



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Asociación entre disminución de la sensibilidad parasitaria in vitro y respuesta terapéutica en pacientes con Leishmaniasis cutánea tratados en el centro dermatológico Federico Lleras Acosta de la ciudad de Bogotá entre 2006 y 2012

Erik Zapata Pinillos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
Año 2021

Asociación entre disminución de la sensibilidad parasitaria in vitro y respuesta terapéutica en pacientes con Leishmaniasis cutánea tratados en el centro dermatológico Federico Lleras Acosta de la ciudad de Bogotá entre 2006 y 2012

Erik Zapata Pinillos

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en medicina interna

Director:

MSc, Carlos Humberto Saavedra Trujillo

Codirectora:

Ph.D, MSc, María Clara Echeverry Gaitán

Línea de Investigación:

Desarrollo de métodos diagnósticos en enfermedades de transmisión vectorial

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
Año 2021

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Erik Zapata Pinillos

Fecha 26/07/2021

Resumen

Asociación entre disminución de la sensibilidad parasitaria in vitro y respuesta terapéutica en pacientes con Leishmaniasis cutánea tratados en el centro dermatológico Federico Lleras Acosta de la ciudad de Bogotá entre 2006 y 2012

La leishmaniasis cutánea es considerada una enfermedad tropical desatendida, con una amplia distribución geográfica en el mundo e incidencia importante en población socialmente vulnerable. Tiene un impacto infravalorado por la sociedad y los sistemas de salud, con una carga de enfermedad no despreciable. A pesar de disponer de esquemas terapéuticos desde hace 70 años, en las últimas décadas se ha venido documentando resistencia creciente por parte del parásito a las primeras líneas de tratamiento y altos índices de falla terapéutica. Trabajos realizados en América Latina reportan resistencia entre el 10-20% y tasas de falla terapéutica a la primera línea de tratamiento del 25%. Sin embargo, no es clara la correlación entre la disminución de la sensibilidad parasitaria in vitro y la respuesta terapéutica.

Se realizó un estudio de casos y controles, con un total de 34 pacientes en un centro de referencia de Bogotá para determinar la asociación entre la sensibilidad in vitro disminuida y la respuesta clínica al tratamiento. Se obtuvo un OR 0.71 (IC 95% 0.085 – 9.39) con lo cual posiblemente no existe relación entre las variables.

Estos resultados sugieren que las pruebas de sensibilidad disminuidas in vitro no impactan en la toma de decisiones en la práctica clínica, como posibles predictores de falla al tratamiento por lo cual el papel en el uso sistemático de ellas es limitado.

Palabras clave: leishmaniasis, resistencia a drogas, miltefosine, antimonio de meglumina, pentamidina, leishmaniasis cutánea.

Abstract

Association between reduced in vitro susceptibility and response to treatment in cutaneous leishmaniasis patients treated in the dermatologic centre Federico Lleras Acosta in Bogota between 2006 and 2012

Cutaneous leishmaniasis is a neglected tropical disease, broadly distributed in the planet and with high incidence among socially vulnerable persons. It has been underestimated by healthcare systems and society, with a great burden of disease. Despite an available effective and well established treatment since the 50's, it has been documented an increasing rate of resistance and treatment failure. Reports in Latin America, show resistance rates between 10-20% and 25% of subjects with treatment failure using first line drugs. Nevertheless, there is no clear association between reduced in vitro susceptibility from the parasite and treatment response.

This case control study with 34 subjects in a reference center in Bogotá, aimed to establish an association between reduced in vitro susceptibility and response to treatment. The results showed an OR 0.71 (IC 95% 0.085 – 9.39), which possibly means that there is no relation among the mentioned variables.

These results suggest that susceptibility testing would not impact clinical decision making as treatment failure predictors, therefore limiting its systematic use.

Key words: leishmaniasis, drug resistance, miltefosine, meglumine antimoniate, pentamidine, cutaneous leishmaniasis.

Contenido

Resumen	IV
Lista de tablas	VIII
Introducción	1
1.Capítulo 1: Justificación y objetivos	
1.1 Justificación.....	
1.2 Objetivos.....	
1.2.1 Objetivo general.....	
1.2.2 Objetivos específicos	
1.3 Hipótesis.....	
2. Capítulo 2: Marco teórico	
2.1 Leishmania y enfermedad	
2.1.1 Definición	
2.1.2 Taxonomía	
2.1.3 Ciclo biológico.....	
2.1.4 Patogénesis.....	
2.1.5 Diagnóstico.....	
2.1.6 Tratamiento.....	
2.1.7 Respuesta terapéutica.....	
2.1.8 Mecanismos de resistencia en Leishmaniasis.....	
2.1.9 Pruebas de sensibilidad.....	
3. Capítulo 3: Materiales y métodos	
3.1 Diseño del estudio.....	
3.2 Población y muestra.....	
3.3 Criterios de inclusión.....	
3.4 Criterios de exclusión.....	
3.5 Definición de variables.....	
3.6 Análisis estadístico.....	

3.7 Procedimientos y recolección de la información.....

3.8 Financiación.....

4. Capítulo 4: Resultados y discusión.....

4.1 Resultados.....

4.2 Discusión.....

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones.....

5.2 Recomendaciones.....

A. Anexo A: formato de captura para la recolección de datos.....

Bibliografía.....

Lista de tablas

Tabla 3-1: Operacionalizacion de variables.....

Tabla 4-1: Distribución demográfica.....

Tabla 4-2: Características clínicas.....

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida, con una amplia distribución geográfica en el mundo. Los países donde se presenta la enfermedad de manera endémica se enfrentan a la dificultad de controlar ésta entidad, en parte debido al restringido acceso a medicamentos y en parte a las tasas crecientes de falla terapéutica. Puntualmente en Latinoamérica los reportes en las tasas de terapia fallida son heterogéneos: 7% en Bolivia ⁽¹⁾, 16% en Brasil⁽²⁾, 23.9% en Perú⁽³⁾ y hasta el 39% en Colombia⁽⁴⁾. Este es un fenómeno complejo que obedece a múltiples causas dentro de las cuales se encuentran factores genéticos tanto del parásito como del hospedero, problemas de adherencia al tratamiento y de biodisponibilidad del fármaco.

En Colombia se ha documentado, con tamaños muestrales pequeños, entre un 16% - 40% de resistencia parasitaria en pacientes con falla terapéutica a sales de antimonio sin establecer de manera contundente una asociación ⁽⁵⁾. Por otra parte, se ha reportado pérdida de la sensibilidad a Miltefosine por parte del parásito mediante técnicas moleculares como lo muestra una investigación llevada a cabo en Cali ⁽⁶⁾. Un estudio de cohorte⁽⁷⁾ en el que se incluyeron adultos y niños tratados con miltefosine o antimonio de meglumina (n=230, con más de 80% de casos por *L. panamensis*) mostró falla terapéutica en un 15.6% (95% IC 10.92-20.38) siendo menor para miltefosine contra el antimonio (8.92% vs 22.03%, p=0.006); y los factores asociados a falla terapéutica consistieron en edad menor a 8 años, duración de la enfermedad menor a un mes, linfadenopatía regional, adherencia menor al 90% y tratamiento con antimonio de meglumina. En otra investigación realizada en 63 pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea⁽⁸⁾ por *L. panamensis* se evaluó la eficacia de la pentamidina en población civil encontrando falla terapéutica en el 11.6% de los casos. Un trabajo realizado para determinar la susceptibilidad in vitro a fármacos (estibogluconato y/o pentamidina) evaluada por medio de la disminución de carga parasitaria intracelular en macrófagos por microscopía, en las

principales especies circulantes de Colombia⁽⁹⁾ encontró que el 68% de las cepas de *L.braziliensis* no eran sensibles a miltefosine pero 69% eran sensibles a antimonio de meglumina; en *L. panamensis* la resistencia a miltefosine y antimonio de meglumina fue del 20% y 21% respectivamente; solo el 3% de *L. guyanensis* fue resistente a miltefosine y ninguno a las sales de antimonio. Llamativamente las cepas provenientes de la Orinoquía y Amazonía eran significativamente menos susceptibles a miltefosine aunque con una susceptibilidad similar para todas las regiones con antimonio de meglumina.

