*, 2024). Tanto las células cancerosas como *Leishmania* spp. tienen la capacidad de proliferar en un organismo huésped durante períodos de tiempo prolongados, y algunas enzimas inhibidas por anticancerígenos también pueden ser utilizadas en el desarrollo de terapias antileishmanial (Uliana y Barcinski, 2009). Diferentes compuestos utilizados para el tratamiento del cáncer han mostrado actividad antileishmanial. Además de los ejemplos recientes que se mostraron en la tabla 1, se ha reportado la actividad antileishmanial de la rapamicina (Khadir *et al.*, 2019), el tamoxifeno (Miguel *et al.*, 2008) y la camptotecina (Balaña-Fouce *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado, la actividad antileishmanial de un amplio grupo de estructuras han sido exploradas. A pesar de que es significativo el número de medicamentos utilizados en el proceso de descubrimiento de fármacos antileishmanial, nuevos estudios de reciclaje farmacológico constituyen una necesidad (Charlton *et al.*, 2018). Dentro de esta creciente estrategia, las metodologías de evaluación *in vitro*, combinada con el cribado *in silico*, contribuyen a acelerar el descubrimiento de fármacos más seguros, activos, compatibles con el paciente y comprender su mecanismo de acción sobre su diana farmacológica. Todos estos aspectos, conllevan al mejor diseño de nuevos tratamientos antileishmanial (Braga, 2019).

IV. Materiales y Métodos...

IV. Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de *Leishmania* del Departamento de Parasitología perteneciente al Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR) del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), La Habana, Cuba. Para ello, se utilizó un diseño experimental y se llevó a cabo en el período de septiembre de 2023 a septiembre del 2024.

Durante el desarrollo del estudio se aplicaron las Buenas Prácticas de Laboratorio acorde al Sistema de Gestión de Calidad implementado en el Laboratorio de *Leishmania* y se tuvieron en cuenta las medidas de bioseguridad planteadas en el Expediente Técnico de Seguridad Biológica del Laboratorio según la Resolución 180/2007 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA). Todos los utensilios, reactivos y equipamientos necesarios que se utilizaron cumplen con los requisitos para el trabajo en el laboratorio y con la certificación emitida por el fabricante. A continuación, se puntualizan los materiales y reactivos empleados, así como los procedimientos realizados.

IV.1. Cepa de *Leishmania*, obtención y mantenimiento

Para esta investigación se utilizaron promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/77/LTB0016), donados por el Departamento de Inmunología de la Fundación Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, Brasil, los cuales fueron mantenidos a 26 °C en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU), 10 % de suero fetal bovino (SFB; SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU) inactivado con calor (56°C durante 30 minutos) y antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 µg/mL; SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU) con pases cada 3-5 días, que corresponden con las fases de crecimiento logarítmico y estacionario, respectivamente (Monzote, 2003). En los experimentos, los parásitos que se emplearon no exceden de 10 pases de cultivo luego de ser aislados de lesiones cutáneas de ratones BALB/c infectados previamente con *L. amazonensis*, cumpliendo con la metodología del laboratorio de *Leishmania*, CIDR, IPK (Monzote, 1999).

IV.2. Productos a evaluar

En esta investigación, según la indicación, fueron incluidos 11 antiparasitarios, seis antifúngicos y nueve antineoplásicos (Tabla II), para un total de 26 fármacos que se utilizan en la clínica y se encontraban disponibles en el Laboratorio de *Leishmania* del IPK. Entre ellos, tres compuestos (pentamidina, anfotericina B y miltefosina) son considerados fármacos de referencia. De forma general, se prepararon soluciones madres de cada compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO; BDH, Poole, Inglaterra) y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de utilización.

Tabla II. Fármacos que se utilizan en la clínica con diferentes indicaciones evaluados en el presente estudio y su procedencia.

Indicación	Compuesto	Firma Comercial	Concentración de la solución madre (mM)
Antiparasitarios	Albendazol	Chagzhou Yabang, China	20
	Artemisina	Químicos Cayman, EE.UU	40
	Atovacuna	GlaxoSmithKline, Inglaterra	20
	Levamisol	Beijing Rosa ITTNL TRADING, China	20
	Metronidazol	Sigma, EE.UU	20
	Pentamidina*	Richet, Argentina	10
	Pirimetamina	Ipca Laboratories Ltd, India	2
	Secnidazol	Zhejiang Supor, China	20
	Sulfadiazina	Ipca Laboratories Ltd, India	10
	Tiabendazol	Hikal LTD, China	20
Tinidazol	Zhejiang Supor, China	20	
Antifúngicos	5-Fluorocitosina	Pfizer, Inglaterra	10
	Anfotericina B*	QUIMEFA. Cuba	2
	Clotrimazol	Jintan Zhongxing, China	20
	Fluconazol	Pfizer, Inglaterra	10
	Itraconazol	AARTI DRUGS, India	10
	Ketoconazol	AARTI DRUGS, India	20

*: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

Tabla II. Continuación.

Indicación	Compuesto	Firma Comercial	Concentración de la solución madre (µM)
Antineoplásicos	5-Fluorouracilo	Sigma-Aldrich, EE.UU	10
	Carboplatino	Sigma-Aldrich, EE.UU	10
	Ciclofosfamida	AICA, Cuba	10
	Cisplatino	Sigma-Aldrich, EE.UU	2,5
	Doxorrubicina	Sigma-Aldrich, EE.UU	10
	Metotrexato	Mac-Chem-Products, India	10
	Miltefosina*	Tropical Disease Research Program, Suiza	10
	Paclitaxel	Sigma-Aldrich, EE.UU	5
	Vincristina	Sigma-Aldrich, EE.UU	10

*: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

IV.3. Animales

Para la realización de los procedimientos experimentales se emplearon ratones BALB/c jóvenes, adultos sanos, con un peso corporal entre 18 y 22 gramos, que fueron suministrados por El Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Mayabeque, Cuba), los cuales presentaron su certificado de calidad. Los roedores se salvaguardaron cumpliendo con las normas para el uso de animales de experimentación como plantea la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (Relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, 22 de septiembre de 2010; DOUE-L-2010-81868) para aliviar y reducir el sufrimiento animal. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética (CEI) del IPK con el código CEI-IPK 36-42. El medio de alojamiento y alimentación de estos ratones estuvo dado por condiciones sanitarias convencionales: régimen cíclico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, alojamiento en cajas de macrolón T2 utilizando como cama bagazo de caña desmeollado y esterilizado por autoclave; alimentación con pienso concentrado

aportado por CENPALAB, y el agua a $6,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$; los cuales fueron proporcionados para ser consumidos libremente.

IV.4. Determinación de la actividad de los productos convencionales sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis*

La actividad de los compuestos sobre promastigotes se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar®, EE.UU) y se utilizó la estrategia propuesta por Cos y colaboradores en el año 2006, modificada y adaptada al laboratorio de *Leishmania* del IPK. Para ello, se añadieron 200 μL por pocillo de medio de cultivo Schneider (al 10 % de SFB y antibióticos como se mencionó en el acápite II.1.) en los pocillos de la columna 1 y 100 μL en el resto de la placa. A los pocillos de la columna 2 y 7, se le adicionaron 4 μL de cada producto a evaluar y 96 μL de medio. A partir de estas columnas, se realizaron cinco diluciones seriadas 1:2. Posteriormente, a todos los pozos se les adicionó 100 μL de una suspensión de promastigotes de *L. amazonensis* en fase de crecimiento logarítmico a una concentración de 10^6 parásitos/mL, excepto la columna 1 que se consideró como control de medio sin crecimiento y la columna 12 constituyó el control de crecimiento.

La placa se selló con Parafilm® (American National Can, Greenwich, Inglaterra) y se incubó a 26 °C. Después de 72 horas, se añadió a cada pocillo 10 μL de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a 3 μM , donde se incubó la placa nuevamente a 26 °C durante 4 horas. Se leyó la absorbancia en un lector de placas de 96 pocillos a una longitud de onda de 570 nm y 600 nm como longitud de onda de referencia, conforme a lo escrito en el instructivo Resazurin Cell Viability Assay Kit (Biotium Inc., EE.UU).

A continuación, se calcularon las medias de las absorbancias promedio (Abs) para cada concentración y la inhibición de la viabilidad celular (Ic) para cada concentración (Resazurin Cell Viability Assay Kit, Biotium Inc., EE.UU), según la fórmula planteada:

$$I_c = 100 - \frac{\text{Abs}_{\text{tratados } 570\text{nm}} - (\text{Abs}_{\text{tratados } 600\text{nm}} \times R_0)}{\text{Abs}_{\text{control de crecimiento } 570\text{nm}} - (\text{Abs}_{\text{control de crecimiento } 600\text{nm}} \times R_0)} \times 100$$

Donde:

$$R_0 = \frac{\text{Abs}_{570\text{nm, control de medio}}}{\text{Abs}_{600\text{nm, control de medio}}}$$

A partir de las concentraciones de cada producto y los valores de inhibición, se determinaron mediante una curva de regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2010, la CI_{50} , que se define como la concentración de producto que inhibe el 50 % del crecimiento respecto al cultivo de parásitos controles que no recibieron tratamiento. De cada producto se realizaron dos réplicas en cada placa y se repitió cada experimento tres veces en días diferentes. Los resultados fueron expresados como la CI_{50} promedio a partir del valor obtenido para cada experimento por separado con la desviación estándar (DE) correspondiente.

