



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**El uso de la nanomedicina en el tratamiento de las enfermedades olvidadas como la Leishmaniasis.**

**The use of nanomedicine in the treatment of neglected diseases such as Leishmaniasis.**

**Autora: Aroa Griñán Belda**

**Directora: Mónica López Fanarraga**  
**Co-directora: Lourdes Valdivia Fernández**

**Santander, Junio 2018**

## Índice

RESÚMEN: .....	3
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
1.1 Leishmaniasis: Etiología y características.....	4
1.1.1 Ciclo biológico y transmisión.....	4
1.1.2 Epidemiología de la enfermedad .....	7
1.1.3 Diagnóstico y manifestaciones clínicas: .....	10
2. TRATAMIENTO FRENTE A LEISHMANIA. MOLÉCULAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.....	12
Antimonio pentavalente .....	13
Amfotericina B (AmpB).....	14
Paromomicina .....	16
Miltefosina .....	17
Pentamidina .....	18
3. NANOMEDICINA EN LEISHMANIA. VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS.....	21
3.1 Tipos de sistemas de nanoencapsulación empleados en la leishmaniasis .....	22
Nanoemulsiones.....	24
Cocleatos lipídicos .....	24
Nanopartículas lipídicas sólidas.....	24
Nanopartículas de polímeros .....	25
Polímeros de polisacáridos.....	25
Micelas poliméricas .....	25
Compuestos inorgánicos .....	26
3.2 Liposomas.....	27
4. LIPOSOMAS EN LEISHMANIASIS. PRESENTE Y FUTURO DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA....	29
4. DISCUSIÓN.....	33
5. CONCLUSIÓN .....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

## **RESÚMEN:**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que más de mil millones de personas en el mundo padecen las llamadas "enfermedades olvidadas". La leishmaniasis es una de estas enfermedades, causada por el protozoo *Leishmania*, que afecta alrededor de 12 millones de personas en todo el mundo. Los fármacos más utilizados en la práctica clínica son los antimoniales pentavalentes, pero presentan efectos secundarios graves, que incluyen cardiotoxicidad y hepatotoxicidad. Otros compuestos utilizados, como amfotericina B, pentamidina, paromomicina y miltefosina, son fármacos de segunda elección, pero también producen efectos secundarios que pueden poner en peligro la vida del paciente. Además de los efectos adversos, la vía de administración de estas sustancias suele ser la vía intravenosa, requiriendo la hospitalización de los pacientes. Todo esto reduce el cumplimiento del tratamiento y, en general, no dan una curación definitiva originando a su vez, otro inconveniente como es, el aumento de las resistencias a estos fármacos. El desarrollo de sistemas de vehiculización de fármacos basados en la nanotecnología es una vía prometedora en el futuro, ya que el uso de nanosistemas permite dirigir los fármacos a las células diana, en este caso las células del sistema fagocítico mononuclear, reduciendo su toxicidad. En este trabajo se expondrán los avances en el empleo de los nanosistemas, más concretamente en los liposomas, para mejorar los aspectos terapéuticos de los fármacos antileishmania existentes.

## **ABSTRACT:**

The World Health Organization estimates that more than one billion people in the world suffer from "Neglected diseases". Leishmaniasis is one of these diseases, caused by the protozoan *Leishmania*, affecting around 12 million people around the world. Pentavalent antimonials are used as first-line treatment in clinical practice, but they have serious side effects, including cardiotoxicity and hepatotoxicity. Other compounds used, such as amphotericin B, pentamidine, paromomycin and miltefosine, are second-line drugs in leishmaniasis, they also produce side effects that can endanger the patient's life. In addition, the route of administration of these drugs is usually intravenous, requiring the hospitalization of patients. This reduces the compliance of the treatment and, in general, these drugs do not give a definitive cure originating at the same time, another problem as the increase of the resistances to treatment. The development of drug delivery systems based on nanotechnology is a promising path in the future, because the use of nanosystems allows targeting the drugs to the target cells, in this case the cells of the mononuclear phagocytic system, reducing their toxicity. In this work the advances in the use of the nanosystems, more specifically in the liposomes, to improve the therapeutic aspects of the existing antileishmania drugs will be exposed.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Bajo el término de “enfermedades olvidadas” se definen a un grupo de 17 enfermedades que tienen dos características en común: afectan en su mayoría a países subdesarrollados y acaban con la vida de millones de personas en todo el mundo. Entre estas enfermedades cabe destacar el dengue, la rabia, la lepra (enfermedad de Hansen), la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), la leishmaniasis o las helmintiasis transmitidas por el suelo (gusanos intestinales) entre otras.

