

Artículo Original

MODELO MACRÓFAGO HUMANO-AMASTIGOTE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS QUIMIO-RESISTENTES DE LEISHMANIA, PRUEBA DE CONCEPTO

A human macrophage-amastigote model for chemo-resistant isolates identification in Leishmania, a proof of concept

Ronald Alexander Ramírez-Flamerich¹ , Maritza Padrón-Nieves² , Alicia Ponte-Sucre³ 

Resumen

Introducción: Este trabajo utilizó un modelo macrófago humano-amastigote como herramienta para recrear in vitro la infección causada por aislados de pacientes con fracaso terapéutico y valorar su utilidad en la identificación de aislados de *Leishmania* con fenotipo quimio-resistente. **Objetivos:** (1) Evaluar un modelo in vitro de macrófago humano-amastigote y (2) Determinar su utilidad en la identificación de aislados de *Leishmania* con fenotipo quimio-resistente. **Métodos:** Se evaluó un protocolo de purificación basado en la capacidad de los monocitos de adherirse al plástico. Monocitos purificados de sangre humana fueron infectados con promastigotes metacíclicos de especies de referencia y aislados de *Leishmania* de tres pacientes con falla terapéutica a antimoniales. Se determinó el porcentaje de infección inicial y el efecto leishmanicida de glucantime, anfotericina-B y pentamidina; se correlacionó la capacidad leishmanicida con los niveles de producción de óxido nítrico en cada condición estudiada. **Resultados:** Los resultados sugieren que el modelo macrófago humano-amastigote empleado recrea in vitro la infección causada por especies de referencia, o con aislados de pacientes con fracaso terapéutico. Adicionalmente sugieren que en monocitos infectados (1) con el aislado VE98MR no puede

definirse una IC₅₀ para glucantime ni para pentamidina y (2) con el aislado VE96ZC no puede definirse una IC₅₀ para glucantime mas si para pentamidina. De igual forma, se evidencia una disminución efectiva del porcentaje de infección susceptible a anfotericina-B, para todos los aislados y cepas de referencia. El efecto leishmanicida no se correlaciona con aumentos significativos de la producción de óxido nítrico. **Conclusiones:** El modelo macrófago humano-amastigote empleado constituye una prueba de concepto que permitió identificar como aislados potencialmente quimio-resistentes a *L. (L.) amazonensis* (VE98MR) y *L. (L.) mexicana* (VE96ZC), mas no al aislado *L. (L.) amazonensis* (VE2000MM).

Palabras clave: Monocitos, Macrófago, Purificación, Fracaso terapéutico, *Leishmania*, Marcadores de quimio-resistencia.

Abstract

Introduction: This work used a human-amastigote macrophage model as a tool to recreate in vitro infection caused by isolates from patient's with therapeutic failure and assess its usefulness in the identification of chemo-resistant *Leishmania* isolates. **Objectives:** (1) Evaluate in vitro a human-amastigote macrophage model and (2) determine its usefulness in the identification of *Leishmania*

Recibido: 28/07/2018 Aceptado: 06/11/2018

Declaración de conflicto de interés de los autores: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Fuentes de financiamiento: El estudio fue parcialmente financiado por el CDCH-UCV PI-09-8717-2013 y PG-09-8646-2013/1, la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina-UCV y la Fundación Alejandro de Humboldt, Alemania.

1. Licenciado en Bioanálisis, Cátedra de Parasitología. Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela. ORCID: [0000-0003-2217-6800](https://orcid.org/0000-0003-2217-6800)

2. Doctor en Farmacología, Cátedra de Farmacología y Toxicología. Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela. ORCID: [0000-0001-5333-8097](https://orcid.org/0000-0001-5333-8097)

3. Doctor en Farmacología, Cátedra de Fisiología Normal. Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela. Correo electrónico: aiponte@gmail.com ORCID: [0000-0001-8135-0763](https://orcid.org/0000-0001-8135-0763)

isolates with chemo-resistant phenotype. Methods: A purification protocol based on the ability of monocytes to adhere to plastic was evaluated. Monocytes purified from human blood were infected with metacyclic promastigotes of reference species and Leishmania isolates from three patients with antimonial therapeutic failure. The percentage of initial infection and the leishmanicidal effect of glucantime, amphotericin-B and pentamidine were determined; the leishmanicidal capacity was correlated with the levels of nitric oxide production in each condition studied. Results: Results suggest that the human-amastigote macrophage model recreates in vitro the infection caused by reference species, or isolates from patients with therapeutic failure. In addition, they suggest that (1) an effective IC₅₀ for glucantime and pentamidine could not be defined in monocytes infected with the isolate VE98MR and (2) an effective IC₅₀ for pentamidine but nor for glucantime could be defined in monocytes infected with the isolate VE96ZC. On the contrary, an effective decrease in the percentage of infection susceptible to amphotericin-B was observed for all isolates and reference strains. The leishmanicidal effect did not correlate with significant increases in nitric oxide production. Conclusion: The human-amastigote macrophage model used constitutes a proof of concept to identify as potentially chemo-resistant isolates L. (L.) amazonensis (VE98MR) and L. (L.) mexicana (VE96ZC), but not L. (L.) amazonensis (VE2000MM).

Key Words: Monocytes, Macrophage, Purification, Therapeutic failure, Leishmania, Chemo-resistant markers.