De igual manera, de acuerdo a observaciones clínicas, las especies del parásito parecen influir en la respuesta al tratamiento. En Perú se estudiaron parámetros clínicos y respuesta a sales de antimonio en 103 pacientes con Leishmaniasis tegumentaria⁽¹⁰⁾ encontrando, en orden de frecuencia, *L. peruviana*, *L.guyanensis* y *L.braziliensis*; y de estos aislamientos el 22% no respondió a la terapia con la mayor posibilidad de falla terapéutica representada por *L. braziliensis* y la menor posibilidad de falla en aislamientos por *L. guyanensis* (OR 0.07 IC95% 0.007—0.8, p=0.003). Por otra parte en un estudio peruano⁽¹¹⁾ de casos y controles con pacientes en su primer episodio de Leishmaniasis cutánea tratados con estibogluconato (n=127), con aislamientos de *L. peruviana*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* en orden de frecuencia; con tasa de falla terapéutica a 6 meses del 24.4%, de las cuales el 96% ocurrió en los primeros 3 meses y los factores de riesgo para el fracaso terapéutico fueron: edad, estancia menor a 72 meses en el área de contagio, duración de la enfermedad menor a 5 semanas, lesiones múltiples, infección con *L. peruviana* (OR 9.85 IC 95% 1.01 – 95.65; p=0.049) e infección por *L. braziliensis* (OR 22.36; IC 95% 1.89 – 263.96; p= 0.014).

Por otra parte, se han reportado casos en los que se ha determinado la susceptibilidad in vitro e in vivo de especies como la *L.amazonensis*⁽¹²⁾ en Leishmaniasis cutánea difusa utilizando experimento en animales y tratando de establecer correlación entre la respuesta clínica y los hallazgos in vitro, encontrando relación directa entre la cepa resistente y la refractariedad clínica al tratamiento con miltefosine. En un estudio hecho en Brasil⁽¹³⁾ con 16 aislamientos de *L. braziliensis* provenientes de enfermos con compromiso cutáneo, se evaluó la susceptibilidad a miltefosina, encontrando que era necesaria una mayor concentración de fármaco para tener actividad contra promastigotes vs amastigotes, con una buena correlación entre la susceptibilidad de los promastigotes y la de los amastigotes intracelulares (r=0.793, p=0.008) con lo cual se infiere que la primera puede

ser un surrogado de la segunda, por lo tanto los ensayos in vitro utilizando promastigotes podrían ser útiles para evaluar susceptibilidad de aislamientos clínicos.

La evidencia producida en torno a falla terapéutica y repuesta in vitro del parásito al medicamento, no es totalmente clara. Existe una escasez en estudios de asociación o correlación entre estas dos variables que permita mejorar la toma de decisiones y los resultados clínicos. Desde finales del siglo XX se ha iniciado la búsqueda de una respuesta en éste sentido; un estudio in vitro ⁽¹⁴⁾ de aislamientos clínicos encontró que las muestras provenientes de pacientes clínicamente sensibles al tratamiento (sales de antimonio), exhibían tasas de eliminación in vitro entre 70% a 90% con concentraciones del fármaco comparables a las séricas y en los aislamientos de pacientes clínicamente resistentes las tasas de eliminación oscilaban entre 40% a 61%, sin establecer correlación clara y con rangos muy amplios en ambos grupos. Una serie pequeña de casos en los años 90 con 35 aislamientos de pacientes con Leishmaniasis cutánea y mucocutánea, con pruebas de sensibilidad por técnica de microdilución semiautomatizada mostró 89% y 86% de correlación con desenlaces clínicos (falla terapéutica) posterior a tratamiento con pentamidina y antimonio de meglumina, respectivamente aunque con limitación metodológica evidente⁽¹⁵⁾. Un trabajo realizado en Cali (Colombia) con 28 aislamientos de Leishmania del subgénero Viannia de pacientes, previo a inicio de tratamiento, mostró que 11 muestras fueron sensibles in vitro y se correlacionaba significativamente con la respuesta clínica ⁽¹⁶⁾. En otro estudio con 32 aislamientos de enfermos con Leishmaniasis cutánea tratados con antimonio pentavalente, 22 muestras sensibles coincidieron con los desenlaces por historia clínica y adicionalmente describen un aislamiento resistente en un paciente con lesiones autoresolutivas⁽¹⁷⁾. Un trabajo más reciente con 20 pacientes que padecían leishmaniasis tegumentaria (19 con variante cutánea) en el cual se evaluó la sensibilidad a antimonio de meglumina⁽¹⁸⁾, encontró que las concentraciones inhibitorias mínimas eran menores para *L. Braziliensis* respecto a otras especies ($p < 0.0001$); adicionalmente las concentraciones inhibitorias mínimas de muestras aisladas en pacientes con pobre respuesta clínica eran significativamente mayores ($p < 0.001$) y a través de 10 aislamientos también se determinó que la sensibilidad entre promastigotes y amastigotes intracelulares tenía buena correlación ($r = 0.7052$, $p < 0.05$).

En éste trabajo se realizó un diseño de casos y controles con el objetivo de determinar si existe asociación entre sensibilidad disminuida a los fármacos por parte del parásito y el

fracaso terapéutico. Adicionalmente se recolectaron variables demográficas y clínicas con la intención de evaluar datos de prevalencia y comportamiento general de la enfermedad. Las limitaciones están relacionadas a la naturaleza retrospectiva y al tamaño muestral aunque a favor, es el primer estudio en su clase que pretende dar respuesta a una pregunta de muchos años mediante un enfoque metodológico no realizado hasta al momento y con la información obtenida se genera una idea acerca de la utilidad clínica del cultivo parasitario.

1.Capitulo 1: Justificación y objetivos

1.1 Justificación

Más de 350 millones de personas están en riesgo de contraer leishmaniasis en el mundo y se estima que aproximadamente 12 millones la padecen (500 mil casos nuevos de leishmania visceral al año, 1 a 1.5 millones de nuevos casos de leishmania cutánea) ⁽¹⁹⁾. El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Irán, Arabia Saudita, Siria, Afganistán, Brasil y Perú; mientras que el 90% de los casos de leishmania mucosa ocurren en Bolivia, Brasil y Perú ⁽²⁰⁾²¹⁾.

Información de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)⁽²²⁾ revela que en América, desde el 2001 a 2017 se han registrado 94.0396 casos de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea con un promedio anual de 55.317 casos. En 2017 fueron reportados al sistema regional de informaciones de Leishmaniasis de la OPS/OMS (SisLeish) 49.959 casos de la entidad cutánea y mucosa, de los cuales 41.3% se localizaron en países de la región Andina, 35-9% en el cono Sur, 20.8% en Centro América y el resto en México y países del Caribe No-latino. El país que registra el mayor número de reportes es Brasil, seguido por Colombia y Perú. Sin embargo, la enfermedad también es endémica y de gran importancia epidemiológica en Nicaragua, Venezuela, Bolivia, Costa Rica, Honduras, Panamá, Ecuador, México, Guatemala, Argentina y Paraguay.

En Colombia se notificaron 6319 casos de Leishmaniasis cutánea entre la semana epidemiológica 01 a 52 de 2018⁽²³⁾,. Se redujeron en un 18% los casos respecto al año

previo. Los departamentos de Nariño, Guajira, Guainía, Norte de Santander, Risaralda y Vichada tuvieron un aumento de casos. El 78% de los casos se produjo en hombres y el grupo de edad con mayor número de casos (23%) fue el correspondiente entre 20 y 24 años. Cerca del 80% de los enfermos se ubican en áreas rurales, con una importante incidencia en población socioeconómicamente vulnerable.

Las formas cutáneas y mucosas merecen especial atención debido a que ocasionan desfiguración y discapacidad grave. Las estimaciones en cuanto a carga de enfermedad en Leishmaniasis cutánea son realizadas desde la perspectiva parasitológica por lo tanto pacientes con negatividad para la prueba microbiológica no son incluidos en los cálculos de prevalencia y por lo tanto no suman a la estimación de los años de vida ajustados por discapacidad (DALYs), aunque persistan con cicatrices importantes⁽²⁴⁾. Un estudio realizado en el 2010 mostró que la Leishmaniasis (cutánea, mucosa y visceral) representa la mayor carga entre todas las enfermedades tropicales desatendidas, sin embargo menos del 10% de dicha carga era atribuida a la forma cutánea⁽²⁵⁾. Es conocido el impacto psicológico y social en mujeres, debido a las cicatrices desfigurantes con repercusiones importantes en su entorno. Las mujeres jóvenes con secuelas importantes de Leishmaniasis cutánea sufren estigmatización social y problemas en relaciones interpersonales ⁽²⁶⁾. Adicionalmente en algunas sociedades, las lesiones cutáneas son vistas como marcas de un bajo status social y como reflejo de pobreza, aumentando el estigma sobre los enfermos ⁽²⁷⁾.