Estas enfermedades pueden ser patologías crónicas, de años de evolución que crean cierta discapacidad o dependencia a las personas que la padecen o pueden tratarse de patologías agudas que causan la muerte rápida del sujeto afectado. Se denominan “olvidadas” por estar fuera de los estudios realizados por la industria farmacéutica, ya que no son rentables para estas al no haber retorno económico a la inversión que requiere el desarrollo de sus tratamientos. Como consecuencia de esta desatención muchas de las muertes que se producen a causa de estas enfermedades podrían ser evitadas. En la actualidad se están realizando esfuerzos para mejorar las políticas de salud de los países afectados e intentar estimular el desarrollo de nuevas terapias dirigidas al tratamiento de estas enfermedades. Estas nuevas terapias, basadas en el uso de la nanotecnología, están demostrando un aumento en la eficacia y una disminución de la toxicidad de los tratamientos empleados en estas enfermedades olvidadas (1).

### 1.1 Leishmaniasis: Etiología y características

Leishmaniasis se le denomina a la enfermedad infecciosa de tipo parasitario causada por el protozoo del género *Leishmania*. Esta patología pertenece al grupo de enfermedades “olvidadas” y afecta predominantemente a los países en vías de desarrollo. Esta enfermedad tiene varias formas de presentación clínica como son la leishmaniasis visceral, cutánea o mucocutánea.

#### 1.1.1 Ciclo biológico y transmisión

A finales del siglo XIX varios investigadores identificaron el agente causal de la leishmaniasis, al que denominaron como *Leishmania*. La *Leishmania* es un parásito eucariótico unicelular de la familia *Trypanosomatidae*. Existen más de 20 especies de *Leishmania* y más de 90 especies de flebótomos transmisores de este parásito, aunque de todos ellos, los únicos vectores causantes de la enfermedad en humanos son las especies y subespecies de *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia, y África), y de *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (América). Es muy importante conocer la identidad de las especies del parásito en cada foco (*Tabla 1*), puesto que esto influye en la comprensión de la epidemiología, en el control de la enfermedad y en su posterior tratamiento.

Tabla 1. Especies de *Leishmania* causante de enfermedad en el ser humano, control de leishmaniasis, Organización Mundial de la Salud (OMS), 2010.

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <sup>a</sup> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifano</i> <sup>b</sup> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <sup>b</sup> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> <sup>b</sup>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo principal	Visceral	Dérmico	Dérmico	Mucoso

<sup>a</sup> Estatus de especie en debate.

<sup>b</sup> Posición taxonómica en debate.

Para que el protozoo *Leishmania* se mantenga en un determinado territorio, en el ecosistema de éste debe existir: una especie de flebótomo que actúa como vector, y una especie de vertebrado que actúa como huésped o reservorio. Para que los vectores proliferen se necesitan zonas húmedas y ricas en materia orgánica, además son dependientes de factores como la temperatura ambiental, ya que se sabe que la proliferación de estos insectos aumenta con las altas temperaturas (2).

El ciclo de vida del parásito *Leishmania* tiene dos formas morfológicamente distintas: promastigote y amastigotes. El promastigote es su forma flagelada y se encuentra en el intestino del flebótomo, las promastigotes metacíclicos son la fase infecciosa que favorece la transmisión al huésped. La otra forma parasitaria, el amastigote, presenta una forma esférica, no tiene flagelo y al contrario que el promastigote, este se encuentra en el interior de la célula huésped, los macrófagos y las células del sistema retículo endotelial (SRE). Los amastigotes se vuelven a transformar en los promastigotes flagelados al volver a ser ingeridos por los flebótomos continuando el ciclo de vida de dicho parásito.