IV.5. Selección de los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

La citotoxicidad de los compuestos convencionales se determinó sobre la célula hospedera: macrófagos peritoneales de ratones sanos adultos-jóvenes de la línea BALB/c. El experimento se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo cónico (Greiner Bio-one®, Alemania) y se determinó la Concentración Citotóxica Media (CC_{50}), la cual se define como la concentración que causa la mortalidad del 50 % del número de células viables en comparación con cultivos controles no tratados.

Para ello, los animales fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical y se extrajeron las células residentes en el peritoneo mediante un lavado con medio RPMI 1640 (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a frío (4 °C) y se distribuyeron 150 μ L en cada pocillo de la placa, excepto la primera columna. Posteriormente, se incubó durante 2 horas a 5 % de CO_2 y a 37 °C. Luego, se retiró el sobrenadante con las células libres y se añadió 50 μ L de medio RPMI al 10 % de SFB y antibióticos en cada pocillo. A los pocillos de la columna 2 y 7, se le adicionaron 48 μ L de medio y 2 μ L de cada producto a evaluar. A partir de esta columna, se realizaron cinco diluciones seriadas de forma horizontal 1:2, tomando cada vez 50 μ L. La columna 1 se consideró como el control de medio sin crecimiento y la columna 12 constituyó el control de crecimiento. A toda la placa se le agregó nuevamente 50 μ L del medio con SFB y antibióticos y se incubó 48 horas a iguales condiciones que las anteriormente mencionadas. Tras la incubación, se adicionaron 15 μ L de solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT;

SIGMA, St. Louis, MO, EUA) que se preparó a razón de 5 mg de MTT/mL en solución salina fisiológica estéril (SSFE) al instante de su utilización y se incubó a las mismas condiciones. Pasadas 4 horas, se eliminó el sobrenadante, la sal de tetrazolio precipitada se disolvió en 50 μ L de DMSO y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 560 nm y 630 nm como referencia (Sladowski *et al.*, 1993). Los valores de absorbancia netas ($A_{560\text{nm}} - A_{630\text{nm}}$) fueron obtenidos para cada concentración de los productos evaluados y la CC_{50} se obtuvo a partir de la ecuación de regresión lineal en el programa de Microsoft Excel 2010. Los valores de CC_{50} para cada producto evaluado fueron expresados como la media de tres experimentos realizados por separado con su DE.

El índice de selectividad (IS) para cada producto fue calculado mediante la división de la CC_{50} para la célula hospedera entre la CI_{50} sobre promastigotes de *L. amazonensis* (previamente determinada en el acápite II.4). Los productos que mostraron un $IS > 10$ fueron seleccionados para continuar los estudios (Katsuno *et al.*, 2015).

IV.6. Evaluación de los fármacos con mayor selectividad sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*

Los productos que mostraron una $CI_{50} < 10 \mu\text{M}$ sobre promastigotes de *L. amazonensis* y un $IS > 10$, fueron seleccionados como promisorios (Katsuno *et al.*, 2015) y se determinó la actividad sobre los amastigotes intracelulares. Para ello, se realizó la extracción de macrófagos peritoneales como se describió en el acápite IV.5. y se distribuyó 1 mL en cada pozo de una placa de 24 pozos (Costar®, EE.UU), a la que previamente se le colocaron lamínulas estériles en el interior. Posteriormente, se incubó durante 2 horas a 5 % de CO_2 y a 37 °C. Luego, se retiró el sobrenadante con las células libres y la concentración de macrófagos se obtuvo mediante la resta de células cuantificadas por conteo en la cámara de Neubauer antes y después de la incubación. A continuación, se añadieron promastigotes de *L. amazonensis* en fase de crecimiento estacionaria (5 días de cultivo) que previamente se ajustaron a una concentración de manera tal que fueron añadidos cuatro parásitos por cada macrófago adherido en medio RPMI al 10 % de SFB y antibióticos y se incubó la placa nuevamente bajo las mismas condiciones durante 4 horas (Torres-Santos *et al.*, 1999).

Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante de la placa con los promastigotes libres, se adicionó 1 mL de medio RPMI fresco al 10 % de SFB y antibióticos. En la primera fila de la placa, se agregaron 995 μ L de medio con excepción del último pozo y 5 μ L de cada producto evaluado. A partir de este pozo, se llevaron a cabo diluciones seriadas 1:2 de forma vertical con 1 mL, eliminando el contenido del último pozo de la placa. Nuevamente, se incubó la placa durante 48 horas en una atmósfera de 5 % de CO₂ y a 37 °C y después de ello se retiró completamente el sobrenadante, se agregó 1 mL de metanol (SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU) por pozo y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se eliminó el metanol y se tiñeron los cultivos con 500 μ L/pozo de una solución de Giemsa (Quimefa, La Habana, Cuba) 1:4 (Giemsa:H₂O / v:v) donde se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución y se lavó cada lamínula por ambas caras con abundante agua corriente. Después de secados a temperatura ambiente durante 24 horas, fueron analizados los cultivos en un microscopio óptico bajo aceite de inmersión (E.P.B. Carlos J. Finlay, La Habana, Cuba) a 1000x. Se continuó determinando en las lamínulas teñidas el número de amastigotes en 100 macrófagos y el porcentaje de macrófagos infectados al analizar 100 macrófagos. Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de reducción de la infección (% RI) teniendo en cuenta el índice de sobrevivencia (ISob) en cada concentración de producto, según la fórmula (Delorenzi *et al.*, 2001):

$$\% \text{ RI} = 100 - \left(\frac{\text{Isob}_{\text{tratados}}}{\text{Isob}_{\text{controles}}} \times 100 \right)$$

Donde:

$$\text{Isob} = (\% \text{ de macrófagos infectados}) \times (\# \text{ de amastigotes por macrófago})$$

Los resultados se plantearon como la media \pm DE de dos experimentos por separado y la CI₅₀ se calculó a partir de las curvas dosis-respuesta mediante la ecuación de regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2010.

Finalmente, se clasificaron como compuestos activos sobre amastigotes aquellos con una CI₅₀ < 10 μ M (Katsuno *et al.*, 2015) y un IS > 10 respecto a amastigotes (división de la CC₅₀ para la célula hospedera determinada en el acápite IV.5 entre la CI₅₀ sobre amastigotes de *L. amazonensis*).

IV.7. Identificación las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio *in silico*

El SMILES de los compuestos seleccionados como activos en el experimento anterior fueron obtenidos en PubChem. Este término responde a la nomenclatura lineal para cada estructura molecular, conocida como sistema de introducción lineal molecular simplificada (SMILES del inglés *Simplified Molecular Input Line Entry System*). Cada SMILES fue insertado en un servidor en línea para una predicción de espectros de actividad de sustancias nombrado ‘PASS online’ (<https://www.way2drug.com/passonline/>). Automáticamente, se obtuvieron las predicciones de posibles actividades y ligandos con que interaccionan los compuestos. Para ello, se seleccionaron actividades con $P_a > 0,7$ (probabilidad de que la sustancia sea activa) y $P_i < 0,1$ (probabilidad de que la sustancia sea inactiva) (Filimonov *et al.*, 2014). En todos los casos, los datos se exportaron a Excel Microsoft 2010, se almacenaron en una hoja de cálculo y se analizaron cualitativamente acorde las dianas moleculares validadas para *Leishmania* spp. (Sundar y Singh, 2018).

IV.8. Operacionalización de las variables

Las variables a analizar en el presente estudio, así como su operacionalización se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Operacionalización de las variables en la presente investigación.

Nombre de la Variable	Naturaleza de la variable	Operacionalización	Mediciones
CI ₅₀	Cuantitativa continua	Número entero o decimal	Media y desviación estándar
CC ₅₀	Cuantitativa continua	Número entero o decimal	Media y desviación estándar
IS	Cuantitativa continua	Número entero o decimal	Índice

CI₅₀: Concentración que inhibe el 50 % del crecimiento parasitario.

CC₅₀: Concentración que causa la mortalidad del 50 % del número de células viables.

IS: Índice de selectividad.

IV.9. Consideraciones éticas

Los animales se mantuvieron en el Área de Riesgo Biológico II del Bioterio, IPK, bajo las normas y estándares internacionales como se describió anteriormente. Se aseguró la confidencialidad y seguridad de los resultados. Solo tuvieron acceso a los datos de investigación el personal previamente autorizado. Los sistemas de información presentaron implantadas las medidas de seguridad necesarias que evitaron la pérdida de los datos, la alteración de los mismos o que otras personas, no autorizadas, accedieran a ellos.

IV.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante la investigación se almacenaron en bases de datos del programa Microsoft Excel 2010. Anteriormente, se explicó que la obtención de las CI_{50} y la CC_{50} se realiza directamente de la ecuación de regresión lineal derivada de un gráfico de las diferentes concentraciones estudiadas de los productos convencionales (eje x) contra el efecto causado (eje y). En todos los casos, se expuso la media y la DE referente a las tres réplicas realizadas en diferentes días. Para comparar los valores de CI_{50} o CC_{50} entre los diferentes compuestos estudiados, se empleó la prueba de Mann-Whitney realizada a través del programa Statistica for Windows (Versión 10), considerándose significativos los valores de $p < 0,05$.