Cita: Ramírez-Flamerich R, Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A. Modelo macrófago humano-amastigote para la identificación de aislados quimio-resistentes de *Leishmania*, prueba de concepto. Rev Digit Postgrado. 2018; 7(2): 9-17.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis constituye un reto para la salud pública en América debido al incremento anual de casos, y a la incidencia, morbilidad, amplia distribución geográfica, variedad de especies infectantes de parásito en las diversas formas clínicas de la enfermedad, así como por los deficientes esquemas terapéuticos y escasas medidas de prevención implementadas, todo ello compatible con una enfermedad desasistida. Originalmente rural, hoy se encuentra en franca expansión y su incidencia abarca también grandes

centros urbanos. El complicado control de vectores y reservorios, el aumento del fracaso terapéutico, y la ausencia de vacunas, son factores que también contribuyen a esta situación.⁽¹⁾

A nivel mundial se calcula que alrededor de 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, con unos 12 millones de personas afectadas y una ocurrencia anual de 1,5 a 2 millones de casos de la forma cutánea y 500.000 casos de la forma visceral.⁽²⁾ La leishmaniasis promueve pobreza en quienes la sufren. Es una enfermedad que produce estigma, debido a las deformaciones físicas asociadas. Su tratamiento es costoso y frecuentemente inasequible a quienes sufren la enfermedad, lo que impone una carga económica sustancial.⁽³⁾

En Venezuela, la leishmaniasis cutánea (LC) es endémica; su ámbito geográfico incluye los valles del sistema montañoso de la costa, la depresión de los llanos, el sur del Orinoco, la zona montañoso y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Carabobo, Aragua, Miranda y Sucre. El boletín epidemiológico más reciente (semana 52, 25 al 31 de diciembre de 2016) publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, reporta la cifra de 1.068 casos de leishmaniasis.⁽⁴⁾

El diagnóstico de la leishmaniasis incluye aspectos clínicos, epidemiológicos y parasitológicos como la anamnesis, y pruebas inmunológicas, serológicas y moleculares. Estas últimas, garantizan la identificación precisa del parásito asociado. Adicionalmente, coinfecciones como por ejemplo con el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) enmascaran 3 de las pruebas diagnósticas mencionadas, arrojando consecuentemente resultados falsos negativos.⁽³⁾

Con la ausencia de vacunas efectivas, la quimioterapia es la principal forma de control de la enfermedad. Sin embargo, los medicamentos, como los antimoniales pentavalentes en forma de glucantime o pentostam (Sb^V), son muy tóxicos y en algunas zonas geográficas hay un aumento notable de fracaso terapéutico, con causas diversas, entre ellas la selección de parásitos resistentes a Sb^V. Alquil-fosfolípidos como mitelfosina y edelfosina se utilizan hoy en día en la quimioterapia contra la leishmaniasis. La mitelfosina fue la primera droga de uso oral aprobada contra la leishmaniasis visceral (LV), y ha sido efectiva incluso en pacientes con fracaso terapéutico a Sb^V. La anfotericina-B (AMB) de alto costo y disponibilidad limitada en lugares donde la enfermedad es endémica, es efectiva. Lamentablemente ambos medicamentos promueven, al menos *in vitro*, la selección de aislados resistentes.⁽²⁾

En el Instituto de Biomedicina (Universidad Central de Venezuela) se ha desarrollado una inmunoterapia basada en la inoculación de cultivos (muertos) de promastigotes de *L. (V.) braziliensis* en conjunto con el bacilo *Calmette guérin* (como adyuvante). Este tratamiento ha producido porcentajes de cura cercanos a los logrados con el tratamiento con Sb^V (97,5 % en

promedio) en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL). Adicionalmente, en la Universidad de los Andes, en búsqueda de alternativas debido a la difícil adquisición de antimoniales a nivel internacional, se desarrolló la Ulamina, un compuesto equivalente a Sb^V.^(5, 6)

El uso de los medicamentos leishmanicidas, excepto la miltefosina (medicamento oral), es prolongado y suscita la aparición de efectos adversos, incluyendo dolor en el sitio de inyección y arritmias cardíacas. Estas secuelas promueven el abandono del tratamiento, exposición a dosis sub óptimas de los fármacos y consecuentemente, mayor probabilidad de supervivencia y selección de parásitos resistentes a los medicamentos utilizados. Adicionalmente, la toxicidad hepática y renal exhibida por la mayoría de los compuestos y su alto costo, han incentivado la búsqueda de nuevos medicamentos, de administración oral, con menos efectos secundarios, menos tóxicos y más económicos.^(7,8)

Una realidad a la cual debemos enfrentarnos cada día es la existencia del denominado fracaso terapéutico. Este es un fenómeno complejo cuyo origen tiene orígenes múltiples y complejos de analizar independientemente pero que pueden estar asociados a fenómenos vinculados con el fármaco utilizado, con el hospedero o con el agente patógeno. En este caso puede ocurrir, ya sea naturalmente o como condición adquirida (producto de la presión del medicamento), que el patógeno sea menos susceptible al fármaco. Sólo en este caso podemos hablar de quimio-resistencia.⁽⁹⁾ Por ello, la resistencia a fármacos se define como la disminución de la eficacia de un compuesto para eliminar una población de organismos (patógenos), originalmente susceptible a los mismos; esta definición asume la determinación previa de la susceptibilidad inicial, premisa que no siempre se cumple para *Leishmania*.⁽²⁾ La resistencia a drogas podría tener varias causas entre ellas, disminución de la entrada del fármaco a la célula -por cambios en el transportador requerido-, menor activación del medicamento por el hospedador, alteraciones en el sitio blanco de acción del compuesto y expresión aumentada de los transportadores a estas drogas.⁽²⁾

Como se mencionó anteriormente, el fracaso terapéutico puede parcialmente estar asociado a la infección con parásitos quimio-resistentes. Un método confiable para monitorear este fenómeno y que permite usar parásitos frescos aislados de pacientes es el modelo *in vitro* macrófago-amastigote. En este modelo se recrean las condiciones en las cuales el parásito interactúa con el macrófago, para cumplir su ciclo dentro del hospedador humano y tiene una alta validez y confiabilidad. Sin embargo, es una técnica laboriosa y costosa que requiere tiempo para obtener resultados, y usualmente se realiza con macrófagos de ratón, de línea celular inmortalizada o línea celular primaria, situación que frena su utilización en el laboratorio clínico.^(2, 9)

El presente trabajo evalúa un modelo macrófago humano-amastigote como herramienta para recrear *in vitro*, con la mayor precisión posible, la infección causada por aislados provenientes de pacientes con fracaso terapéutico a antimoniales y de esta forma valorar su utilidad en la identificación de aislados de *Leishmania* que expresen el fenotipo de resistentes.