Finalmente, teniendo en cuenta los porcentajes no despreciables de falla terapéutica y la relación de especies del género *Viannia* con el fracaso al manejo en una enfermedad desatendida que afecta predominantemente a población con bajas condiciones socioeconómicas y cuyas repercusiones en calidad de vida están subestimadas, se hace necesario tener datos actualizados al respecto en cuanto a respuesta a terapia antileishmaniasis a través de estudios clínicos que permitan mejorar la toma de decisiones y por ende los desenlaces clínicos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Establecer la asociación entre la disminución de la sensibilidad parasitaria in vitro y la respuesta terapéutica en pacientes con Leishmaniasis cutánea del centro dermatológico Federico Lleras entre 2006 a 2012.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de falla terapéutica
- Conocer la prevalencia en la disminución a la sensibilidad a antimonio de meglumine, isetionato de pentamidina y miltefosine
- Evaluar la tasa de sensibilidad disminuida in vitro del parásito según su especie (L.braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis).

1.3 Hipótesis

H₀: La disminución de la sensibilidad parasitaria in vitro no se asocia a respuesta terapéutica en pacientes con Leishmaniasis cutánea tratados con antimonio de meglumina, miltefosine o pentamidina.

2. Capítulo 2: Marco teórico

2.1 Leishmania y enfermedad

2.1.1 Definición

Leishmaniasis se refiere a un gran espectro de síndromes clínicos causados por la infección protozoaria del género Leishmania. Las manifestaciones sindromáticas se dividen en leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa. Aunque hay características comunes a todas, también existen singularidades en cada una. Una especie del parásito puede producir más de un síndrome clínico y cada uno de los síndromes puede ser causado por más de una especie. Cada una de las presentaciones y especies tienen distribuciones geográficas, biológicas y ecológicas características⁽²⁸⁾.

2.1.2 Taxonomía

Convencionalmente se estructura en subgéneros, complejo de especies y subespecies⁽²⁹⁾; la sección Euleishmania se compone de 4 subgéneros: Leishmania, Viannia, Sauroleishmania y el complejo *L. enriettii*. El subgénero Leishmania tiene 4 complejos de especies principales que son: *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. tropica*. El subgénero Viannia se clasifica en los complejos de especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* y *L. naiffi*. *L. amazonensis* y *L. panamensis* podrían hacer parte de la división Paraleishmania, poco estable, debido a falta de análisis genético profundo.

Desde el punto de vista clínico se considera una clasificación útil, aquella que pueda predecir de manera precisa la historia natural de la infección y la respuesta al tratamiento. El uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos de especies específicas de Leishmania como primers, adicional a información genética y molecular resultante de la publicación de genomas de *L. braziliensis*, *L. major* y *L. infantum*, se espera que conduzca a nuevos hallazgos importantes en el campo⁽³⁰⁾.

2.1.3 Ciclo biológico

El parásito existe en dos formas esenciales, promastigote y amastigote. El vector (mosca de la arena, del género *Lutzomya* en América y *Phlebotomus* en Asia y África) alberga promastigotes, forma móvil y flagelada, en su tracto digestivo y probóscide, por tanto al momento de la picadura para tomar sangre libera el parásito en los tejidos. Posteriormente éstos son fagocitados y en el fagolisosoma de los mononucleares cambian a la forma amastigote con replicación subsecuente por fisión binaria. Navegando en el interior del monocito, infiltran órganos del sistema reticuloendotelial y eventualmente producen lisis de la célula hospedera con liberación del parásito al torrente sanguíneo, donde es captado nuevamente por la mosca de la arena en una nueva picadura al huésped. En el tracto gastrointestinal del insecto, ocurre la transformación a promastigote y éste último migra a la probóscide, cerrando así el ciclo⁽³¹⁾.

En las Américas⁽²⁸⁾ se han caracterizado tres ciclos de invasión diferentes: el selvático, el doméstico-rural y el doméstico-urbano. En el ciclo selvático, la infección humana ocurre cuando el hombre se adentra al bosque o la selva y es picado ahí por los insectos infectados. En este caso el hombre es un hospedero accidental que no interviene en el ciclo de transmisión, y los reservorios son los animales selváticos. En los ciclos doméstico-rural y doméstico-urbano los vectores llegan al peridomicilio, ingresan a las

viviendas y transmiten la infección al núcleo familiar, con mayor incidencia en los niños. Algunas evidencias, aún no confirmadas, sugieren que tanto el hombre como los animales de comportamiento sinantrópico y los animales domésticos podrían participar como reservorios del ciclo rural-doméstico. Por otro lado, estudios muestran que el perro es el principal reservorio en la transmisión de la leishmaniasis visceral en ambientes urbanos (ciclo doméstico-urbano). Las leishmaniasis se circunscriben a algunas zonas geográficas específicas, llamadas focos naturales de la enfermedad, en las que se presentan los elementos esenciales para su transmisión, es decir, vectores, reservorios y parásitos. El hecho de que estos últimos se presenten en el ambiente está condicionado, a su vez, por múltiples factores como lo son el clima, la humedad, la temperatura, la vegetación, la presencia y densidad del vector, etc.

2.1.4 Patogénesis

Leishmania tropica, Leishmania major, Leishmania mexicana, *L. braziliensis* y otras formas cutáneas, inducen lesiones en piel en el sitio de inoculación. Se afectan primero las capas dérmicas, con infiltración celular y proliferación de amastigotes intracelulares más diseminación extracelular. Lesiones satélite se pueden encontrar, con contenido nulo o escaso del parásito las cuales responden mal al tratamiento e inducen una respuesta granulomatosa cicatricial ⁽³²⁾.

L. braziliensis braziliensis produce enfermedad mucocutánea y nasofaríngea en el Amazonas. Las lesiones crecen lentamente pero en gran extensión (5-10 cm). Ocurre una rápida migración a superficie palatina y nasofaríngea donde permanece sin crecimiento adicional por varios años. Luego de meses o incluso más de 20 años, se desarrolla erosión con destrucción del septum nasal y tejidos circundantes. La muerte sobreviene por asfixia debido a obstrucción traqueal o infección respiratoria. La anterior corresponde a el curso clásico de la espundia, encontrada predominantemente en el Amazonas brasilero. *L. braziliensis guyanensis* se disemina por vía linfática, con aparición de una cadena de lesiones no ulceradas. *Leishmania mexicana* se confina a una lesión única, indolora y ulcerada ⁽³²⁾.

Las personas con Leishmaniasis cutánea y/o mucosa presentan poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 en las lesiones, aunque la respuesta sistémica es predominantemente Th1. Se produce proliferación mononuclear en sangre periférica con liberación de interferón

gamma e interleucina-2 en respuesta a antígenos protozoarios in vitro, con respuestas de hipersensibilidad cutánea retardada en infectados evidenciada por pruebas de leishmanina en piel. Los eventos precisos que resultan en necrosis y cicatrización están por dilucidarse ⁽³³⁾.

2.1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de las formas cutáneas y mucosas se realiza en laboratorio a través de la identificación de amastigotes en tinción de Giemsa de muestras tomadas de biopsias, raspados o frotis de las lesiones. Los amastigotes se observan como cuerpos ovalados de 2 – 4 micrómetros de diámetro, con un núcleo característico y kinetoplastos. El material del fondo de la úlcera usualmente tiene el mayor rendimiento; sin embargo, algunos autores no han encontrado diferencias cuando se toman muestras del borde de la úlcera o de incisiones tangenciales ⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾. De manera convencional, se disecan 3 a 5 aspirados de diferentes lesiones. Las primeras muestras se deben usar para la microscopia y las últimas para el cultivo, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación ⁽³⁶⁾. La combinación de microscopía con cultivo aumenta la sensibilidad diagnóstico por arriba del 85% ⁽³⁵⁾⁽³⁷⁾.