V. Resultados...

V. Resultados

En la presente investigación se evaluaron un total de 26 fármacos que se utilizan en la clínica, entre ellos 11 antiparasitarios, seis antifúngicos y nueve anticancerígenos. En cada grupo se incluyó un fármaco de referencia que se utiliza para el tratamiento de la leishmaniosis que surgió de la estrategia de reciclaje farmacológico, entre ellos la pentamidina, la anfotericina B y la miltefosina, respectivamente.

V.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los fármacos sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis*

La actividad de los productos frente a promastigotes se muestra en la tabla IV. De forma general, de los 26 fármacos, 20 compuestos (76,9 %) inhibieron el crecimiento de *L. amazonensis*. Los fármacos que presentaron mayor actividad fueron los antineoplásicos (100 %) > antifúngicos (83,3 %) > los antiparasitarios (54,5 %). Sin embargo, solo seis mostraron una $CI_{50} < 10 \mu\text{M}$, correspondiéndose a los fármacos de referencia (pentamidina, anfotericina B, y miltefosina) y un compuesto de cada grupo en el siguiente orden (de más a menos activos): pirimetamina > cisplatino > itraconazol.

Tabla IV. Concentración Inhibitoria Media de los fármacos evaluados sobre promastigotes de *L. amazonensis* (por orden alfabético según grupo de clasificación de los compuestos).

Clasificación	Compuesto	CI ₅₀ ± DE	
		µM	µg/mL
Antiparasitarios	Albendazol	> 200	> 200
	Artemisina	59,8 ± 3,0	16,9 ± 0,8
	Atovacuna	12,4 ± 0,6	4,6 ± 0,2
	Levamisol	> 200	104,6 ± 5,2
	Metronidazol	> 200	> 200
	Pentamidina*	2,6 ± 0,2	0,9 ± 0,05
	Pirimetamina	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,01
	Secnidazol	> 200	> 200
	Sulfadiazina	23,8 ± 1,2	7,4 ± 0,4
	Tiabendazol	113,8 ± 5,6	22,9 ± 1,1
Tinidazol	> 200	> 200	
Antifúngicos	5-Fluorocitosina	> 200	> 200
	Anfotericina B*	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,02
	Clotrimazol	53,4 ± 2,7	18,4 ± 0,9
	Fluconazol	104,5 ± 5,2	32,0 ± 1,6
	Itraconazol	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	Ketoconazol	53,6 ± 2,7	28,5 ± 1,4

Tabla IV. Continuación.

Clasificación	Compuesto	CI ₅₀ ± DE	
		μM	μg/mL
Antineoplásicos	5-Fluorouracilo	30,6 ± 1,5	4,0 ± 0,2
	Carboplatino	13,0 ± 1,7	4,8 ± 0,2
	Ciclofosfamida	63,3 ± 3,2	16,5 ± 0,8
	Cisplatino	1,1 ± 0,6	0,3 ± 0,01
	Doxorrubicina	95,7 ± 4,8	52,0 ± 2,6
	Metotrexato	67,8 ± 3,4	30,8 ± 1,5
	Miltefosina*	2,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
	Paclitaxel	28,3 ± 1,4	23,7 ± 1,2
	Vincristina	23,3 ± 1,2	19,2 ± 0,9

*: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

CI₅₀: Concentración que inhibe el 50 % del crecimiento parasitario.

DE: desviación estándar de la media aritmética.

V.2. Selección de los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

En la tabla V se resumen las CC₅₀ de los compuestos evaluados sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. Puede observarse que solamente nueve (34,6 %) fármacos resultaron no citotóxicos a la concentración máxima evaluada (200 μM). Los compuestos más citotóxicos se encontraron en el grupo de los antineoplásicos (100 %) > antifúngicos (33,3 %) > antiparasitarios (36,4 %), con valores de CC₅₀ < 100 μM.

Tabla V. Concentración Citolóxica Media de fármacos evaluados sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (por orden alfabético según grupo de clasificación de los compuestos).

Clasificación	Compuestos	CC ₅₀ ± DE	
		µM	µg/mL
Antiparasitarios	Albendazol	143,2 ± 7,1	38,0 ± 1,9
	Artemisina	> 200	56,5 ± 2,8
	Atovacuona	21,5 ± 1,1	7,9 ± 0,4
	Levamisol	> 200	> 200
	Metronidazol	> 200	> 200
	Pentamidina*	39,9 ± 2,0	1,3 ± 0,06
	Pirimetamina	10,1 ± 0,5	2,5 ± 0,1
	Secnidazol	> 200	> 200
	Sulfadiazina	20,3 ± 1,1	6,3 ± 0,3
	Tiabendazol	> 200	99,5 ± 4,9
Tinidazol	> 200	> 200	
Antifúngicos	5-Fluorocitosina	> 200	> 200
	Anfotericina B*	7,5 ± 0,4	6,9 ± 0,3
	Clotrimazol	> 200	72,2 ± 3,6
	Fluconazol	171,1 ± 6,5	52,4 ± 2,6
	Itraconazol	37,3 ± 1,9	26,3 ± 1,3
	Ketoconazol	> 200	138,6 ± 6,9

Tabla V. Continuación.

Clasificación	Compuestos	CC ₅₀ ± DE	
		μM	μg/mL
Antineoplásicos	5-Fluorouracilo	100,0 ± 4,3	13,0 ± 0,6
	Carboplatino	70,6 ± 3,5	26,2 ± 1,3
	Ciclofosfamida	80,2 ± 4,0	20,9 ± 1,0
	Cisplatino	105,1 ± 4,9	30,1 ± 1,5
	Doxorrubicina	10,7 ± 0,5	5,8 ± 0,9
	Metotrexato	100,5 ± 3,8	45,4 ± 2,7
	Miltefosina*	49,6 ± 2,5	20,3 ± 1,0
	Paclitaxel	56,4 ± 2,8	47,1 ± 2,3
	Vincristina	40,4 ± 2,0	33,3 ± 1,7

*: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

CC₅₀: Concentración que causa la mortalidad del 50 % del número de células viables.

DE: desviación estándar de la media aritmética.

Posteriormente, se calculó el IS de todos los compuestos incluidos en el estudio. En la Figura 5 puede apreciarse que dos compuestos presentaron un IS = 5 y otros seis productos muestran valores superiores a 10. Entre estos últimos se encuentran la pirimetamina, itraconazol, cisplatino y los fármacos de referencia pentamidina, anfotericina B, y miltefosina, resultando los más activos sobre promastigotes de *L. amazonensis* y de mayor selectividad por el parásito. En particular, los tres compuestos mencionados (pirimetamina, itraconazol y cisplatino) mostraron IS superiores a los fármacos de referencia, resaltando entre ellos el cisplatino.

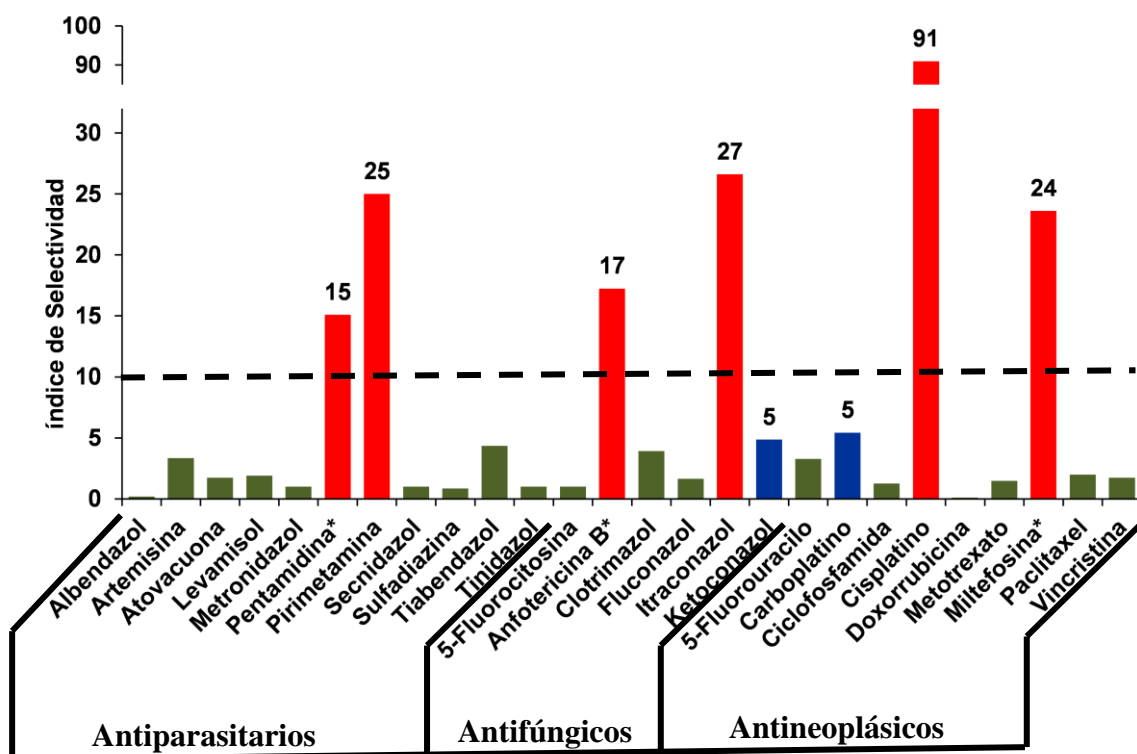


Figura 5. Índice de selectividad (IS) de los compuestos evaluados (por orden alfabético según grupo de clasificación de los compuestos). En verde los productos con un IS < 5, en azul aquellos con un IS entre 5 – 10 y en rojo los que presentan un IS > 10. La franja discontinua horizontal indica el valor de corte en un IS de 10. *: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

Teniendo en cuenta la actividad y selectividad observada, la pirimetamina, el itraconazol, el cisplatino y los fármacos de referencia fueron seleccionados para la siguiente fase de experimentación.