MÉTODOS

Parásitos de referencia

Se utilizaron las especies de referencia certificadas por la Organización Mundial de la Salud: *L. (L.) mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21), donada por la Dra. Noris Rodríguez del Instituto de Biomedicina-UCV, y *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB/0016), donada por el Dr. Lee Schnur de la Universidad de Jerusalén. La susceptibilidad farmacológica del crecimiento de promastigotes de estas cepas ha sido evaluada anteriormente; las mismas se catalogan como cepas susceptibles.^(10, 11)

Parásitos aislados de lesiones en pacientes venezolanos

Los parásitos (denominados en este estudio aislados) fueron obtenidos de lesiones de tres pacientes de la consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina, MPPS-UCV. La información inicial de estas muestras refería que tenían leishmaniasis cutánea difusa (LCD) con fracaso terapéutico al tratamiento con glucantime. Los parásitos infectantes fueron identificados hasta nivel de especie mediante análisis e hibridación molecular en el laboratorio de Ingeniería Genética Biología Molecular del Instituto de Biomedicina.⁽¹²⁾ Los aislados se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso. Los mismos se descongelaron según protocolos convencionales y se sembraron en medio semisólido de agar sangre con suero glucosado (NaCl 150 mM y glucosa 83,3 mM) como medio líquido. Los aislados son: *L. (L.) amazonensis* (MHOM/VE/2000/MM y MHOM/VE/1998/MR), y *L. (L.) mexicana* (MHOM/VE/1996/ZC).

Purificación de Macrófagos (Modificado de Pérez 2007)⁽¹³⁾

Este trabajo se desarrolló respetando los principios bioéticos y las normas nacionales e internacionales para la investigación con seres vivos.⁽¹⁴⁾ El aval del proyecto y del consentimiento informado utilizado con los donantes de las muestras de sangre, se obtuvo del Comité Ético Científico del Instituto de Medicina Tropical, UCV.

Se tomó una muestra de sangre venosa periférica de cada individuo en tubos con anticoagulante EDTA hasta un volumen final de 12 mL. La muestra se diluyó en proporción 1:1 con Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0,85 % y la mezcla se colocó sobre una solución de Ficoll Paque (Histopaque Sigma-1077, No. 3248) en un tubo cónico de 15 mL manteniendo la proporción sangre-SSF-Ficoll Paque 4:1 (v/v). Esta mezcla se

centrifugó a 900 x g durante 30 min, 4°C (sin freno de desaceleración), para obtener una correcta separación de las diferentes fases: en la parte superior la fase acuosa con el plasma y SSF, y luego consecutivamente un anillo de células mononucleares, el Ficoll Paque y por último los eritrocitos y las células polimorfonucleares.

Las células mononucleares se colectaron con pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL, se lavaron con SSF y centrifugación a 900 x g durante 10 min, 3 veces a 4°C. Luego se realizó un último lavado con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 Gibco® n° cat. 23400-021) a 400 x g para eliminar la SSF restante. El botón celular se resuspendió en 5 mL de medio RPMI (completo, suplementado por suero bovino fetal 10 %, mercaptoetanol 2×10^{-5} M, L-glutamina 2×10^{-3} M, y gentamicina 20 µg/ml) y se transfirió a un frasco de cultivo de 25 mL que se incubó, 1 h, 37°C, 5 % CO₂. Posteriormente, se descartó el medio y se lavaron las células con SSF, para eliminar los linfocitos y plaquetas restantes en suspensión. Seguidamente se añadió RPMI completo y se incubó 24 h a 37°C, 5 % CO₂, hasta lograr una adhesión óptima.

Para separar las células adheridas al frasco de incubación se colocó la cámara 30 min, con agitación orbital, a 4°C, logrando así una separación mecánica espontánea de las células. Luego en la campana de flujo laminar se despegaron las células adherentes con tracción mecánica, se aspiró la suspensión, se transfirió a un tubo cónico de 15 mL, y se ajustó la densidad celular a la adecuada para la infección experimental con RPMI completo. La densidad de células adherentes y aislados se determinó al microscopio (Accuscope, China; aumento de 400 X) con una cámara de Neubauer mediante técnicas convencionales.

Citotoxicidad de las células adherentes a los medicamentos⁽¹⁵⁾

Las células adherentes obtenidas bajo las condiciones descritas, fueron servidas en placas de 96 pozos. A cada pozo se le añadió 200 µL a partir de una suspensión de 1×10^6 macrófagos/mL. Después de 24 h, se añadieron las drogas experimentales a las concentraciones de interés. Los efectos citotóxicos de las drogas se determinaron al agregar 20 µL de resazurin (colorante azul, débilmente fluorescente) en cada pozo. Este compuesto estima la viabilidad celular ya que el sistema enzimático lo reduce en células vivas a resorufina, compuesto fluorescente de color rosa o rojo intenso. Después de 3 h de incubación a 37°C 5 % CO₂ la fluorescencia fue medida a 550 nm y 630 nm en un fluorímetro (Victor²Wallac, Finlandia).

Infección Experimental: (Modificado de Ponte – Sucre y col. 2001)⁽¹⁶⁾

Las células adherentes se resuspendieron a una densidad 1×10^6 células/mL. Seguidamente se agregaron 400 µL de esta suspensión a cada pozo (0.8cm² por pozo) de una cámara de 8 pozos; la cámara se incubó a

37°C, 5 % CO₂, por 6 días hasta detectar ópticamente el cambio morfológico y estructural a macrófago.

Los promastigotes crecieron hasta la fase logarítmica tardía (estado metacíclico), momento en el cual se utilizaron para la infección. Los parásitos se lavaron con suero glucosado y se centrifugaron a 110 x g por 5 seg. Finalmente, se resuspendieron con RPMI completo a una densidad de 1×10^7 promastigote/mL.

A cada pozo de la cámara se le retiró el medio RPMI excedente y se le añadieron 400 µL de la suspensión de parásitos para mantener una proporción célula/parásito 1:10. Esta preparación se incubó durante 4 h, 37 °C, 5 % CO₂. Seguidamente se agregaron 6 concentraciones ascendentes de los antiparasitarios Sb^V, AMB y pentamidina (PEN) y se incubaron de nuevo por 24 h en las condiciones descritas anteriormente. Además, se incluyeron controles para determinar la viabilidad de los macrófagos infectados y no infectados. Al finalizar la incubación se conservaron los sobrenadantes de cada pozo a -20 °C, para la determinación de óxido nítrico.