En relación a la forma visceral, los métodos utilizados incluyen cultivo de muestras apropiadas, detección de antígenos, serología y detección del ADN protozoario.

- Cultivo y evaluación microscópica: las muestras para tinción más comúnmente utilizadas provienen de médula ósea y bazo, aunque también se pueden evidenciar amastigotes en biopsias de hígado y ganglios linfáticos. La sensibilidad en tejido esplénico es de 93%, sin embargo la punción se asocia a riesgo elevado de hemorragia fatal en centros con poca experiencia, comparada con la de médula ósea que oscila entre 60% y 85%⁽³⁸⁾. El rendimiento diagnóstico en extendido de sangre periférica es malo. El cultivo puede mejorar la sensibilidad, sin embargo es costoso, difícil de lograr y requiere tiempo prolongado.
- Detección de antígenos en orina: se usa un test de aglutinación en látex, el cual ha mostrado utilidad en casos de producción deficiente de anticuerpos, por tanto ha mostrado sensibilidad y especificidad de 100% Y 96% respectivamente, en inmunocomprometidos ⁽³⁹⁾. Debido a que se trata de una prueba simple y económica podría tener un gran papel en países en vía de desarrollo como herramienta de tamizaje.

- Serología: el método más usado y preferido es serodiagnóstico por ELISA debido a su alta sensibilidad y facilidad de uso. La especificidad depende del antígeno utilizado. Cuando se usan antígenos crudos solubles de promastigotes, la sensibilidad varía entre 80% a 100%, con una especificidad entre 84% y 95% ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁴¹⁾. Se presentan reacciones cruzadas con sueros de pacientes con tuberculosis, tripanosomiasis y toxoplasmosis ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾. Al utilizar moléculas antigénicas selectivas la especificidad se acercaba al 100% pero con una muy pobre sensibilidad (37%)⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. El antígeno rK39 ha mostrado alta reactividad al suero humano y canino de pacientes con Leishmaniasis visceral⁽⁴⁶⁾ con reportes de sensibilidad y especificidad cercanas al 99%; de igual manera la utilización de la proteína de fusión K28 en estudios realizados en Sudán y Bangladesh mostró sensibilidad entre 96% y 98% ⁽⁴⁶⁾.

2.1.6 Tratamiento

Los agentes terapéuticos más frecuentemente usados constan de: las sales de antimonio (estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina), pentamidina, miltefosina y anfotericina B. Desde el punto de vista farmacológico los agentes mencionados configuran una gran heterogeneidad en sus propiedades y efectos sobre el parásito.

A pesar de su uso por más de medio siglo, las sales de antimonio fueron un enigma en cuanto a su mecanismo de acción y propiedades farmacológicas. Se han propuesto 3 modelos:

- En el primero se describe que estos agentes son prodrogas que requieren reducción a formas trivalentes en el macrófago por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos ⁽⁴⁷⁾. De igual forma también se ha establecido reducción del fármaco por parte de amastigotes per se sin mediación de leucocitos, lo cual hace plausible ambas vías de activación, aunque con mecanismos no del todo claros. En el nuevo siglo se han identificado por lo menos dos vías de reducción de éstos fármacos ⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾: la primera por medio de una reductasa tiol dependiente relacionada a glutatión-S-transferasa con una alta expresión en amastigotes y la segunda a través de una homóloga de una arsenato reductasa de levadura dependiente de glutaredoxina. La exposición a las formas trivalentes ocasiona una rápida disminución de glutationes y tripanotiones, debido a que gran parte de estos compuestos son exportados fuera de las células y una parte restante son

convertidos intracelularmente a disulfuros. Lo anterior conlleva a una reducción sustancial en el potencial redox del amastigote con susceptibilidad importante a daño celular mediado por especies reactivas del oxígeno ⁽⁴⁷⁾.

- El segundo modelo afirma que la forma oxidada del fármaco posee actividad microbicida intrínseca. Estudios iniciales concluyen que el estibogluconato sódico inhibe la síntesis macromolecular en el parásito e interfiere en la glucólisis y la beta oxidación⁽⁵⁰⁾. También se ha propuesto la inhibición de la topoisomerasa I por lo cual el desanudamiento de ADN se vería truncado, especialmente en *Leishmania donovani* ⁽⁵¹⁾. Por otro lado se ha planteado, una unión covalente entre la forma reducida del medicamento y ribonucleósidos, lo cual podría inhibir los transportadores de purinas del parásito o actuar como análogos de purinas bloqueando las vías de salvamento de estos metabolitos⁽⁵²⁾.
- Finalmente el tercer modelo plantea que a través de la activación del sistema inmune del hospedero se produce la erradicación intracelular del parásito. Las sales de antimonio podrían inducir producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico en modelos murinos ⁽⁵³⁾. De igual forma se ha documentado incremento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I en el parásito y proliferación en linfocitos T, con la exposición a éstos medicamentos⁽⁵⁰⁾.

Aún menos conocida, la pentamidina y su farmacología aunque posiblemente se incluye mecanismos de acción consistentes en inhibición de la biosíntesis de poliaminas, unión al surco menor del ADN y efectos sobre potencial de membrana interna mitocondrial ⁽⁵⁴⁾.

En cuanto a miltefosina, única droga oral contra el parásito, su modo de acción no está del todo claro. Se ha descrito que interfiere en la biosíntesis de fosfolípidos y en el metabolismo de alquil lípidos ⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾, afectando la citocromo c oxidasa mitocondrial e induciendo despolarización mitocondrial con la consecuente disminución en niveles de ATP y muerte celular similar a apoptosis ⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾. El medicamento ingresa a la célula blanco a través de una ATPasa tipo P llamada transportador de miltefosina *Leishmania* (LMT)⁽⁵⁹⁾; la vida media de eliminación es de aproximadamente 120 horas por lo cual permanecen niveles subterapéuticos durante semanas⁽⁶⁰⁾.

La anfotericina B posee la capacidad de unirse al ergosterol de ciertas membranas celulares (hongos y parásitos como la *Leishmania*), lo cual sumado a su naturaleza

anfipática favorece a que la fracción hidrofóbica de la molécula se ensamble a la membrana de la célula blanco mientras que la fracción hidrofílica produce un poro; produciéndose un intercambio iónico importante con muerte celular secundaria ⁽⁶¹⁾. De igual forma, también induce estrés oxidativo y muerte celular por la unión per se de la molécula al ergosterol⁽⁶²⁾.

En Colombia, se dispone de lineamientos gubernamentales para el tratamiento de las formas más frecuentes de la enfermedad. En casos de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea⁽⁶³⁾:

- Previo a inicio de tratamiento, se debe realizar transaminasas, lipasas, amilasas, pruebas de función renal, electrocardiograma, electrolitos (para uso de Anfotericina B) y glicemia basal (para uso de pentamidina)
- Como primera línea uso de antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumine) 20 mg/kg/día vía intramuscular o endovenosa, dosis única diaria durante 20 días sin sobrepasar 20 centímetros cúbicos de medicamento por día con el fin de disminuir efectos adversos.
- En caso de falla terapéutica a primera línea, se prosigue con miltefosina vía oral 1.5 – 2.5 mg/kg/día hasta 150 mg máximos por día, durante 28 días. Otra opción es el isetionato de pentamidina de 3 – 4 mg/kg/día vía intramuscular o endovenosa de 4 a 10 dosis en días alternos según respuesta clínica. Como opción de rescate se cuenta con anfotericina B liposomal endovenosa 2 a 3 mg/kg/día hasta dosis máxima de 250 mg.
- Para Leishmaniasis mucocutánea el esquema de primera línea es igual a la presentación cutánea de la enfermedad. Sin embargo en tercer nivel de atención se recomienda el uso de los antimoniales pentavalentes + pentoxifilina oral a 20 mg /kg por día durante 30 días más + 400 mg pentoxifilina cada /8 h por 28 días o la anfotericina B liposomal intravenosa 2 a 3 mg / kg / día hasta una dosis acumulada de 3,5 gramos, máxima diaria de 250 mg durante al menos 20 días; anfotericina B desoxicolato intravenosa 0,7 a 1 mg / kg / día hasta 25 a 30 dosis o el isetionato de pentamidina 3 a 4 mg / kg / día en 7 – 10 dosis en días alternos; o Miltefosine 1,5 a 2,5 mg / kg / día durante 28 días con dosis máxima de 150 mg diarios en caso de falla terapéutica.