V.3. Evaluación de los fármacos con mayor selectividad sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*

Los seis productos evaluados fueron capaces de inhibir el crecimiento de amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (Tabla VI). Sin embargo, valores de $CI_{50} < 10$ fueron observados para los fármacos de referencia, el itraconazol y el cisplatino. Resulta interesante destacar que solo el cisplatino mostró valores similares ($p > 0,05$) al fármaco de referencia incluido en su grupo.

Tabla VI. Concentración Inhibitoria Media de los fármacos seleccionados sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (por orden alfabético según grupo de clasificación de los compuestos).

Clasificación	Compuesto	CI ₅₀ ± DE	
		µM	µg/mL
Antiparasitarios	Pentamidina*	3,4 ± 0,6 ^b	1,2 ± 0,2
	Pirimetamina	36,5 ± 1,82 ^e	9,1 ± 0,5
Antifúngicos	Anfotericina B*	0,03 ± 0,002 ^a	0,03 ± 0,01
	Itraconazol	6,5 ± 0,32 ^c	4,6 ± 0,2
Antineoplásicos	Cisplatino	8,3 ± 0,42 ^d	2,5 ± 0,1
	Miltefosina*	9,2 ± 0,46 ^d	3,8 ± 0,2

*: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

CI₅₀: Concentración que inhibe el 50 % del crecimiento parasitario.

DE: desviación estándar de la media aritmética.

IS: Índice de selectividad

Letras diferentes significan diferencias significativas respecto al resto de los compuestos para una $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta que el itraconazol y el cisplatino mostraron valores de CI₅₀ inferiores a 10 µM, se determinó su selectividad respecto a la citotoxicidad observada. En este caso, el itraconazol mostró un IS > 5 y el cisplatino superior a 10 (Figura 6).

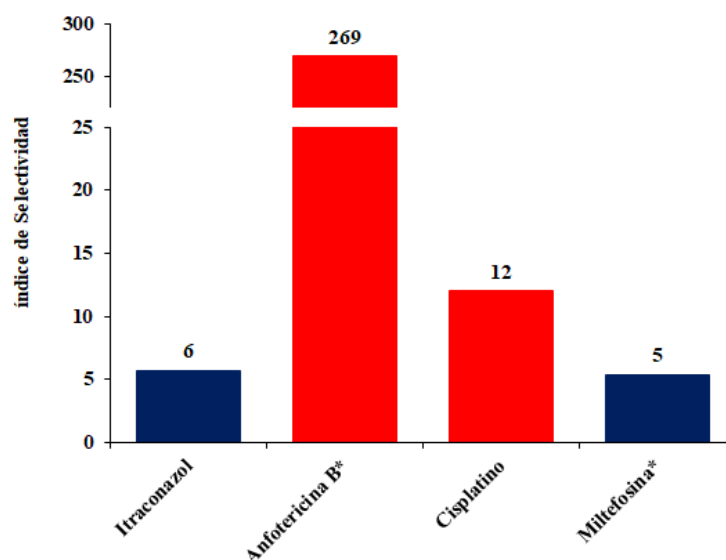


Figura 6. Índice de selectividad (IS) de los compuestos evaluados. En azul aquellos con un IS entre 5 – 10 y en rojo los que presentan un IS > 10. *: Fármacos de referencia que se utilizan en el tratamiento clínico de la leishmaniosis.

V.4. Identificación las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio *in silico*

Utilizando la herramienta en línea ‘PASS online’, se determinaron las posibles actividades y dianas terapéuticas del itraconazol y el cisplatino, los cuales demostraron una $CI_{50} < 10 \mu\text{M}$. En la tabla VII, se muestran los resultados para el itraconazol obtenidos con un $Pa > 0,7$. En el caso del cisplatino el programa no fue capaz de determinar los posibles ligando ya que presenta en su estructura química menos de tres carbonos.

Tabla VII. Predicción de actividades biológicas y ligandos obtenidos del itraconazol a través del programa en línea 'PASS online' (organizados por valores de *Pa*).

<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Actividad biológica
0,846	0,003	Antimicótico
0,706	0,005	Antimicobacteriano
<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Ligandos
0,980	0,000	Inhibidor lanosterol 14- α desmetilasa
0,839	0,002	Inhibidor CYP17
0,832	0,001	Inhibidor CYP51
0,730	0,004	Inhibidor citocromo P450

Pa: Probabilidad de que la sustancia sea activa.

Pi: Probabilidad de que la sustancia sea inactiva.

VI. Discusión...

VI. Discusión

La leishmaniosis es una enfermedad compleja a nivel mundial que impacta a las comunidades de áreas endémicas. Adicionalmente, la distribución de nuevos casos en países tropicales y subtropicales, así como el aumento en el número de viajeros sugieren un aumento en el riesgo de infección (Kmetiuk *et al.*, 2020). Debido a las dificultades para el control de vectores y el limitado éxito en el desarrollo de vacunas, ha convertido a la utilización de quimioterapéuticos como la principal opción para el manejo de la leishmaniosis (Roberts, 2006). Sin embargo, los medicamentos convencionales causan efectos tóxicos, requieren largos periodos de tratamientos a altos costos y la resistencia ha emergido como una agravante (Corman *et al.*, 2023). Por lo tanto, constituye una necesidad la identificación y desarrollo de nuevos agentes antileishmanial.

Durante las últimas décadas, las investigaciones para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis se han enfocado en la LV; mientras que la búsqueda de compuestos para la LC han tenido menor prioridad (Corman *et al.*, 2023). Esto se debe a que esta forma de la enfermedad a pesar de presentar un curso crónico puede ser auto-limitada, incluso llevar a la auto-curación en pacientes inmunocompetentes (De Vries y Schallig, 2022). Sin embargo, la LC, constituye la manifestación clínica de mayor prevalencia y hasta 1 millón de nuevos casos son reportados por año. Adicionalmente, se ha observado un aumento en las complicaciones de esta forma clínica en pacientes con co-morbilidades (por ejemplo, pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana), la aparición de lesiones desfigurantes debido a la destrucción irreversible de tejidos y linfangitis nodular (De Vries y Schallig, 2022).

Las Américas representan un escenario especial, no solo por la presencia de esta forma de la enfermedad, sino también por la alta carga que representa esta parasitosis debido a la morbilidad que causa y el número de diferentes especies que pueden circular en una misma área geográfica (Ramirez *et al.*, 2016). En particular, un alto número de investigadores centran sus estudios en *L. amazonensis*, una especie predominante en esta región geográfica que causa la LC y la LCD (McMahon-Pratt y Alexander, 2004). De forma general, la infección causada por esta especie se caracteriza por ser crónica, con abundantes infiltrados dérmicos masivos y presenta características clínicas,

inmunológicas y anatómo-patológicas que difieren de otras especies que causan LC en el continente (Costa *et al.*, 2009). Por otra parte, la no respuesta al tratamiento convencional es frecuente (Silveira, 2019). En este sentido, la posibilidad de reciclar desde el punto de vista farmacológico fármacos que se utilizan en la clínica para otras enfermedades constituye una alternativa atractiva. Esta estrategia constituye un mecanismo universal para la innovación, que disminuye el tiempo y costo para que un producto pueda ser utilizado en la clínica.

Aunque para la leishmaniosis se han evaluado un elevado número de medicamentos de diferentes aplicaciones clínicas, nuevos estudios son necesarios en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniosis. En este estudio, se incluyeron medicamentos que se utilizan como antiparasitarios, antifúngicos o antineoplásicos. En cada grupo, además, se incluyó un medicamento que se utiliza en la clínica para el tratamiento de la leishmaniosis, lo cual representa una fortaleza de los grupos seleccionados como estrategia de reciclaje farmacológico racional.

VI.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los fármacos sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis*

Los promastigotes de *Leishmania* son formas que crecen libremente en medio de cultivo y son utilizados comúnmente para la evaluación de nuevos candidatos antileishmanial. Estos ensayos son fáciles, menos costosos, rápidos y con alta reproducibilidad (Hendrickx *et al.*, 2019), por lo cual fueron utilizados como primer modelo para la evaluación de los fármacos seleccionados.

De forma general, en este ensayo se observó que más del 70 % de los compuestos (20) fueron capaces de inhibir el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis*. Entre estos, 18 fármacos mostraron CI_{50} inferiores a 100 μM y solo seis a 10 μM , entre estos los tres compuestos de referencia.

En particular, resalta el grupo de los anticancerígenos, entre los cuales todos inhibieron el crecimiento de *Leishmania*, con valores de CI_{50} entre 1,1 a 95,7 μM . Estas evidencias corroboran la hipótesis planteada por Rashidi y colaboradores (2021), los cuales sugirieron que el reciclaje farmacológico de los fármacos anticancerígenos constituía una estrategia útil en la búsqueda de nuevos candidatos contra la leishmaniosis. En particular, los parásitos y las células tumorales se caracterizan por una rápida

proliferación, la cual precisa de una alta síntesis de nucleótidos para la división celular que conlleva a un elevado metabolismo y generación de radicales libres (Hamid *et al.*, 2024).