A la placa de 8 pozos se le despegó la cubierta de pozos, para liberar la lámina portaobjeto, con las células adherentes infectadas. Esta lámina se fijó con metanol por 2 min, posteriormente se realizó una tinción tipo Romanowsky con una dilución del colorante 1:10 con agua destilada. Al cabo de 10 min se lavó el portaobjeto con agua destilada para eliminar los restos de colorante, se dejó secar y se enumeraron las células adherentes infectadas a las concentraciones de antiparasitarios escogidas en cada caso para su posterior análisis, utilizando un microscopio óptico (Accuscope China; aumento 1000 x).

Producción de Óxido Nítrico (Metodología de Griess)

Los niveles de Óxido Nítrico (NO) se determinaron mediante la reacción de Griess, fundamentada en la determinación de su compuesto estable, el nitrito (NO₂⁻).⁽¹⁷⁾

Los sobrenadantes de las diferentes condiciones experimentales se mantuvieron congelados hasta su uso. Se descongelaron y se sirvieron 50µL en cada pozo de una placa de Elisa; seguidamente se añadieron 50µL de la solución (1 % de Sulfanilamida disuelto en 2,5 % H₃PO₄), se agitó por 5 min, protegido de la luz solar, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se agregaron 50µL de la solución dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamina (NED) (0,1 % NED disuelto en agua destilada), y se agitó de nuevo por 5 min a TA, protegido de la luz. Finalmente, se leyó la placa de Elisa en un colorímetro a 540nm.

Tratamiento estadístico

Cada experimento se realizó al menos 3 veces, de forma independiente e incluyó controles positivos y negativos. Las curvas de susceptibilidad de macrófagos infectados y tratados con los medicamentos se analizaron por regresión no lineal. Para ello se comparó la concentración que inhibió el crecimiento del 50 % de

los parásitos aislados de los pacientes con aquella que inhibió en un 50 % el crecimiento de la cepa de referencia. Para calcular el IC₅₀ se utilizaron los programas Graph Pad Prism versión 6 y Microsoft Excel versión 2013.

RESULTADOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar un modelo in vitro de macrófago humano-amastigote (monocitos de sangre humana) y determinar su utilidad en la identificación de aislados de *Leishmania* con potencial fenotipo quimio-resistente, provenientes de pacientes con fracaso terapéutico contra Sb^V.

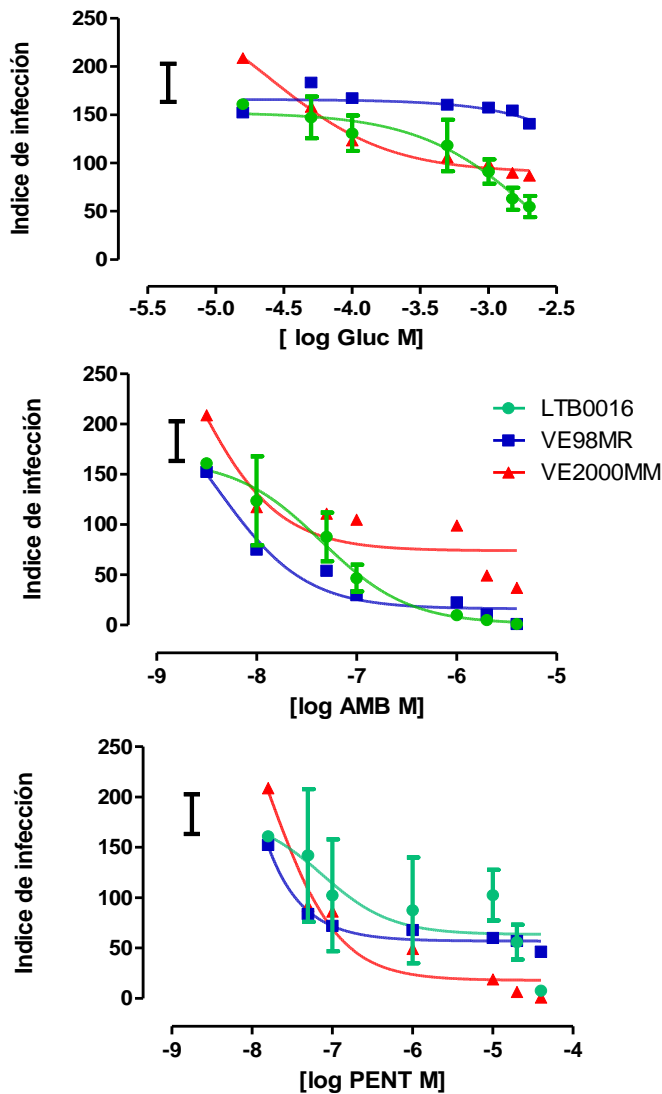


Figura 1. Susceptibilidad de *L. amazonensis* y aislados de pacientes a Sb^V, AMB y PEN. Las concentraciones utilizadas de los compuestos estuvieron en el rango de 10⁻⁹ y 10⁻⁴ M para anfotericina B y pentamidina y entre 10⁻⁶ y 10⁻³ M para glucantime.

La barra vertical ubicada al lado izquierdo de las figuras representa el rango del porcentaje de infección de macrófagos infectados no tratados.

La capacidad del monocito de adherirse al plástico es una herramienta que permite su enriquecimiento, al ser incubados a 37 °C, en una atmosfera estéril y húmeda. Esta propiedad permitió aislar una población celular pura con la cual evaluar la hipótesis de trabajo. Una vez purificados, los monocitos fueron infectados con promastigotes metacíclicos de especies de referencia y aislados de *Leishmania* provenientes de pacientes con fracaso terapéutico a Sb^V. Este protocolo permitió determinar la infección primaria y el efecto leishmanicida de medicamentos de primera y segunda línea tales como Sb^V, AMB y PEN. A partir de los datos obtenidos se calcularon concentraciones efectivas 50 (IC₅₀) para cada una de las cepas y aislados y cada uno de los medicamentos probados.