2.1.7 Respuesta terapéutica⁽²²⁾

Para Leishmaniasis cutánea debe realizarse evaluación clínica como mínimo al terminar el tratamiento y a los 45 y 90 días después de terminado, debiendo ser seguido al menos hasta los 6 meses post-tratamiento. Por ser visibles, accesibles y generalmente bien delimitadas, las lesiones cutáneas son fáciles de comparar; para ello al iniciar el tratamiento se deben medir y registrar debidamente en la historia de cada paciente. De esta manera quien haga el siguiente control tendrá una evidencia cuantificable para determinar si hay respuesta a la terapia. Después de 3 meses de tratamiento se definirá curación en caso de:

- Cicatrización con re-epitelización completa y aplanamiento del borde de las lesiones;
- Desaparición de la induración de la base;
- Desaparición de la linfangitis o adenitis en caso de que haya ocurrido;
- Ausencia de nuevas lesiones.

Para Leishmaniasis mucosa debe realizarse evaluación clínica como mínimo al terminar el tratamiento y seguir hasta los 24 meses después de terminado. Evaluar a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses. Los signos clínicos deben ser evaluados clínicamente y registrados (eritema, edema infiltración, erosión, ulceración y disfonía). De esta manera quien haga el siguiente control tendrá una evidencia cuantificable para determinar si hay respuesta a la terapia. Es necesario evaluar la respuesta terapéutica después de 6 meses del término del tratamiento para definir la necesidad de un nuevo esquema terapéutico. Además, es esperado completa resolución de los signos clínicos para definir curación. Criterios clínicos de curación de la leishmaniasis mucosa:

- El criterio de curación es de regresión de todos los signos clínicos y debe ser confirmado por el examen otorrinolaringológico a seis meses después de la finalización del tratamiento;
- Evaluación clínica al terminar el tratamiento, a los 3, 6 meses y luego semestralmente hasta 2 años;
- En ausencia del especialista, el médico debe estar capacitado para realizar por lo menos rinoscopía y oroscopía;

- Donde no hay condiciones, el paciente debe ser enviado al servicio de referencia para la evaluación de la curación;
- En las situaciones donde no hay la curación clínica o en caso de reactivación de la lesión, evaluar y hacer nuevo tratamiento.

En cuanto a la falla terapéutica se define cuando no hay curación clínica luego del tratamiento completo evaluado a los 3 meses para leishmaniasis cutánea y hasta 6 meses para leishmaniasis mucosa.

Por otro lado se considera recaída como la reactivación de una lesión previamente curada independientemente del tiempo de observación. La reinfección debe ser considerada cuando aparecen nuevas lesiones en sitios anatómicos diferentes y se tiene historia de nueva exposición.

2.1.8 Mecanismos de resistencia en Leishmaniasis

Las sales de antimonio constituyen la herramienta terapéutica de primera línea en las formas mucosas y cutáneas de la enfermedad, sin embargo no son ajenas a resistencia por parte del microorganismo, con la consecuente falla terapéutica. La disminución en la reducción a formas trivalentes del compuesto, la falta de transporte del fármaco al interior del amastigote y los niveles elevados de tripanotiones son algunos de los mecanismos propuestos que confieren resistencia por parte del parásito⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾. La sobreexpresión de transportadores ABC (dependientes de ATP) juega, al parecer, un papel importante en la remoción o eflujo de éstos medicamentos del amastigote, tales como el MRPA, ABC14, ABCG2 y el PRP1⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾. Por otro lado la sobreexpresión de la triparedoxina peroxidasa se ha asociado a resistencia debido a niveles elevados de tioles reducidos a nivel intracelular (cisteína, glutationes y tripanotiones) que confieren protección frente al estrés oxidativo inducido por las sales de antimonio⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾.

Algunos clones de promastigotes resistentes a pentamidina (*L.amazonensis*) han mostrado entre 18 a 75 veces menos capacidad de captación del medicamento concomitante a un aumento del eflujo del mismo⁽⁷¹⁾. También existen datos que muestran una acumulación reducida del fármaco en la mitocondria u otras organelas parasitaria como mecanismo importante de resistencia, lo cual permite una mayor disponibilidad del medicamento para el eflujo⁽⁷¹⁾.

De igual manera el principal mecanismo de resistencia a miltefosina observado es la reducción en la internalización del medicamento, debido a captación reducida y o a extrusión del fármaco como consecuencia de mutaciones en las proteínas LMT y/o LROs3⁽⁷²⁾. La sobreexpresión de transportadores ABC produce una reducción intracelular del medicamento por transporte del mismo a través de la membrana plasmática⁽⁷³⁾. Otras modificaciones en el protozoo se han propuesto como mecanismos de resistencia tales como una reducción en la longitud y el nivel de ácidos grasos insaturados, así como una reducción en los niveles de ergosterol⁽⁷⁴⁾; alteración en la expresión de genes que participan en el metabolismo de tioles y en la reparación del ADN⁽⁷⁵⁾.

Finalmente, la resistencia a anfotericina B ha sido rara y escasamente reportada, aunque los casos conocidos se han producido en pacientes inmunocomprometidos. Son pocos los estudios de resistencia a Anfotericina B, y algunos de ellos han mostrado cambios en la esterol metil transferasa lo cual ocasiona acumulación de metabolitos intermediarios de la vía del ergosterol⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾ y por tanto se trunca la acción del medicamento. Por otra parte se han descrito mutaciones en el gen que codifica la 14 alfa demetilasa, la cual hace parte de la vía de síntesis del ergosterol⁽⁷⁸⁾. Por último, al parecer las alteraciones en el transportador de miltefosine produce resistencia cruzada con anfotericina B y se atribuye a cambios en la composición lipídica de la membrana celular⁽⁷⁹⁾.

2.1.9 Pruebas de sensibilidad

Las pruebas de susceptibilidad mas reportadas en la literatura para leishmaniasis cutánea, son las utilizadas para evaluar respuesta a miltefosina y antimonio de meglumina⁽⁹⁾: en éstas se utiliza una reducción de parásitos intracelulares en macrófagos U-937 (diferenciados bajo tratamiento con forbol 12-miristato 13-acetato), infectados inicialmente con promastigotes opsonizados con suero humano AB positivo al 10% en una relación de 5 parásitos por macrófago. Éstas células se incuban 24 horas hasta la diferenciación del parásito a amastigote. Posteriormente el sobrenadante se reemplaza por el medio celular RPMI con 16 uM de línea celular resistente a miltefosina (HePC) o 32 ug/ml de antimonio de meglumina. No se cuenta con pruebas estandarizadas para evaluar respuesta in vitro a pentamidina.

3.Capitulo 3: Materiales y métodos

3.1 Diseño del estudio

La estrategia metodológica a emplear es un estudio de casos y controles, debido a que se determinará entre los pacientes enfermos con y sin falla terapéutica, la incidencia de la variable de predicción y la asociación correspondiente.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población diana

Pacientes adultos con Leishmaniasis cutánea americana

3.2.2 Población de estudio

Pacientes adultos con Leishmaniasis cutánea americana que asistieron al centro dermatológico Federico Lleras entre los años 2006 a 2012.

3.2.3 Tamaño de la muestra

Por tratarse de una cohorte preensamblada de pacientes, se determinará el poder del estudio mediante el calculo de la muestra. Éste último consiste en los pacientes que cumplan criterios de inclusión y no cumplan criterios de exclusión para el periodo entre 2006 a 2012 en el centro dermatológico Federico Lleras Acosta.

3.3 Criterios de inclusión

- Paciente adulto mayor a 18 años, con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea realizado a través de la identificación de amastigotes en tinción de Giemsa y/o cultivo de muestras tomadas de biopsias, raspados o frotis de las lesiones entre 2006 a 2012 en el centro dermatológico Federico Lleras Acosta.
- Paciente en quien se haya aplicado tratamiento farmacológico con sales antimoniales, miltefosine o pentamidina
- Paciente con cultivo y pruebas de susceptibilidad in vitro reportadas en los registros clínicos

3.4 Criterios de exclusión

- Paciente con menos de 3 meses de seguimiento posterior a tratamiento
- Paciente que hayan desarrollado efectos adversos a medicamentos
- Tratamiento farmacológico incompleto por condición médica subyacente que lo contraindique

3.5 Definición de variables

Para caracterizar a los pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, se pueden clasificar las variables así:

3.5.1 Variable de predicción: disminución de la sensibilidad in vitro a antileishmaniasicos.

3.5.2 Variables de resultado: falla terapéutica al tratamiento antileishmania.

3.5.2 Variables de confusión: edad, sexo, lugar de procedencia, escolaridad, especie de Leishmania aislada, fármaco antileishmania, tamaño de las lesiones, número de lesiones, ubicación de las lesiones.