De este grupo, la miltefosina mostró una buena actividad antileishmanial, con una $CI_{50} = 2,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Este fármaco ha sido recomendado para el tratamiento de la LC causada por *L. guyanensis* y *L. panamensis* (Oliveira *et al.*, 2011); y recientemente, Cabral y colaboradores (2024) reportaron una CI_{50} de $0,034 \mu\text{M}$ para promastigotes de *L. amazonensis*. Sin embargo, algunas investigaciones indican que otras especies son más resistentes (Madusanka *et al.*, 2022).

Entre el resto de los compuestos antineoplásicos, el cisplatino fue el que demostró una CI_{50} inferior a $10 \mu\text{M}$, que fue incluso estadísticamente mejor ($p < 0,05$) que la actividad demostrada por la miltefosina ($CI_{50} = 1,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$ vs $2,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$, respectivamente). El cisplatino es un agente basado en el platino que fue el primero en ser desarrollado en esta familia para la quimioterapia de varios tipos de cáncer (Su *et al.*, 2022). Estudios anteriores, demostraron la actividad del cisplatino sobre promastigotes de *L. infantum* ($CI_{50} = 7,73 \pm 1,03 \mu\text{M}$), especie que causa la LV (Tavares *et al.*, 2007).

Aunque los otros anticancerígenos evaluados mostraron valores de CI_{50} superiores a $10 \mu\text{M}$, son resultados similares a otros reportados en la literatura científica. Por ejemplo, el 5-fluorouracilo (Azzouz y Lawton, 2017) y el metotrexato (Bigot *et al.*, 2023) han demostrado actividad sobre promastigotes de *L. donovani* o *L. infantum*, y *L. major*, respectivamente.

En segundo lugar, cinco de los antifúngicos evaluados mostraron actividad sobre promastigotes de *L. amazonensis*. Solo la 5-fluorocitosina no fue capaz de inhibir el crecimiento a la máxima concentración evaluada ($200 \mu\text{M}$); mientras que el fluconazol mostró una CI_{50} superior a $100 \mu\text{M}$ ($CI_{50} = 104,5 \pm 5,2 \mu\text{M}$). Los antifúngicos son entre los productos anti-infecciosos el grupo que más se ha evaluado para el tratamiento de la leishmaniosis, debido a la presencia de ergosterol y esteroides en la membrana de los hongos y los trypanosomatídeos en lugar del colesterol presente en las membranas de las células de mamíferos (Urbina, 2015). En este grupo, la mayor inhibición fue observada para la anfotericina B ($CI_{50} = 0,4 \pm 0,02 \mu\text{M}$), la cual es considerada el

compuesto más activo sobre *Leishmania* y es reservada como segunda línea por la elevada toxicidad que causa (Dos Santos *et al.*, 2020).

Los azoles (fluconazol, ketoconazol e itraconazol) han sido compuestos atractivos para el tratamiento de la LC, incluso en ensayos clínicos. Sin embargo, discrepancias han sido documentadas en la literatura científica relacionadas con la especificidad de la especie. Por ejemplo, la eficacia de estos azoles para *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. braziliensis* y *L. tropica* oscilan entre un 15 al 89 % (Madusanka *et al.*, 2022). En este estudio, se apreciaron marcadas diferencias entre estos compuestos al ser evaluados sobre promastigotes de *L. amazonensis*: (i) el fluconazol con poca actividad ($CI_{50} = 104,5 \pm 5,2 \mu\text{M}$), (ii) el ketoconazol con moderada actividad ($CI_{50} = 53,6 \pm 2,7 \mu\text{M}$), y (iii) el itraconazol mostró una buena actividad ($CI_{50} = 1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Este último, es un compuesto azol conocido, del cual se ha reportado su actividad sobre promastigotes de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/75/Josefa), con una $CI_{50} = 0,08 \mu\text{M}$ (de Macedo-Silva *et al.*, 2013).

Finalmente, de la serie estudiada, los antiparasitarios fueron los compuestos que menos actividad demostraron, a pesar de ser aparentemente el grupo más cercano a *Leishmania*. En este caso, los antihelmínticos albendazol y levamisol, así como los recomendados para protozoos intestinales (parásitos extracelulares) tales como el metronidazol, el secnidazol y el tinidazol no fueron capaces de inhibir el crecimiento de los promastigotes de *L. amazonensis*. Del resto de los compuestos de este grupo, solo la pentamidina (fármaco control de este grupo), los antimaláricos (artemisinina y atovacuona), y los anti-toxoplásmicos (sulfadiazina y pirimetamina) mostraron una CI_{50} inferior a $100 \mu\text{M}$. Como puede apreciarse, estos fármacos son utilizados para el tratamiento de otros protozoos intracelulares, en ese caso de la familia Apicomplexa. En particular, la pirimetamina resultó el producto más activo, con una superioridad estadística significativa ($p < 0,05$) respecto incluso a la pentamidina ($CI_{50} = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ vs $CI_{50} = 2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$, respectivamente). Previamente, Corona y colaboradores (2012) reportaron que la pirimetamina fue capaz de inhibir el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* y *L. major* a concentraciones de $30 \mu\text{g/mL}$. Por otra parte, De Carvalho y colaboradores (2003) afirmaron que la pirimetamina fue activa sobre promastigotes de *L. major* y *L. amazonensis*, lo cual fue utilizado como estudio preliminar para establecer la dosis efectiva del medicamento a ser utilizado en otros estudio.

VI.2. Selección de los fármacos con mayor selectividad antileishmanial acorde a la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

La eficacia antileishmanial de los fármacos no solo depende de su capacidad de inhibir el crecimiento de promastigotes, sino también de afectar el sistema macrófago-parásitos, siendo necesario evaluar la viabilidad de células mamíferas en presencia de nuevos compuestos (Hendrickx *et al.*, 2019). En este sentido, se determinó en paralelo a la actividad en promastigotes, la citotoxicidad de los productos evaluados sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, célula hospedera de los amastigotes intracelulares que se utilizarán posteriormente para verificar la actividad de los fármacos promisorios.

En este ensayo, la mayor citotoxicidad fue también demostrada por los antineoplásicos, seguidos de los antifúngicos y finalmente los antiparasitarios, con amplios rangos de valores de CC_{50} . En la literatura científica se han realizado análisis sobre el beneficio-riesgo de los fármacos antileishmaniales. Teniendo en cuenta que en el caso de la LC, si el paciente presenta una respuesta inmunológica adecuada es capaz de autocontrolar, debe realmente valorarse la utilización de un fármaco si este presenta una alta toxicidad, a pesar de existir pocas alternativas terapéuticas. Precisamente, algunos compuestos anticancerígenos en ocasiones no han sido desarrollados como antileishmaniales debido a sus características relacionadas con su seguridad. Esta observación se debe a que el riesgo y los efectos adversos del tratamiento con estos medicamentos pueden ser aceptables en pacientes de cáncer, pero no así para algunas enfermedades infecciosas, incluyendo la LC (Hamid *et al.*, 2024).

A partir del IS calculado, se identificaron a seis compuestos incluidos en el estudio como selectivos. Aunque Caridha y colaboradores (2019) recomendaron un $IS > 5$ para aquellos candidatos para el tratamiento de la LC; otros autores (Katsuno *et al.*, 2015) han definido como ideal seleccionar aquellos productos con un $IS > 10$, fundamentalmente si se trabaja con productos puros. En este trabajo, los tres fármacos de referencia (pentamidina, anfotericina B y miltefosina) cumplieron este criterio, y adicionalmente, la pirimetamina, el itraconazol y el cisplatino mostraron IS incluso superiores a los compuestos de referencia (25, 27 y 91, respectivamente). Este resultado es muy interesante debido a que podemos contar con fármacos que actúen de forma

selectiva sobre *Leishmania*, sin afectar significativamente la viabilidad de las células huésped (Koutsoni *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta estos resultados, los seis compuestos anteriormente mencionados, fueron seleccionados para la evaluación de su actividad sobre el modelo de amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

VI.3. Evaluación de los fármacos con mayor selectividad sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*

Durante el proceso de evaluación de nuevos compuestos usualmente se utilizan al menos dos estadios del parásito. En este estudio se utilizó como primer modelo de evaluación los promastigotes. Sin embargo, es necesario determinar la actividad de los compuestos seleccionados en una segunda evaluación para confirmar las potencialidades del producto seleccionado (De Rycker *et al.*, 2013). En este sentido, hasta la actualidad, los amastigotes intracelulares continúan siendo el modelo estándar para la evaluación de efectividad de un compuesto, ya que constituye la forma que está presente en el hospedero vertebrado. Por otra parte, presenta otras ventajas, ya que puede valorarse la capacidad del producto de penetrar en la célula hospedera, y que no pierde su actividad debido al metabolismo de la célula del mamífero (Vermeers *et al.*, 2009).

Todos los fármacos evaluados demostraron capacidad de inhibir los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*. La anfotericina B y la pentamidina resultaron ser los compuestos más activos; mientras que el cisplatino, la miltefosina y el itraconazole mostraron valores en el mismo rango de actividad. Solo la pirimetamina causó una CI_{50} superior a 10 μM ($36,5 \pm 1,82 \mu\text{M}$), por lo que fue descartada en esta etapa de investigación.