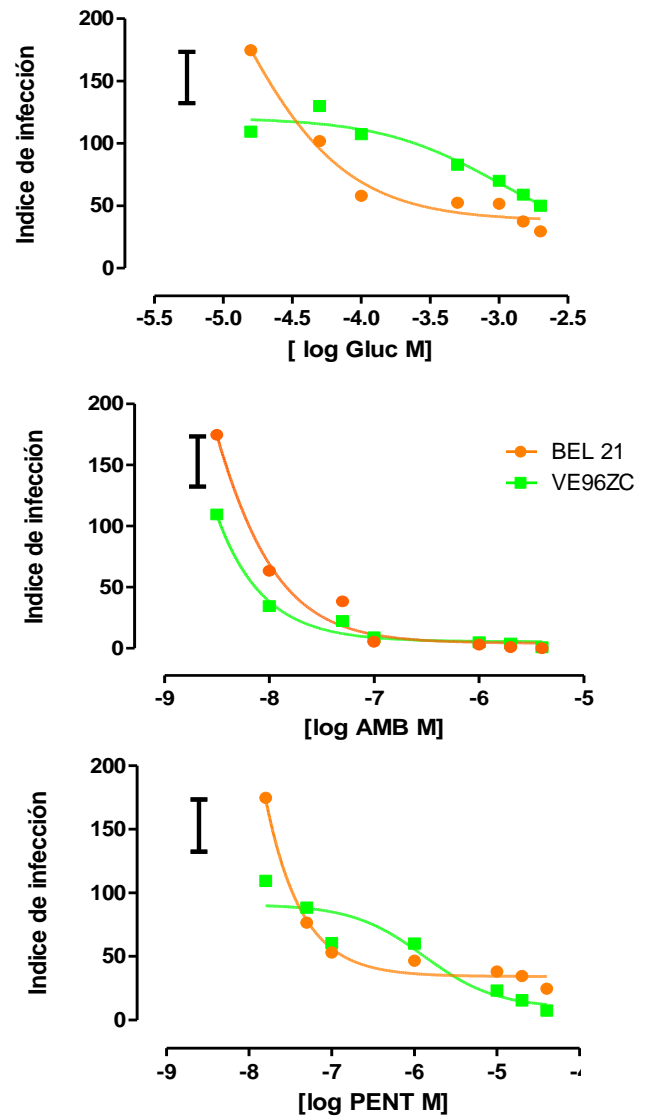


Figura 2. Susceptibilidad de *L. mexicana* y aislados de pacientes a Sb^V, AMB y PEN. Las concentraciones utilizadas de los compuestos estuvieron en el rango de 10⁻⁹ y 10⁻⁴ M para anfotericina B y pentamidina y entre 10⁻⁶ y 10⁻³ M para glucantime..

La barra vertical ubicada al lado izquierdo de las figuras representa el rango del porcentaje de infección de macrófagos infectados no tratados.

En las figuras 1 y 2 se ilustra el índice de infección de los monocitos humanos con *L. amazonensis* (LTB0016, VE98MR y VE2000MM) y *L. mexicana* (BEL21 y VE96ZC), respectivamente, graficado en función de la concentración utilizada del medicamento especificado, (A) Sb^V, (B) AMB y (C) PEN. En las tres gráficas puede observarse que el índice de infección en condiciones basales (ausencia de drogas) alcanza valores similares en todos los casos, ya sea en monocitos infectados con las especies de referencia o con alguno de los tres aislados de pacientes con fracaso terapéutico a Sb^V, el mismo se ubica en el rango de 180-220. Por otra parte, las gráficas ilustran cómo en la mayoría de los casos se pudieron construir curvas de susceptibilidad para cada uno de los medicamentos utilizados. Los resultados indican que el índice de infección en todas las cepas y aislados disminuye efectivamente en monocitos infectados y tratados con AMB, mas no en aquellos tratados con Sb^V y PEN (ver Figuras 1 y 2 y Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1. Comparación de los IC₅₀ para Glucantime (Sb^V), en macrófagos infectados con *L. amazonensis*, *L. mexicana* y aislados de pacientes.

Especie/Aislado	IC ₅₀ [M]	Intervalo de confianza (95 %)	R ²
<i>L. amazonensis</i> LTB0016	3,34 x10 ⁻³	8,728 x10 ⁻⁵ α 0,1274	0,6993
VE98MR	ND	ND	ND
VE2000MM	2,73 x10 ⁻³	8,596 x10 ⁻⁶ α 8,654 x10 ⁻⁵	0,8623
<i>L. mexicana</i> BEL 21	1,60 x10 ⁻⁵	1,988 x10 ⁻⁶ α 1,28 x10 ⁻⁴	0,7535
VE96ZC	1,48 x10 ⁻³	3,924 x10 ⁻⁵ α 0,05606	0,5242

Tabla 2. Comparación de los IC₅₀ para Anfotericina B (AMB), en macrófagos infectados con *L. amazonensis*, *L. mexicana* y aislados de pacientes.

Especie/Aislado	IC ₅₀ [M]	Intervalo de confianza (95 %)	R ²
<i>L. amazonensis</i> LTB0016	5,732 x10 ⁻⁸	2,992 x10 ⁻⁸ α 1,098 x10 ⁻⁷	0,9125
VE98MR	5,003 x10 ⁻⁹	1,854 x10 ⁻⁹ α 1,350 x10 ⁻⁸	0,9125
VE2000MM	2,325 x10 ⁻⁹	1,896 x10 ⁻¹⁰ α 2,850 x10 ⁻⁸	0,7907
<i>L. mexicana</i> BEL 21	2,472 x10 ⁻⁹	9,455 x10 ⁻¹⁰ α 6,461 x10 ⁻⁹	0,9598
VE96ZC	1,049 x10 ⁻⁹	4,566 x10 ⁻¹¹ α 2,411 x10 ⁻⁸	0,8829

Los datos descritos se resumen en las Tablas 1, 2 y 3. Las mismas demuestran cómo el Sb^V y la PEN no fueron capaces de disminuir el índice de infección de macrófagos infectados con el aislado VE98MR, incluso a concentraciones superiores a 10⁻⁴ M. Debido a ello no

pudo calcularse el IC₅₀ para este aislado y estos compuestos. En esas mismas tablas se detalla que el índice de infección de macrófagos infectados con el aislado VE2000MM son más susceptibles a Sb^V y PEN que macrófagos infectados con su especie de referencia homóloga LTB0016, mientras que los macrófagos infectados con el aislado VE96ZC fueron menos susceptibles a Sb^V y más susceptibles a PEN que los macrófagos infectados con su especie homóloga Bel 21. Todos los aislados tienen una susceptibilidad similar a AMB, comparado con sus especies homólogas.