Y las variables se operacionalizaron de la siguiente manera:

Macrovariable	Variable	Definición	Naturaleza	Nivel De Medición	Criterio De Clasificación
----------------------	-----------------	-------------------	-------------------	--------------------------	----------------------------------

Tabla 3-1. Operacionalizacion de variables

Características socio-demográficas	Edad	Número de años cumplidos por el paciente	Cuantitativa discreta	Razón	Número de años cumplidos
	Sexo	Condición orgánica que distingue macho de hembra	Cualitativa	Nominal	Masculino, femenino
	Lugar de procedencia	Sitio geográfico donde reside el paciente	Cualitativa	Nominal	Bogotá, Neiva, Ibagué, etc...
	Escolaridad	Nivel académico máximo alcanzado	Cualitativa	Nominal	Primaria, secundaria, técnico, profesional, magister, doctorado, ninguna
Características microbiológicas	Disminución de la sensibilidad in vitro a antileishmaniasicos	Ausencia en disminución de amastigotes intracelulares por microscopia optica	Cualitativa	Nominal	Si No
	Especie de Leishmania aislada	Conjunto o población natural con características semejantes	Cualitativa	Nominal	L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis
	Falla terapéutica al tratamiento antileishmania	Ausencia de: reepitelizacion completa o aplanamiento de los bordes de la lesión cutánea, desaparición de	Cualitativa	Nominal	Si No

Características terapéuticas		linfangitis o induración de la base de la lesión. O aparición de nuevas lesiones.			
	Fármaco antileishmania	Agentes terapéuticos con actividad antileishmania probada	Cualitativa	Nominal	Estibogluconato sódico, antimonioato de meglumina, pentamidina, miltefosina
Características clínicas	Tamaño de las lesiones	Dimensión física de lesión cutánea elemental (placa, nódulo, úlcera, etc...)	Cuantitativa continua	Razón	Centímetros que mide la lesión
	Numero de las lesiones	Cantidad máxima de lesión cutánea elemental (placa, nódulo, úlcera, etc...)	Cuantitativa discreta	Razón	Cantidad de lesiones en numero absoluto
	Ubicación de las lesiones	Localización anatómica de lesión cutánea elemental (placa, nódulo, úlcera, etc...)	Cualitativa	Nominal	Región anatómica (abdomen, tórax, extremidades, cabeza)

3.6 Análisis estadístico

Para cumplir los objetivos de la presente investigación, se determinará inicialmente medidas de frecuencia (prevalencia, tasas) y medidas de distribución (asimetría y curtosis) de los eventos y variables de interés con el fin de definir si la distribución es normal.

Adicionalmente se realizarán medidas de tendencia central (media, mediana y moda) con las variables cuantitativas para evaluar la representatividad de los datos.

Una vez determinada la normalidad de los datos se procede a calcular medidas de asociación mediante razón de probabilidades (OR), utilizando las variables de predicción del desenlace estudiado. Se llevará a cabo un análisis multivariado mediante regresión logística para las variables de confusión.

Planteando que en no existe asociación entre la resistencia del parásito en pruebas in vitro y la falla terapéutica como hipótesis nula, se realizarán test paramétricos y no paramétricos (X² y logrank test respectivamente) para prueba de hipótesis.

3.7 Procedimientos y recolección de la información

Para iniciar el proceso de ejecución del proyecto, se solicitará el debido permiso por escrito a los directivos del Centro dermatológico Federico Lleras Acosta ESE (*ver anexo A*), y se presentará el protocolo de investigación al personal del comité de ética de la mencionada institución.

Los datos serán tomados de fuente secundaria y la ejecución de la investigación tomará aproximadamente 6 meses. Se solicitará a área de estadística o archivo (*ver anexo B*) lista de pacientes (números de identificación) con diagnóstico de leishmaniasis cutánea para la posterior búsqueda. Se acudirá personalmente a la institución y se hará uso de computadores en áreas asistenciales de registro clínico para ingresar a software hospitalario (con usuario y clave asignados por centro asistencial) con el fin de obtener la información relacionada a las variables del estudio mediante la revisión exhaustiva de las historias clínicas.

Al momento de obtener la población de estudio, los datos serán recolectados en el formato de captura (*ver anexo B*), diseñado con el objetivo de incluir de manera rápida los datos requeridos.

Adicionalmente, la información será digitalizada en Excel y posteriormente analizada mediante el software SPSS statics 25 por medio del cual se crean las tablas y gráficos. Se emplea un equipo Mac Book Pro 13 con procesador Intel® Core I5® Dual-Core 2.5 GHz, 4 Gb de memoria, 500 Gb de disco duro y monitor a color de 13 pulgadas.

3.8. Financiación

Principal recurso económico requerido, relacionado con el recurso humano destinado a la construcción del protocolo de investigación, recolección de datos y respectivo análisis para posterior presentación final. Financiación aprobada por Colciencias.

4. Capítulo 4: Resultados y discusión

4.1 Resultados

El presente trabajo muestra los resultados finales con la recolección total de los pacientes y el análisis estadístico respectivo.

De las 51 historias clínicas que conformaron la población de estudio se excluyeron 3 por ser menores de edad, 3 por tratarse de Leishmaniasis mucocutánea y 11 por información o seguimiento clínico incompleto, con lo cual se obtuvo una muestra de 34 pacientes en total. Los pacientes con leishmaniasis cutánea y sensibilidad disminuida conformaban los casos (8 sujetos) y aquellos con sensibilidad preservada constituían los controles (26 sujetos). En la tabla 4-1 se muestra la distribución demográfica y en la tabla 4-2 las características clínicas. No se obtuvo la variable escolaridad dado que no estaba reportada en los registros clínicos.

Tabla 4-1. Distribución demográfica

Variable	Casos (porcentaje) n=8	Controles (porcentaje) n=26	Total (porcentaje) n=34
Edad (Media)	51	46	48
Sexo			
- Masculino	5 (62.5)	20 (76.9)	25 (73.5)
- Femenino	3 (37.5)	6 (23.1)	9 (26.4)
Lugar de procedencia			
- Acandí (Chocó)	0	1 (3.84)	1 (2.94)
- Anolaima (Cundinamarca)	1 (12.5)	0	1 (2.94)
- Bogotá	1 (12.5)	4 (15.38)	5 (14.7)
- Concordia (Antioquia)	0	1 (3.84)	1 (2.94)
- Cumaribo (Vichada)	1 (12.5)	0	1 (2.94)
- Guayatá (Boyacá)	0	1 (3.84)	1 (2.94)

- Guepsa (Santander)	0	1 (3.84)	1 (2.94)
- La Hormiga (Putumayo)	1 (12.5)	0	1 (2.94)
- Mesitas del colegio (Cundinamarca)	0	2 (7.69)	2 (5.88)
- Otanche (Boyacá)	1 (12.5)	7 (26.9)	8 (23.5)
- Puerto Siare (Meta)	0	1 (3.84)	1 (2.94)
- Remolinos del Caguán (Caquetá)	0	1 (3.84)	1 (2.94)
- San Gil (Santander)	0	1 (3.84)	1 (2.94)
- San José del Guaviare (Guaviare)	0	4 (15.38)	4 (11.76)
- San Juan de Arama (Meta)	1 (12.5)	0	1 (2.94)
- Vista Hermosa (Meta)	1 (12.5)	0	1 (2.94)
- Villeta (Cundinamarca)	1 (12.5)	2 (7.69)	3 (8.82)

Tabla 4-2. Características clínicas

Variable	Casos (porcentaje) n=8	Controles (porcentaje) n=26	Total (porcentaje) n=34
Falla terapéutica			
- Si	2 (25)	5 (19.3)	7 (20.6)
- No	6 (75)	21 (80.7)	27 (79.4)
Especie de Leishmania aislada			
- L. Braziliensis	5 (62.5)	13 (50)	18 (52.9)
- L. Panamensis	3 (37.5)	13 (50)	16 (47.1)
- L. Guyanensis	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fármaco antileishmania			
- Antimoniato de meglumina	7 (87.5)	26 (100)	33 (97)
- Miltefosina	1 (12.5)	0 (0)	1 (3)
Numero de lesiones (Media)	2	1.76	1.82