De los otros fármacos con resultados promisorios para ser reciclados farmacológicamente sobre la leishmaniosis, el itraconazol mostró los mejores valores de actividad ($CI_{50} = 6,5 \pm 0,32 \mu\text{M}$). Estudios previos, también resaltaron las potencialidades de este compuesto, el cual mostró una $CI_{50} = 0,64 \mu\text{M}$ sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, utilizando la cepa MHOM/BR/75/Josefa (de Macedo-Silva *et al.*, 2013).

En orden de actividad el cisplatino demostró una CI_{50} de $8,3 \pm 0,42 \mu\text{M}$. Resultados similares a los reportados de este compuesto sobre amastigotes de *L. infantum* con valores de $CI_{50} = 1,85 \pm 0,22 \mu\text{M}$ (Tavares *et al.*, 2007).

Por otra parte, en nuestro estudio también pudimos corroborar que tanto el itraconazol, como el cisplatino, fueron capaces de inhibir ambas formas del parásito: los promastigotes y amastigotes. Este hecho pudiera sugerir que estos compuestos actúan sobre dianas moleculares que son imprescindibles para la sobrevivencia del parásito en ambos estadios. No obstante, una ligera disminución de las CI_{50} fueron apreciadas en los promastigotes, lo cual pudiera ser lógico al ser células libres donde el compuesto solo interacciona con el parásito.

Por otra parte, ambos compuestos fueron menos activos ($p < 0,05$) que la anfotericina B y la pentamidina; pero los valores de CI_{50} se encontraron en el mismo rango μM que la miltefosina, siendo el itraconazol más activo ($p < 0,05$) que esta. Algunas características del itraconazol son similares a la miltefosina, fundamentalmente que pueden ser administrados por vía oral y el paciente puede medicarse por solo. Esta característica es relevante en áreas endémicas donde la resistencia, la toxicidad y el costo han causado una disminución en la utilidad de los otros fármacos de referencia. En este sentido, Castaño y colaboradores (2017) sugirieron la buena respuesta al tratamiento con itraconazol de un paciente con LC que no respondió a la terapéutica con anfotericina B, aunque en ese caso no se identificó la especie de *Leishmania* infectante. Por otra parte, la selección de este fármaco se basó en la característica de los azoles de afectar la membrana de *Leishmania*, lo cual pudiera ser letal para el parásito. Recientemente, se sugirió que el itraconazol pudiera ser una terapia atractiva en combinación con los derivados de antimonio pentavalente para el tratamiento de la LC en pacientes pediátricos infectados con *L. mexicana* (Caro *et al.*, 2022).

Finalmente, al recalcular el IS para cada uno de estos fármacos con $CI_{50} < 10\mu\text{M}$, se pudo observar que el itraconazol y la miltefosina mostraron valores entre 5 y 10. En particular, Caridha y colaboradores (2019) especificaron que para las especies causantes de LC, un $IS > 5$ puede constituir un criterio mínimo de aceptabilidad. Sin embargo, la anfotericina B y el cisplatino mostraron valores superiores a 10, lo cual se considera ideal para el desarrollo de nuevos fármacos antileishmaniales en particular si van a ser administrados por vía sistémica (Katsuno *et al.*, 2015).

VI.4. Identificación las posibles dianas terapéuticas de los fármacos seleccionados como promisorios mediante un estudio *in silico*

Durante las últimas décadas, se ha observado un incremento en el número de productos evaluados sobre *Leishmania*. Sin embargo, la mayoría de estos reportes carecen de estudios relacionados con el posible mecanismo de acción antileishmanial de estos fármacos que sirvan de basamento para el futuro desarrollo de estos productos, en especial de ensayos clínicos. En el presente estudio, se llevó a cabo un abordaje computacional para identificar posibles dianas terapéuticas del itraconazol y el cisplatino en *Leishmania*. Este enfoque *in silico*, permitirá complementar los estudios *in vitro* realizados con anterioridad con datos obtenidos de simulaciones computacionales. En este caso, se pueden identificar proteínas similares a dianas moleculares conocidas de fármacos comerciales, que puedan a su vez constituir dianas novedosas en diversos organismos, como es el caso de *Leishmania* (Bustamante *et al.*, 2019).

En este caso, se utilizó la herramienta en línea 'PASS online', la cual es una estrategia útil que se basa fundamentada en estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (Druzhilovskiy *et al.*, 2017). En esta era moderna, con este programa computacional es posible predecir más de 3678 efectos farmacológicos y modos de acción de forma rápida y sencilla, como un paso preliminar de tamizaje. Los resultados de la predicción pueden interpretarse de forma flexible; sin embargo, cuando el parámetro Pa es mayor de 0,7 existe una alta posibilidad de que estas predicciones puedan ser corroboradas experimentalmente (Filimonov *et al.*, 2014).

En este estudio, como primer aspecto, se pudo observar que aunque para el itraconazol, un derivado imidazólico de la familia de los azoles, solo se obtuvo la actividad antifúngica y antibacteriana. Sin embargo, como posibles ligando a inhibir se encontró la enzima lanosterol 14- α desmetilasa o CYP51 (citada en los resultados de 'PASS online' por separado). Esta enzima cataliza la eliminación del grupo 14 α -metilo de los precursores de esteroides, lo cual es esencial para la biogénesis de la membrana (Hargrove *et al.*, 2011). Por otra parte, la CYP51, además de constituir un componente estructural importante de la membrana de *Leishmania*, también sirven como moléculas hormonales que modulan el desarrollo de las células, su multiplicación y las transformaciones morfológicas que sufren durante su ciclo de vida (Friggeri *et al.*,

2018). Actualmente, se conoce que las secuencias aminoacídicas de CYP51 de cinco especies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*) presentan más de un 95 % de similitud; mientras que solo en un 26 % cuando se compara con la CYP51 del humano (Hargrove *et al.*, 2011). Por tanto, esta enzima presenta un gran potencial como diana molecular para la quimioterapia antileishmanial (Hargrove *et al.*, 2011; Friggeri *et al.*, 2018). Ejemplo de ello, un estudio *in silico* del posaconazol (un compuesto también de la familia de los azoles) mostró preferencia por esta enzima como mecanismo de acción, lo cual fue validado adicionalmente mediante métodos de acoplamiento molecular (Gupta *et al.*, 2022b).

No obstante, en la literatura científica, otras evidencias experimentales han demostrado que el itraconazol altera la ultraestructura y la fisiología de la mitocondria, así como alteraciones de la membrana plasmática celular (de Macedo *et al.*, 2013). Tanto la disfunción de la mitocondria de *Leishmania* como de su membrana plasmática son considerados dianas terapéuticas esenciales para la sobrevivencia del parásito (Sundar y Singh, 2018).

Por otra parte, el cisplatino desde el punto de vista químico, se trata de un complejo de coordinación formado por un átomo de platino con dos grupos amino y dos cloruros (Su *et al.*, 2022). Debido precisamente a esta estructura peculiar, no fue posible obtener ninguna predicción, ya que presenta menos de tres átomos de carbono. No obstante, es conocido que para su actividad anticancerígena, se une al ADN celular y causa la apoptosis (muerte celular programada) de la célula (Su *et al.*, 2022). En *Leishmania*, la apoptosis ha sido identificada como una diana terapéutica interesante para el desarrollo de fármacos, ya que sirve como regulador de multitud de procesos fisiológicos y desempeña un papel determinante en la interacción huésped-parásito, así como en la patogénesis de la enfermedad (Sundar y Singh, 2018). Sin embargo, en la literatura estudios con *L. infantum*, han evidenciado que el cisplatino ejerce su actividad antileishmanial a través de diferentes mecanismos de acción. Entre ellos se ha demostrado una alteración parcial en la función mitocondrial a través de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y un incremento en la producción de ERO (Tavares *et al.*, 2007).

VI.5. Consideraciones generales

En la última década ha existido un progreso importante en el desarrollo de nuevos fármacos frente a la LV, en contraste a lo observado para la LC (Corman *et al.*, 2023). En este sentido, demostrar una nueva actividad terapéutica para un fármaco que se encuentra disponible para el tratamiento de otra enfermedad resulta estratégico, pues permite reducir el costo y el tiempo invertido en la investigación y desarrollo. De hecho, la mayoría de los fármacos que hoy se utilizan en el manejo clínico de la leishmaniosis surgieron a partir de este enfoque (Braga, 2019).

En el presente estudio por tanto, se brindan evidencias que motivan el reciclaje farmacológico como estrategia promisoría. En particular, la actividad frente a promastigotes y amastigotes intracelulares, así como la selectividad del itraconazol y el cisplatino, puede tenerse en cuenta para el futuro desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de la LC. En particular, se corrobora las potencialidades del itraconazol sobre *L. amazonensis* y de demuestra por primera vez la actividad del cisplatino para esta especie.

Adicionalmente, estos compuestos cumplen otros criterios internacionales (Katsuno *et al.*, 2015; Caridha *et al.*, 2019), ya que presentan una estructura química conocida y una pureza > 90 %. Por otra parte, se sugirieron algunas dianas moleculares potenciales sobre las que pueden actuar los compuestos estudiados, evidencias que deben ser comprobadas experimentales en futuros trabajos. En paralelo, es necesario evaluar la eficacia antileishmanial de estos fármacos sobre la leishmaniosis cutánea experimental en modelos animales que permita realizar una adecuada valoración beneficio/riesgo, con el objetivo de desarrollar nuevos medicamentos antileishmaniales con mayor efectividad y seguridad.