Tabla 3. Comparación de los IC₅₀ para Pentamidina (PEN), en macrófagos infectados con *L. amazonensis*, *L. mexicana* y aislados de pacientes.

Especie/Aislado	IC ₅₀ [M]	Intervalo de confianza (95 %)	R ²
<i>L. amazonensis</i> LTB0016	1,38 x10 ⁻⁴	1,368 x10 ⁻³ α 1,397	0,4662
VE98MR	ND	ND	ND
VE2000MM	1,57 x10 ⁻⁸	4,396 x10 ⁻⁹ α 5,607 x10 ⁻⁸	0,9338
<i>L. mexicana</i> BEL 21	ND	ND	ND
VE96ZC	1,305 x10 ⁻⁶	1,613 x10 ⁻⁷ α 1,056 x10 ⁻⁵	0,4134

Seguidamente se determinaron los niveles de NO en los sobrenadantes de las diferentes condiciones experimentales a fin de establecer si el efecto leishmanicida de los compuestos ensayados se correlacionaba con un aumento de la producción de esta molécula. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.

LTB0016 indujo una producción de NO dosis dependiente con un máximo en presencia de 500 μM de Sb^V (log -3.30). Esta dosis de Sb^V es muy superior al IC₅₀ para esta droga, para esta cepa de referencia (3.34 μM). Un fenómeno similar ocurre en macrófagos infectados con el aislado VE98MR, pero a una dosis de Sb^V incluso mayor que la que induce la máxima producción de NO para LTB0016.

En el caso del aislado VE2000MM, los niveles de NO producidos están dentro del mismo rango que en los macrófagos infectados no tratados. El IC₅₀ para Sb^V en este aislado fue menor al encontrado para su especie de referencia, LTB0016. Por otra parte, en macrófagos infectados con VE2000MM y tratados con AMB los niveles de NO producidos fueron incluso menores que los encontrados en macrófagos infectados y no tratados.

Finalmente, los macrófagos infectados con Bel21 y no tratados produjeron similares niveles de NO que aquellos tratados con las drogas incluidas en el estudio, a las concentraciones ensayadas. Más aún, los macrófagos infectados con el aislado VE96ZC y tratados

con los compuestos estudiados inducen niveles similares de NO a los de las células infectadas y no tratadas.

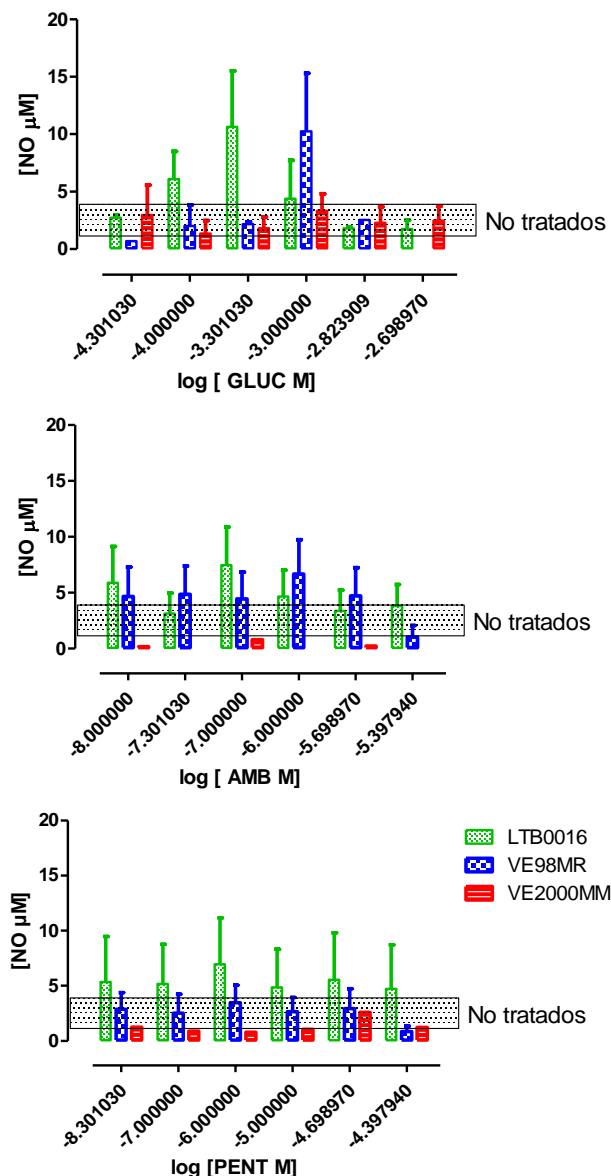


Figura 3. Producción de NO por macrófagos infectados con *L. amazonensis* y aislados de pacientes, tratados con SbV, AMB y PEN. Las concentraciones utilizadas de los compuestos estuvieron en el rango de 10^{-8} y 10^{-4} M para anfotericina B y pentamidina y entre 10^{-5} y 10^{-3} M para glucantime.

La barra punteada representa el rango de producción de NO de macrófagos infectados no tratados.