Tamaño de lesiones en cm ² (Media)	28	22.4	23.7
Ubicación de lesiones			
- Cara	0 (0)	6 (23)	6 (17.6)
- Cuello	0 (0)	1 (3.8)	1 (2.9)
- Antebrazos	3 (37.5)	4 (15.3)	7 (20.5)
- Brazos	1 (12.5)	5 (19.2)	6 (17.6)
- Manos	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- Tórax	1 (12.5)	1 (3.8)	2 (5.8)
- Abdomen	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- Genitales	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- Dorso	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- Región lumbar	1 (12.5)	1 (3.8)	2 (5.8)
- Muslos	0 (0)	2 (7.6)	2 (5.8)
- Piernas	2 (25)	5 (19.2)	7 (20.5)
- Pies	0 (0)	0 (0)	0 (0)
- Cuero cabelludo	0 (0)	1 (3.8)	1 (2.9)

Alrededor del 73.5% de los sujetos eran hombres y la media de edad se ubicó en 48 años. El 23.5% y el 14.7% procedían de Otanche (Boyacá) y Bogotá respectivamente. La falla terapéutica presentó una prevalencia del 20.6%; disminución de sensibilidad a meglumina en 87.5% y miltefosina en 12.5%; sensibilidad disminuida para *Leishmania Braziliensis* 62.5% y para *Leishmania Panamensis* 37.5%. No hubo pacientes tratados con pentamidina. *Leishmania Braziliensis* y *Panamensis* tuvieron una prevalencia de 52.9% y 47.1% respectivamente. No se documentaron infecciones por *Leishmania Guyanensis*. Adicionalmente los pacientes en promedio tenían 1.8 lesiones con compromiso de piernas y antebrazos en 20.5% de los casos.

El OR entre sensibilidad disminuida y falla terapéutica fue 0.71 (IC 95% 0.085-9.39). X^2 para prueba de hipótesis 0.12. La edad, especie del parásito, número de lesiones, tamaño y ubicación de lesiones no mostraron asociación con fracaso terapéutico mediante análisis de regresión logística.

4.2 Discusión

Éste trabajo arroja resultados interesantes a tener en cuenta. La distribución demográfica en términos de sexo es similar a la reportada por el Instituto Nacional de Salud⁽²³⁾, aunque no para la edad la cual se describe con mayor frecuencia en población de 20 a 24 años. Las especies con mayor circulación en Colombia corresponden a *Leishmania Panamensis*

y *Leishmania Braziliensis* de acuerdo a una amplia revisión de la literatura reciente⁽⁸⁰⁾, lo cual es congruente con los hallazgos del presente estudio. Geográficamente la distribución de las especies encontradas coincide en parte con observaciones previas⁽⁸⁰⁾⁽⁸¹⁾ en las cuales se describe prevalencia alta en Cundinamarca aunque no así en Boyacá o Guaviare como fue hallado en ésta investigación. En cuanto el porcentaje de falla terapéutica los hallazgos se asemejan datos previos para Colombia que oscilan entre 15.6%⁽⁷⁾ hasta 39%⁽⁴⁾, con cifras similares en otros países como Perú (16%)⁽²⁾ o Brasil (23.9%)⁽³⁾.

Adicionalmente no se encontró asociación entre la disminución en sensibilidad in vitro con el fracaso terapéutico y ninguna de las otras variable predecía ese desenlace (incluyendo especie del parásito, edad, tamaño de lesiones o lugar de procedencia). Esto contrasta con datos de Perú⁽¹¹⁾ en los cuales la especie *Leishmania Braziliensis* predecía fracaso terapéutico y datos de investigadores en Cali⁽⁷⁾ en los cuales haber recibido antimonio de meglumina predecía falla terapéutica a miltefosina, sin embargo en éste trabajo solo 1 paciente recibió dicho medicamento. Berman et al⁽¹⁴⁾ encontró tasas de eliminación cercanas al 90% en un estudio in vitro donde las concentraciones en laboratorio eran similares a las séricas y Grogl et al, documenta una correlación entre el 86% al 89% para desenlaces clínicos respecto a la prueba de sensibilidad por microdilución, sin embargo estos estudios no son comparable al diseño del presente trabajo. Por otra parte se han realizado estudios de correlación en los cuales se muestran datos positivos entre la sensibilidad in vitro y el desenlace clínico⁽¹⁶⁾⁽⁸²⁾⁽⁸³⁾, aunque sin medición de medidas de asociación.

El presente trabajo ofrece una aproximación metodológica no implementada hasta el momento con lo cual el nivel de evidencia de los hallazgos puede ser mayor a las investigaciones basadas en correlación únicamente. Adicionalmente presenta datos más generales en términos de población, lugar de procedencia y fármacos utilizados por lo que puede generalizarse con mayor facilidad al escenario clínico.

Sin embargo no está exenta de limitaciones, dentro de las cuales la muestra pequeña, el carácter retrospectivo y la asimetría en la distribución de casos y controles constituyen las principales a tener en cuenta.

5. Capítulo 5: Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se puede concluir que no existe asociación entre la sensibilidad in vitro y los desenlaces clínicos. De las variables adicionales estudiadas ninguna predice el desenlace clínico en mención.

5.2 Recomendaciones

Con los datos obtenidos se concluye que las pruebas de sensibilidad posiblemente no este recomendado su uso de manera sistemática como parte de las ayudas para toma de decisiones en el escenario clínico.

Anexo A: Formato de captura para recolección de datos

Se marcará con una X la información solicitada, cuando corresponda:

Formato No: _____.

-Edad:

-Sexo: M____; F_____.

-Lugar de procedencia:

-Escolaridad:

-Sensibilidad disminuida in vitro: Si__ No__

-Especie de Leishmania aislada: L. braziliensis__ L. panamensis__ L. guyanensis__

-Falla terapéutica: Si__ No__

-Fármaco antileishmania: antimoniato de meglumine__ isetionato de pentamidina__ miltefosine__

-Número de lesiones:

-Tamaño de las lesiones:

-Ubicación de las lesiones: cuero cabelludo__ rostro__ cuello__ Torax anterior__ tórax posterior__ Brazo derecho __ brazo izquierdo__ antebrazo derecho__ antebrazo izquierdo__ palma de mano derecha__ palma de mano izquierda__ dorso de mano derecha__ dorso de mano izquierda__ abdomen__ Zona lumbar__ Zona pélvica anterior__ genitales__ Zona sacra__ glúteos__ Muslo derecho__ Muslo izquierdo__ pierna derecha__ pierna izquierda__ planta de pie derecho__ planta de pie izquierdo__ dorso de pie derecho__ dorso de pie izquierdo__ articulación (mencionar cuál)___

Bibliografía

1. Bermudez H, Rojas E, Garcia L, et al. Efficacy and safety of a generic sodium stibogluconate for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Hyg.*2006;100:591-600
2. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, et al. A low dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow up studies. *Am J Trop Med Hyg.*1997;57:651-655.
3. Llanos Cuentas A, Tulliano G, Araujo Castillo R. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous Leishmaniasis in Peru.2008;46(2):223-231.
4. Palacios R, Osorio LE, Grajales LF, et al. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg.*2001;64:187-193.
5. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 2006;193(10):1375-1383.
6. Obonaga R, Fernandez OL, Valderrama L. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species. *Antimicrob Agents Chemother.*2014;58(1):144-152.
7. Castro MM, Cossio A, Velasco C, Osorio L. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimonate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: a cohort study. *Plos Negl Trop Dis.*2017;11(4):e005515 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005515>
8. Robledo SM, Puerta JA, Muñoz DL, Guardo M, Velez ID. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *L. panamensis* en Colombia. *Biomédica.*2006;26(1):188-193.
9. Fernandez OL, Diaz Toro Y, Ovalle C, et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. *Plos Negl Trop Dis.*2014;8(5):e2871 DOI: 10.1371/journal.pntd.0002871
10. Arevalo J, Ramirez L, Adui V, et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with american tegumentary leishmaniasis. *The journal of infectious diseases.* 2007;195:1846-1851.