VII. Conclusiones...

VII. Conclusiones

- De los 26 fármacos estudiados, 20 (76,9 %) compuestos inhibieron el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis* y seis (23,1 %) mostraron una $CI_{50} < 10 \mu M$; lo cual demuestra la utilidad de la estrategia de reciclaje farmacológico para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antileishmanial.
- Se seleccionaron seis fármacos con un IS > 10 según su citotoxicidad *in vitro* sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, los cuales pueden ser considerados como candidatos promisorios por su elevada selectividad.
- El itraconazol y el cisplatino, junto con los fármacos de referencia, demostraron una buena actividad antileishmanial sobre amastigotes intracelulares, lo que demuestra las potencialidades farmacológicas de estos compuestos sobre *L. amazonensis*.
- Para el itraconazol se identificó la inhibición de la enzima lanosterol 14- α desmetilasa como posible diana terapéutica mediante un estudio *in silico*, lo que permite sugerir el mecanismo molecular de este compuesto sobre *Leishmania* spp.

VIII. Recomendaciones...

VIII. Recomendaciones

- Evaluar la actividad antileishmanial del itraconazol y el cisplatino en un modelo animal de leishmaniosis cutánea experimental causada por *L. amazonensis*.
- Corroborar experimentalmente los posibles mecanismos de acción antileishmanial del itraconazol y el cisplatino.
- Determinar la actividad antileishmanial *in vitro* de otros fármacos que se utilizan en la clínica perteneciente a los grupos estudiados u otros que se valoren utilizando la estrategia de reciclaje farmacológico racional.

IX. Referencias Bibliográficas...

IX. Referencias bibliográficas

- Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. 2021;112:601–18.
- Abou-El-Naga IF, Mady RF, Fawzy Hussien Mogahed NM. In vitro effectivity of three approved drugs and their synergistic interaction against *Leishmania infantum*. *Biomedica*. 2020;40(Supl. 1):89-101.
- Ahmad, MZ, Rizwanullah M, Ahmad J, Alasmay MY, Akhter MH, Abdel-Wahab BA, *et al*. Progress in nanomedicine-based drug delivery in designing of chitosan nanoparticles for cancer therapy. *Int J Polym Mater*. 2022;71(8):602-23.
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, *et al*. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017;57:1-29.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):e0004770.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al*. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Dos Santos Faiões V, Pereira TM, Silva RL, Leon LL, Torres-Santos EC. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci* 2018;23(5):967-96.
- Araujo AR, Portela NC, Feitosa AP, Silva OA, Ximenes RA, Alves LC, Brayner FA. Risk factors associated with American cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58:86.
- Azzouz S, Lawton P. In vitro effects of purine and pyrimidine analogues on *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. *Acta Parasitol*. 2017;62(3):582-88.
- Bahrami S, Oryan A, Bemani E. Efficacy of amiodarone and voriconazole combination therapy in cutaneous leishmaniasis in the mice experimentally infected with *Leishmania major*. *J Infect Chemother*. 2021;27(7):984-90.
- Balaña-Fouce R, Prada CF, Requena JM, *et al*. Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(10):5264-70.

- Bezerra-Souza A, Fernandez-Garcia R, Rodrigues GF, *et al.* Repurposing Butenafine as An Oral Nanomedicine for Visceral Leishmaniasis. *Pharmaceutics*. 2019;11(7):353.
- Bigot S, Leprohon P, Ouellette M. Delving in folate metabolism in the parasite *Leishmania major* through a chemogenomic screen and methotrexate selection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2023;17(6):e0011458.
- Borges BS, Bueno GP, Tomiotto-Pellissier F, Figueiredo FB, Soares Medeiros LC. In vitro anti-*Leishmania* activity of triclabendazole and its synergic effect with amphotericin B. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;12:1044665.
- Braga SS. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing. *Eur J Med Chem*. 2019;183:111660.
- Breckenridge A, Jacob R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(1):1-2.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151):951-70.
- Bustamante C, Ochoa R, Asela C, Muskus C. Repurposing of known drugs for leishmaniasis treatment using bioinformatic predictions, *in vitro* validations and pharmacokinetic simulations. *J Comput Aided Mol Des*. 2019;33(9):845-54.
- Cabral FV, Riahi M, Persheyev S, Lian C, Cortez M, Samuel IDW, Ribeiro MS. Photodynamic therapy offers a novel approach to managing miltefosine-resistant cutaneous leishmaniasis. *Biomed Pharmacother*. 2024;177:116881.
- Caridha D, Vesely B, van Bocxlaer K, Arana B, Mowbray CE, Rafati S, *et al.* Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2019;11:106-17.
- Caro J, Renato I, Gómez M. Terapia farmacológica exitosa para leishmaniasis cutánea en el Caribe mexicano. *Rev Méd Sin*. 2022;7(10):e905.
- Castaño MB, Consigli J, López GVR, Pereyra S. Leishmaniasis cutánea con buena respuesta al tratamiento con itraconazol. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2017;45(2):134-6.
- Charlton RL, Rossi-Bergmann B, Denny PW, Steel PG. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology*. 2018;145(2):219-36.
- Corman HN, McNamara CW, Bakowski MA. Drug Discovery for Cutaneous Leishmaniasis: A Review of Developments in the Past 15 Years. *Microorganisms*. 2023;11(12):2845.

- Corona P, Gibellini F, Cavalli A, *et al.* Structure-based selectivity optimization of piperidine-pteridine derivatives as potent *Leishmania* pteridine reductase inhibitors. *J Med Chem.* 2012;55(19):8318-29.
- Costa JML, Uthant AA, Elkhoury AN, Bezerril AC, Barral A, Saldhana AC. Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in Brazil after 60 years of your first description. *Gaz Méd Bah.* 2009;79:19-24.
- Costa-da-Silva AC, Nascimento DO, Ferreira JRM, Guimarães-Pinto K, Freire-de-Lima L, Morrot A, *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(4):54.
- da Silva Rodrigues JH, Miranda N, Volpato H, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. The antidepressant clomipramine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* through a mitochondrial pathway. *Parasitol Res.* 2019;118(3):977-89.
- De Brito RCF, Aguiar-Soares RDO, Cardoso JMO, Coura-Vital W, Roatt BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(19):8105-16.
- De Carvalho PB, Ramos DC, Cotrim PC, Ferreira EI. Synthesis and in vitro evaluation of potential anti-leishmanial targeted drugs of pyrimethamine. *J Pharm Sci.* 2003;92(10):2109-16.
- de Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2013;8(12):e83247.
- de Moraes-Teixeira E, Rabello A, Aguiar MMG. In vitro activity and in vivo efficacy of fexinidazole against New World *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(8):2318-2325.
- de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de H, *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci.* 2015;5:31.
- De Rycker M, Hallyburton I, Thomas J, Campbell L, Wyllie S, Joshi D, *et al.* Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):2913-22.

- De Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol*. 2022;23(6):823-40.
- Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, da Cunha Pinto A, *et al*. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1349-54.
- Divenuto F, Pavia G, Marascio N, Barreca GS, Quirino A, Matera G. Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human leishmaniasis: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation?. *Acta Trop*. 2023;240:106849.
- do Vale INPC, Saliba JW, Fonseca GSF, Peruhype-Magalhães V, de Araújo FF, Pascoal-Xavier MA, *et al*. Laboratorial algorithm for serological diagnosis of visceral leishmaniasis using rK39-ICT, DAT-LPC and FC-Simplex IgG1. *J Immunol Methods*. 2020;480:112765.
- Dos Santos Matos AP, Lopes DCDXP, Peixoto MLH, da Silva Cardoso V, Vermelho AB, Santos-Oliveira R, *et al*. Development, characterization, and anti-leishmanial activity of topical amphotericin B nanoemulsions. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(6):1552-70.
- Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5:276.
- Druzhilovskiy DS, Rudik AV, Filimonov DA, Glorizova TA, Lagunin AA, Dmitriev AV, *et al*. Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Rus Chem Bull*. 2017;66(10):1832-41.
- ELkhair EB. Elevated cortisol level due to visceral leishmaniasis and skin hyperpigmentation are causally related. *Int J Sci Commer Humanit*. 2014;2:7.
- Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, *et al*. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(8):961-72.
- Emad M, Hayati F, Fallahzadeh MK, Namazi MR. Superior efficacy of oral fluconazole 400 mg daily versus oral fluconazole 200 mg daily in the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection: a randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(3):606-8.
- Farajzadeh S, Esfandiarpour I, Haghdoost AA, Mohammadi S, Mohebbi A, Mohebbi E, Mostafavi M. Comparison between Combination Therapy of Oral Terbinafine

- and Cryotherapy versus Systemic Meglumine Antimoniate and Cryotherapy in Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized Clinical Trial. *Iran J Parasitol.* 2015;10(1):1-8.
- Filimonov DA, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Druzhilovskii DS, Pogodin PV, *et al.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds the PASS online web resource. *Chem Hetero Comp.* 2014;50:444–57.
- Friggeri L, Hargrove TY, Rachakonda G, Blobaum AL, Fisher P, de Oliveira GM, *et al.* Sterol 14 α -Demethylase Structure-Based Optimization of Drug Candidates for Human Infections with the Protozoan Trypanosomatidae. *J Med Chem.* 2018;61(23):10910-21.
- Ghodsian S, Taghipour N, Deravi N, Behniafar H, Lasjerdi Z. Recent researches in effective antileishmanial herbal compounds: narrative review. *Parasitol Res.* 2020;119(12):3929-46.
- Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. *Drug Des Devel Ther.* 2017;12:25-40.
- Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 2003;33(10):1027-34.
- Gupta AK, Das S, Kamran M, Ejazi SA, Ali N. The pathogenicity and virulence of *Leishmania* - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence.* 2022a;13(1):903-5.
- Gupta Y, Goicoechea S, Romero JG, Mathur R, Caulfield TR, Becker DP, *et al.* Repurposing Lansoprazole and Posaconazole to treat leishmaniasis: Integration of in vitro testing, pharmacological corroboration, and mechanisms of action. *J Food Drug Anal.* 2022b;30(1):128-49.
- Hamid A, Mäser P, Mahmoud AB. Drug Repurposing in the Chemotherapy of Infectious Diseases. *Molecules.* 2024;29(3):635.
- Hargrove TY, Wawrzak Z, Liu J, Nes WD, Waterman MR, Lepesheva GI. Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*. *J Biol Chem.* 2011;286(30):26838-48.
- Hendrickx S, Caljon G, Maes L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. *Parasitol Res.* 2019;118(10):2743-2752.

- Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(11):751-8.
- Keighobadi M, Emami S, Fakhari M, Shokri A, Mirzaei H, Hosseini Teshnizi S. Repurposing azole antifungals into antileishmanials: Novel 3-triazolylflavanones with promising in vitro antileishmanial activity against *Leishmania major*. *Parasitol Int.* 2019;69:103-9.
- Khadir F, Taheri T, Habibzadeh S, Zahedifard F, Gholami E, Heidari-Kharaji M, *et al.* Antileishmanial effect of rapamycin as an alternative approach to control *Leishmania tropica* infection. *Vet Parasitol.* 2019;276:108976.
- Khanra S, Juin SK, Jawed JJ, Ghosh S, Dutta S, Nabi SA, *et al.* In vivo experiments demonstrate the potent antileishmanial efficacy of repurposed suramin in visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8): e0008575.
- Khraiwesh M, Leed S, Roncal N, Johnson J, Sciotti R, Smith P, *et al.* Antileishmanial Activity of Compounds Derived from the Medicines for Malaria Venture Open Access Box Against Intracellular *Leishmania major* Amastigotes. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(2):340-7.
- Kmetiuk LB, Tirado TC, Biondo LM, Biondo AW, Figueiredo FB. *Leishmania* spp. in indigenous populations: A mini-review. *Front Public Health.* 2022;10:1033803.
- Koutsoni OS, Karampetsou K, Dotsika E. *In vitro* Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC₅₀, CC₅₀ and SI Values. *Bio Protoc.* 2019;9(21):e3410.
- Kumar A, Pandey SC, Samant M. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2020;42(10):e12727.
- Kumari D, Perveen S, Sharma R, Singh K. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. *Eur J Pharmacol.* 2021;910:174436.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R editors. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Academic Press, London. 1987; p. 1–120.
- Lima ML, Amaral M, Borborema SET, Tempone AG. Evaluation of antileishmanial potential of the antidepressant escitalopram in *Leishmania infantum*. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;209:114469.
- López-Arencibia A, Bethencourt-Estrella CJ, San Nicolás-Hernández D, Lorenzo-Morales J, Piñero JE. Anti-COVID Drugs (MMV COVID Box) as

- Leishmanicidal Agents: Unveiling New Therapeutic Horizons. *Pharmaceuticals* (Basel). 2024;17(3):266.
- Madusanka RK, Silva H, Karunaweera ND. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis and Insights into Species-Specific Responses: A Narrative Review. *Infect Dis Ther.* 2022;11(2):695-711.
- McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?. *Immunol Rev.* 2004;201:206-24.
- Mesquita JT, Romanelli MM, de Melo Trinconi Trinconi CC, Guerra JM, Taniwaki NN, Uliana SRB, *et al.* Repurposing topical triclosan for cutaneous leishmaniasis: Preclinical efficacy in a murine *Leishmania (L.) amazonensis* model. *Drug Dev Res.* 2022;83(2):285-95.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(6):e249.
- Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R. *Leishmania* Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *Int J Prev Med.* 2019;10:95.
- Montalvo AM, Fraga J, Blanco O, González D, Monzote L, Soong L, Capó V. Imported leishmaniasis cases in Cuba (2006-2016): what have we learned. *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 2018;4:7.
- Monzote L. Efecto de derivados de la tiadiazina frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*. Tesis de Maestría en Farmacología Experimental. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana; 2003.
- Monzote L. Evaluación de la actividad terapéutica de dos nuevos principios activos frente a la leishmaniasis cutánea experimental. Tesis de diploma en Ciencias Farmacéuticas. La Habana: Universidad de La Habana; 1999.
- Mukherjee A, Barik S, Sar P, Sarkar A. Role of thrombopoiesis in leishmaniasis. *Cytokine.* 2021;147:155310.
- No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* 2016;155:113-23.
- Nweze JA, Mbaoji FN, Li YM, Yang LY, Huang SS, Chigor VN, *et al.* Potentials of marine natural products against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis parasites: a review of recent articles. *Infect Dis Poverty.* 2021;10(1):9.

- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 2011;118(2):87-96.
- Ortega V, Radaic A, de Jesus MB, de Paula E, Giorgio S. Improved efficacy of meglumine antimoniate incorporated in anionic liposomes against *Leishmania infantum* infecting canine macrophages. *J Pharm Pharmacol.* 2022;74(6):896-904.
- Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis.* 2010;14(12):e1032-9.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006052.
- Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41-58.
- Raj S, Sasidharan S, Balaji SN, Saudagar P. An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. *Parasitol Res.* 2020;119(7):2025-37.
- Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep.* 2016;6:28266.
- Rashidi S, Fernández-Rubio C, Manzano-Román R, Mansouri R, Shafiei R, Ali-Hassanzadeh M, Barazesh A, Karimazar M, Hatam G, Nguewa P. Potential therapeutic targets shared between leishmaniasis and cancer. *Parasitology.* 2021;148(6):655-671.
- Rivas L, Rojas V. Cyanobacterial peptides as a tour de force in the chemical space of antiparasitic agents. *Arch Biochem Biophys.* 2019;664:24-39.
- Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(21):8965-77.
- Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2006;75:115-30.

- Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* 2016;53(1):8-16.
- Salmanpour R, Handjani F, Nouhpisheh MK. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Dermatolog Treat.* 2001;12(3):159-62.
- Sánchez-Puelles JM. Reposicionamiento de fármacos: viejos fármacos en nuevas indicaciones terapéuticas. *Newsletter* 2020;1:12-4.
- Santana W, de Oliveira SSC, Ramos MH, Santos ALS, Dolabella SS, Souto EB, Severino P, Jain S. Exploring Innovative Leishmaniasis Treatment: Drug Targets from Pre-Clinical to Clinical Findings. *Chem Biodivers.* 2021;18(9):e2100336.
- Sasidharan S, Saudagar P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitol Res.* 2021;120(5):1541-54.
- Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis.* 2008;45(4):255-72.
- Sifontes-Rodríguez S, Mollineda-Diogo N, Monzote-Fidalgo L, Escalona-Montaña AR, Escario García-Trevijano JA, *et al.* In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activity of Thioridazine. *Acta Parasitol.* 2024;69(1):324-31.
- Silveira FT. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019;113(9):505-16.
- Singh K, Garg G, Ali V. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. *Curr Drug Metab.* 2016;17(9):897-919.
- Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 2003;49(1):55-60.
- Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. *J Immunol Methods.* 1993;157(1-2):203-7.
- Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(6):e2278.
- Su S, Chen Y, Zhang P, Ma R, Zhang W, Liu J, Li T, *et al.* The role of Platinum(IV)-based antitumor drugs and the anticancer immune response in medicinal inorganic chemistry. A systematic review from 2017 to 2022. *Eur J Med Chem.* 2022;243:114680.

- Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. 2010;362(6):504-12.
- Sundar S, Singh B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(6):467-86.
- Tavares J, Ouaiissi M, Ouaiissi A, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. *Acta Trop*. 2007;103(2):133-41.
- Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MA, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1234-41.
- Uliana SR, Barcinski MA. Repurposing for neglected diseases. *Science*. 2009;326(5955):935.
- Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62(1):149-56.
- Varikuti S, Volpedo G, Saljoughian N, Hamza OM, Halsey G, Ryan NM, *et al*. The Potent ITK/BTK Inhibitor Ibrutinib Is Effective for the Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. *J Infect Dis*. 2019;219(4):599-608.
- Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3855-9.
- Weng HB, Chen HX, Wang MW. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. *Infect Dis Poverty*. 2018;7(1):67.
- Weyers W. William Boog Leishman-A Brief Reminder of His Life and Work on the Occasion of His 150th Birthday. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(6):436-43.
- WHO. Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region. 2014 [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/120002>] [Consultado 10 de enero de 2024].

Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FR, Norval S, Kime R, *et al.* The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med.* 2012;4(119):119re1.

Yamamoto ES, de Jesus JA, Bezerra-Souza A, Brito JR, Lago JHG, Laurenti MD, Passero LFD. Tolnaftate inhibits ergosterol production and impacts cell viability of *Leishmania* sp. *Bioorg Chem.* 2020;102:104056.