DISCUSIÓN

La quimio-resistencia es un fenómeno multifactorial vinculado, entre otras cosas, a la expresión de las proteínas transportadoras de drogas (MDR por las siglas en inglés, multi-drug-resistant) o glicoproteína-P (P-gp), y MRP por las siglas en inglés (multi-drug resistant associated protein). Ambos tipos de transportadores modulan la acumulación intracelular de agentes quimioterapéuticos. Adicionalmente, la expresión de quimio-resistencia se asocia a cambios bioquímicos y

fisiológicos claves para la supervivencia e infectividad del parásito.⁽¹⁸⁾

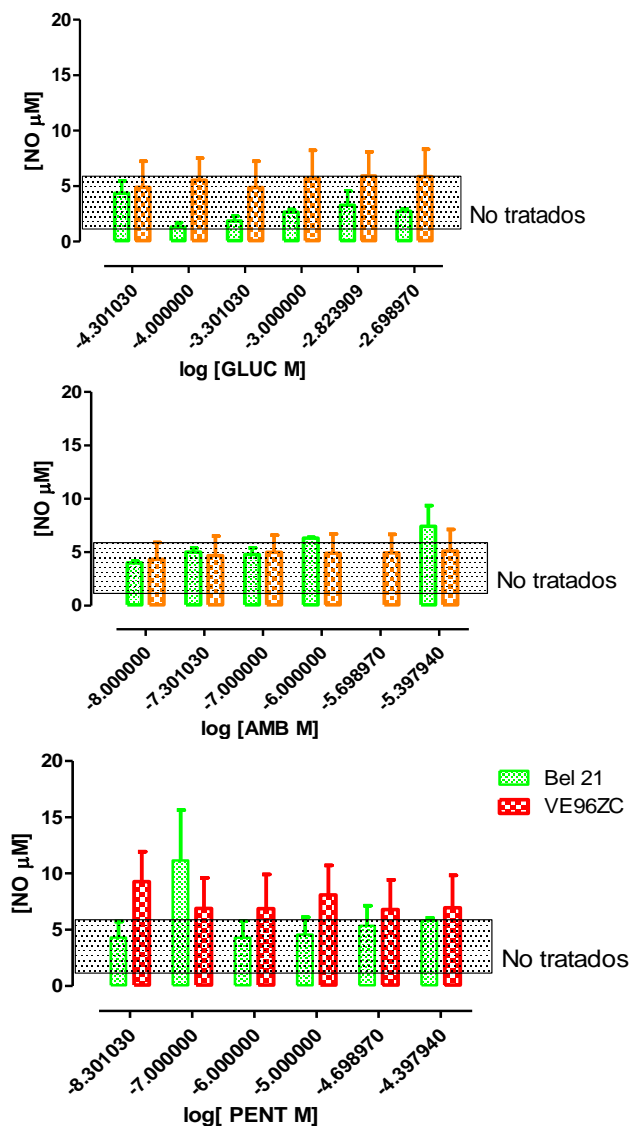


Figura 4. Producción de NO por macrófagos infectados con *L. mexicana* y aislados de pacientes, tratados con SbV, AMB y PEN. Las concentraciones utilizadas de los compuestos estuvieron en el rango de 10^{-8} y 10^{-4} M para anfotericina B y pentamidina y entre 10^{-5} y 10^{-3} M para glucantime.

La barra punteada representa el rango de producción de NO de macrófagos infectados no tratados.

El principal y más utilizado método disponible para monitorear la quimio-resistencia en parásitos aislados de pacientes es el modelo *in vitro* macrófago-amastigote.⁽¹⁹⁾ En este modelo se recrean las condiciones en las cuales el parásito interactúa con la célula, al cumplir su ciclo en el hospedador humano. A pesar de ser una técnica laboriosa, costosa y que requiere tiempo para obtener resultados, está validado y es confiable. Una desventaja es que utiliza macrófagos de ratón (línea celular inmortalizada o línea celular primaria), lo que desestimula su aplicación en el laboratorio clínico.^(9,20)

En el presente trabajo se utilizó la capacidad del monocito de adherirse al plástico como herramienta para obtener una población enriquecida de los mismos, luego de su incubación a 37 °C en una atmósfera estéril y húmeda.⁽¹³⁾ Así se obtuvo una población celular pura, y se constató su capacidad de ser infectada con promastigotes metacíclicos de especies de *Leishmania* de referencia, y de aislados obtenidos de pacientes con fracaso terapéutico. Las virtudes de este método, en comparación con otros, como el que utiliza la selección de células con esferas magnéticas se resumen en que: (a) utiliza una técnica sencilla y de bajo costo, y (b) los monocitos macrófagos aislados expresan una mejor -y mayor- capacidad fagocítica.⁽²¹⁾ Ambos argumentos resultan convincentes, especialmente si se piensa en su aplicabilidad para laboratorios de tamaño medianos e incluso laboratorios más generales que no ofrecen la realización de pruebas especializadas.

Así, en este trabajo se evaluó un modelo macrófago humano-amastigote y su utilidad en la identificación de aislados de *Leishmania* con fenotipo quimio-resistente. Para ello se determinó la infección primaria, así como el efecto leishmanicida de medicamentos de primera y segunda línea tales como Sb^V, AMB y PEN, y en base a los resultados obtenidos, esbozamos una identificación de cuales aislados serían potencialmente quimio-resistentes.

Por ejemplo, en el caso del paciente infectado con el aislado VE98MR solo se pudo determinar un IC₅₀ en macrófagos infectados tratados con AMB, mas no con Sb^V o PEN. Adicionalmente, las concentraciones de droga que se necesitaron para una producción de NO compatible con un efecto leishmanicida mediante este mecanismo de acción, fueron extremadamente altas. Ambos datos sugieren que en el caso del aislado VE98MR se pudiera estar en presencia de un parásito que expresa un fenotipo (multi) quimio-resistente.

Por otra parte, en el caso del paciente infectado con el aislado VE2000MM, el fracaso terapéutico evidenciado no podría correlacionarse inicialmente a la expresión de un fenotipo resistente. Esta conclusión parece razonable dado que, para todos los compuestos estudiados, los valores de IC₅₀ (indicadores de susceptibilidad), fueron incluso menores que los determinados en macrófagos infectados con la especie de referencia contraparte, LTB0016. En ninguno de los casos parece además existir correlación con los niveles de NO producidos. En conclusión, el fracaso terapéutico evidenciado podría deberse a una condición del paciente (por determinar); debido a ello la política de tratamiento farmacológico de este paciente debería tomar en cuenta esta condición.