11. Llanos Cuentas A, Tulliano G, Araujo Castillo R, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clinical infectious diseases*.2008;46:223-231.
12. Coelho A, Trinconi C, Costa C, Uliana S. In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a leishmania amazonensis isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e2999 DOI: 10.1371/journal.pntd.0002999
13. Espada C, Ribeiro Dias F, Dorta M, et al. Susceptibility to miltefosine in Brazilian clinical isolates of Leishmania braziliensis. *AM J Trop Med Hyg*.2017;96(3):656-659.
14. Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD, Oster CN. Susceptibility of clinically sensitive and resistant Leishmania to pentavalent antimony in vitro. *Am J Trop Med Hyg*. 1982; 31(3 parte 1):459-465.
15. Grogil M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 47(1):117-126.
16. Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. Sensitivity to glucantime of leishmania viannia isolated from patients prior treatment. *J Parasitol*. 1999; 85(2):360-366.
17. Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, et al. Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of Leishmania spp from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43:464-480
18. Azeredo Coutinho RB, Mendoza SC, Callahan H, et al. Sensitivity of Leishmania braziliensis promastigotes to meglumine antimoniate is higher than that of other Leishmania species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol*. 2007;93(3):688-693.
19. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27:305-318.
20. Kolaczinski JH, Hope A, Ruiz JA, et al. Kala-azar epidemiology and control, southern Sudan. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:664- 666
21. Magill AJ. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect Dis Clin North Am*. 2005;19:241-266
22. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

23. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral, Colombia, 2018. Bogotá, 2018. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS_2018.pdf (último acceso 29 de Junio de 2019)
24. Bailey F, Mondragon Shem K, Hotez P, et al. A new perspective on cutaneous Leishmaniasis implications for global prevalence and burden of disease estimates. *Plos Negl Trop Dis.* 2017;11(8):e0005739 DOI: [10.1371/journal.pntd.0005739](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005739)
25. Hotez PJ, Alvarado M, Basañez MG, et al. The global burden of disease study 2010: Interpretation and implications for neglected tropical diseases. *Plos Negl Trop Dis.* 2014;8(7):e2865 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>
26. Okwa OO. Tropical parasitic diseases and women. *Ann Afr Med.* 2007; 6: 157–163
27. Homsy Y, Makdisi G. Leishmaniasis: a forgotten disease among neglected people. *Int J Health.* 2010; 11: 2
28. Magill Alan. Leishmania species: visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. En: Principles and practice of infectious disease. Seventh edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. 3463-3480.
29. Akhoundi M, Downing T, Votynka J, et al. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine.* 2017;57:1-29.
30. Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007;39:839-847.
31. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:581-596.
32. Medical parasitology. En: Medical microbiology. 27th edition. New York: Mc Graw Hill; 2013. 705-739.
33. Ghersetich J, Menchini G, Teofoli P, et al. Immune response to Leishmania infection in human skin. *Clin Dermatol.* 1999;17:333-338.
34. Weina PJ, Neafle RC, Wortmann G, Polhemus M, Aronson NE. Old World leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 1674-1680
35. Ramirez JR, Aduelo S, Muskus C. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitological diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3768-3773.

36. Vega-López F. Review: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect.* 2003; Dis 16: 97-101.
37. Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hazt C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother.*2004; 53: 158-166.
38. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*2011; 105: 1-6
39. Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Ausina V, Tural C, Muñoz C. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *J Clin Microbiol.*2004; 42: 1853-1854.
40. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) & IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.*2002; 40: 1037-1043.
41. Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Martin SK. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods.*2001; 252: 105-119.
42. Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis, prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.*2001; 8: 1220-1224.
43. Elmahallawy EK, Martínez AS, Rodríguez Graner J, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.*2014;8(8):961-972.
44. Maurya R, Mehrotra S, Prajapati VK, Nylén S, Sacks D, Sundar S. Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing leishmania parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.*2010; 48: 1932-1934.
45. Vinayak VK, Mahaja D, Sobot RC, Singl N, Sunda S. Anti-66 kDa anti-leishmanial antibodies as specific immunodiagnostic probe for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.*1994; 99: 109-114.
46. Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, et al. A Design development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*2010; 4: e822.

47. Croft S, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*.2006;19(1):111-126.
48. Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite specific thiol dependent reductase, TDR1. *Biochem J*. 2004;381:405-412
49. Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. *J Biol Chem*. 2004;279:37445-37451.
50. Haldar AK, Sen P, Roy S. Use of antimony in the treatment of Leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*.2011:PMID 571242
51. Walker J, Saravia NG. Inhibition of Leishmania donovani promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerase I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *Journal of parasitology*. 2004;90(5):1155-1162.
52. Ferreira CDS, Castro Pimienta AM, Demicheli C, Frezard F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. 2006;19(5):573-581.
53. Basu JM, Mookerjee A, Sen P, et al. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3 kinase and mitogen activated protein kinase activation in Leishmania donovani infected macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.2006;50(5):1788-1797.
54. Bray P, Barrett MP, Ward SA, Konning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol*. 2003;19:232-239.
55. Barratt G, Saint Pierre Chazalet M, Loiseau PM. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. *Curr Drug Metab*.2009;10(3):247-255.
56. Lux H, Heise N, Klenner T, et al. Ether lipid (alkyl phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether lipid analogues in Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*.2000;111:1-14.
57. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis like death in Leishmania donovani promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*.2004;48:852-859.

58. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of Leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.*2012;67(11):2576-2597.
59. Perez Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem.* 2003;278:49965-49971.
60. Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of Leishmaniasis: clinical evidence of informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag.*2007;3(5):733-740.
61. Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol.* 1996;152(1):65-75
62. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Turtle MD, et al. Amphotericin forms an extra-membranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol.* 2014;10(5):400-406.
63. Ministerio de salud y protección social. Lineamientos para la atención clínica integral de leishmaniasis en Colombia. Bogotá; 2018. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf> (ultimo acceso 15 de Mayo de 2019).
64. Maltezou H. Drug resistance in visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*2010;2010:PMID:19888437
65. Singh N. Drug resistance mechanism in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):411-422.
66. El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, et al. Role of the ABC transporter MRPA in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracelular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1988-93.
67. Manzano JI, Garcia Hernandez R, Castanys S, Gamarro F. A new ABC half transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57():3719-30.
68. Perea A, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. The LABC2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* is involved in antimony resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3489-96

69. Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Roles of trypanothione S transferase and trypanothione peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1359-65
70. Mandal G, Wyllie S, Singh N, Sundar S, Fairlamb AH, Chatterjee M. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology.* 2007;134(Pt 12):1679-87
71. Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MO. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3731-3738.
72. Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of Leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(5):733-740.
73. Castanys Muñoz E, Perez Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. Characterization of an ABCG like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3573-3579.
74. Rakotomanga M, Sain Pierre Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of fatty acid sterol metabolism in miltefosine resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug membrane interactions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2677-2686.
75. Gamarro F, Sanchez Caete MP, Castanys S. Mechanisms of miltefosine resistance in *Leishmania*. En: *Drug resistance in Leishmania parasites*. First Edition. Springer Verlag. 2013.
76. Purkait B, Kumar A, Nandi N, et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):1031-1041.
77. Pourshafie M, Morand S, Virion A, Rakotomanga M, et al. Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24-Delta-sterol-methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild type and amphotericin B resistant promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2409-2414.
78. Mwenechanya R, Kovarova J, Dickens NJ, et al. Sterol 14 alpha demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):e0005649 PMID: 28622334.

79. Fernandez Prada C, Vincent IM, Brotherton MC, Roberts M, Roy G, et al. Different mutations in a P-type ATPase transporter in *Leishmania* parasites are associated with cross resistance to two leading drugs by distinct mechanism. *Plos Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0005171. PMID:27911896
80. Salgado Almario J, Hernandez CA, Ovalle CE. Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. *Biomedica.* 2019 Jun 15;39(2):278-290
81. Ramirez JD, Hernandez C, León CM, et al. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep.* 2016 Jun 22;6:28266
82. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *J Infect Dis.* 2006 May 15;193(10):1375-83.
83. Azeredo Coutinho RBG, Mendoca SCF, Callahan H, et al. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol.* 2007 Jun;93(3):688-693