Finalmente, y para el aislado VE96ZC, los resultados sugieren que estamos en presencia de un aislado de *L. mexicana* con fenotipo quimio-resistente a Sb^V, puesto que los macrófagos infectados con este aislado fueron menos susceptibles a Sb^V y mantuvieron su

susceptibilidad a PEN, incluso mayor que la de su especie homóloga Bel 21. La acción leishmanicida no parece depender de los niveles de NO producidos.

En estudios anteriores se ha demostrado que en VE98MR (cuya cepa de referencia contraparte es *L. amazonensis* LTB0016) y VE96ZC (cuya cepa de referencia es *L. mexicana* BEL 21) el potencial de membrana plasmática de los promastigotes es similar al de sus cepas referenciales. En el caso de VE2000MM el potencial de membrana está despolarizado comparado con el de su cepa de referencia LTB0016. Un potencial de membrana despolarizado implica una menor fuerza electromotriz para la incorporación de nutrientes y el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, en todos estos aislados de pacientes el consumo de glucosa, como principal fuente de energía, se mantiene en niveles adecuados y similares (VE2000MM) a los evidenciados en sus cepas de referencia o significativamente mayores (VE98MR y VE96ZC) con respecto a ellas.⁽¹¹⁾

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que los monocitos aislados y purificados de sangre periférica permiten construir curvas de susceptibilidad al ser infectados con especies de referencia o aislados de *Leishmania* de pacientes con fracaso terapéutico a Sb^V y determinar las respectivas IC₅₀ a fin de establecer las comparaciones pertinentes.

Adicionalmente, los resultados sugieren que el efecto leishmanicida evidenciado no se correlaciona con aumentos de la producción de óxido nítrico. Finalmente, los resultados confirman resultados previos⁽¹⁰⁾ e indican que dos de los aislados estudiados, VE98MR y VE96ZC, parecen expresar fenotipo resistente a las drogas y concentraciones probadas mientras que en el aislado VE2000MM el fracaso terapéutico podría ser resultado de una situación del paciente que sería recomendable explorar.

Estos resultados constituyen una prueba de concepto que enfatiza la importancia de diferenciar el comportamiento de cada aislado de pacientes de *Leishmania* y resalta el valor potencial del método para el tratamiento individual de los pacientes con fracaso terapéutico.⁽²²⁾

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV, a la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina-UCV y a la Fundación Alejandro de Humboldt, Alemania.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Leishmaniasis. [citado el 12 de marzo de 2018]. [cerca de dos capturas de pantalla]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
2. 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. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.
3. Sesenta Asamblea Mundial de la Salud [Internet]. Control de la Leishmaniasis [citado el 12 de marzo de 2018]. Resolución N° A60/10. 2007: 1-2. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Esp.pdf
4. Ministerio del Poder Popular para la Salud [Internet]. Boletín epidemiológico semana 52. 25 al 31 de diciembre de 2016. [citado el 12 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.scribd.com/document/347856274/Boletin-Epidemiologico-el-Ministerio-del-Poder-Popular-para-la-Salud>
5. De Lima H, Borges R, Escobar J, Convit J [Internet]. Leishmaniasis Cutánea Americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. [citado el 12 de marzo de 2018]. *Bol Malariol Sal Amb*. 51:(2). Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/bmsa/v50n2/art12.pdf>
6. Scorza JV [Internet]. Ulamina: nombre propio para una medicina contra la Leishmaniasis. [citado el 12 de marzo de 2018]. SABER-ULA 2008.2(3). Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/24974>
7. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(2):309-22.
8. World Health Organization [Internet]. Effectiveness of meglumine antimoniate against *L. tropica* in a recently emerged focus of cutaneous leishmaniasis in Birjand, eastern Islamic Republic of Iran. [citado el 12 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/255104>
9. Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A, Díaz E, Romero A, Machuca C [Internet]. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. [citado el 12 de marzo de 2018]. *Vitae*. 2008, 33(22); 11. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=39&n=1165&m=6&e=1220>
10. Padrón-Nieves M, Diaz E, Machuca C, Rodríguez N, Cotrim P, Ponte-Sucre A. Correlation between glucose uptake and membrane potential in *Leishmania* parasites isolated from DCL-patients with therapeutic failure: A proof of concept. *Parasitology Research*. 2014; 113(6):2121-8.
11. Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A. Marcadores de resistencia en *Leishmania*: Susceptibilidad *in vitro* a drogas leishmanicidas vs. retención de calceína en aislados de pacientes venezolanos con Leishmaniasis Cutánea Difusa. *AVFT*. 2015; 34: 29-33.
12. Rodríguez Noris, comunicación personal.
13. Pérez, C. Obtención de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica. *Rev Sab ULA*. 2007; 1(1):13-8.
14. Declaración de Helsinki de la Asociación Mundial de Médicos [Internet]. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2013; 2. [citado el 12 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.iaes.aragon.es/econocimiento/documentos/ceica/2013-declaracion-helsinki-brasil.pdf>
15. Alcázar, Wilmer. Comunicación personal.
16. Ponte-Sucre A, Mendoza-León A, Moll H. Experimental leishmaniasis: synergistic effect of ion channel blockers and interferon-gamma on the clearance of *Leishmania* major by macrophages. *Parasitol Res*. 2001;87(1):27-31.
17. Promega. Technical Bulletin: Griess Reagent System. USA; 2009. (Serie de informes técnicos; G2930).
18. Ponte-Sucre, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetop Biol Dis*. 2003; 28:2-14.
19. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1):111-26.
20. Carter KC, Hutchison S, Boiella A, Murray HW, Sundar S, Mullen AB [Internet]. Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania* donovani correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. [citado el 12 de marzo de 2018]. *Parasitol*. 2005;131:747-57. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336728?dopt=Abstract>
21. Nowruz D, Ehsan Shojaeefar E, Parvin P, Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J*. 2013;15(3): 218-23.
22. Maes L, Da Luz R, Cos P, Yardley V. Classical Versus Novel Treatment Regimens. In: Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M, editors. *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Berlin: Ed. Springer; 2012. p. 301-19.