Los promastigotes se encuentran en el vector y son transmitidos por el flebótomo al huésped, éstos son atacados por la respuesta inmune fagocítica y pasan dentro de las

células del sistema fagocítico mononuclear. Alrededor de los promastigotes se forma un fagosoma que se somete a un proceso de maduración y remodelación de membrana, formando un nuevo orgánulo, la vacuola parasitófora. Dentro de esta vacuola los promastigotes se diferencian a amastigotes, y se van multiplicando hasta romper esta vacuola. Los amastigotes intracelulares se puede observar mediante técnicas de tinción y se conocen como cuerpos de Leishman-Donovan.

En éstos cuerpos se puede ver el cinetoplasto, que es una estructura de ADN mitocondrial que se tiñe de forma distinta del núcleo (3). Una vez se rompe esta célula comienza la extensión de la enfermedad. Al llegar a la circulación los amastigotes tienen diferente tropismo pudiendo infectar a células superficiales o a células viscerales. Algunas especies como *Leishmania major* (*L. major*) solo causan enfermedades cutáneas, otras como *L. donovani* produce visceralización mientras que *L. infantum* puede causar enfermedad tanto cutánea como sistémica, esto se puede deber a diferencias genómicas adquiridas en la evolución de las especies *Leishmania*, que hace que algunas especies tengan más afinidad por los receptores específicos de superficie de los macrófagos que se encuentran en la piel y otras por lo que se encuentran en las vísceras (4).

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis dependen de la capacidad de respuesta inmune del huésped, tanto innata como adaptativa. Se ha demostrado que las células TCD4 helper-1 realizan un papel muy importante en el control de la infección mediante su interacción con las células presentadoras de antígenos que le expone los antígenos del protozoo. Esta interacción da como resultado la liberación de interferon gamma, que activa a los macrófagos que producen óxido nítrico a su vez provocando la muerte intracelular de los amastigotes de *Leishmania*. Las condiciones inmunosupresoras adquiridas pueden modular las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis (3).

A continuación se muestra un diagrama (*Figura 1*) que representa el ciclo de vida del protozoo *Leishmania* y sus diferentes formas parasitarias:

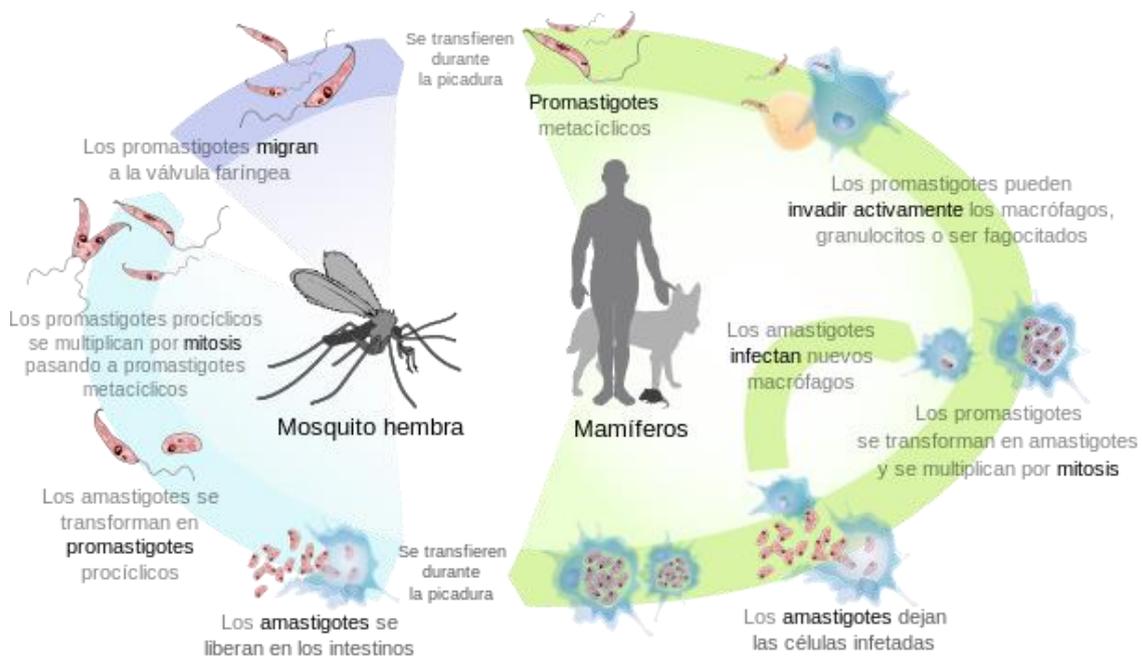


Fig. 1: Ciclo biológico del parásito *Leishmania*, imagen de Mariana Ruiz Villarreal, via Wikimedia Commons.

### 1.1.2 Epidemiología de la enfermedad

En la actualidad se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraer leishmaniasis, se estima que cada año se producen entre 700.000 y un millón de nuevos casos y entre 20.000 y 30.000 defunciones. En la última década se están logrando grandes avances en tratamiento, diagnóstico y prevención de esta enfermedad, pese a ello tanto la mortalidad como la morbilidad por leishmaniasis sigue aumentando cada año (2).

En términos de años de vida ajustados por discapacidad (AVISA) la leishmaniasis es la tercera causa más común de morbilidad después de la malaria y la esquistosomiasis, siendo los niños menores de 15 años los que sufren la mayor parte de la carga de esta enfermedad. Los verdaderos datos sobre la morbilidad y mortalidad de la leishmaniasis son desconocidos debido a la falta de sistemas de vigilancia epidemiológica así como de métodos diagnósticos que permitan crear informes con los números de la incidencia real, por lo que los datos disponibles están basados en estimaciones (2).

La epidemiología de la leishmaniasis depende de muchos factores como las características de la especie del parásito, las características ecológicas de los lugares de transmisión, la exposición actual y pasada de la población humana al parásito, así como el comportamiento humano, el cual resulta muy variable. El modo de infección más común es la transmisión vectorial, aunque existen otras formas de transmisión como: parenteral, congénita, sexual, ocupacional e interpersonal. La transmisión de leishmaniasis por transfusión es un gran problema en áreas donde la enfermedad es endémica (2).

Se calcula que el número de casos de leishmaniasis visceral puede alcanzar hasta los 400.000 casos por año, la mayoría de éstos ocurren en la India, Bangladesh, Sudán, Etiopía y Brasil. En cuanto a la leishmaniasis cutánea se estima que puede llegar hasta a los 1.200.000 de casos, principalmente en el litoral mediterráneo, América y Asia occidental, dónde los países más afectados son Brasil, Siria y Afganistán. A pesar de que actualmente más del 90% de los casos de leishmaniasis se encuentran en los países nombrados, estudios recientes demuestran un rápido aumento de infecciones por *Leishmania* en todo el mundo debido al aumento de temperaturas y al cambio climático, que puede cambiar la distribución mundial de esta enfermedad y que afecte a continentes no expuestos a esta enfermedad, con anterioridad, como Europa (3,4).

También es importante destacar que la leishmaniasis visceral ha reaparecido como una infección oportunista asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la relación entre ambas enfermedades tiene especial importancia en los subdesarrollados ya que son infradiagnosticadas y se refuerzan mutuamente de forma perjudicial. Los datos de la OMS (2012) demuestran que la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) concomitante aumenta el riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral entre 100 y 2.320 veces. La leishmaniasis a su vez acelera la replicación del VIH y la progresión al SIDA y disminuye la respuesta al tratamiento antirretroviral (1,3). El pronóstico de los pacientes coinfectados se caracteriza por una alta tasa de mortalidad durante el primer episodio, una mayor toxicidad de los fármacos antileishmaniásicos, una mala respuesta clínica a largo plazo y mayor tasa de recidivas (2).

El grupo de edad afectado varía en función de la especie del parásito y de la exposición de la población. En focos endémicos donde el parásito transmisor de la enfermedad es *L. infantum*, la edad media de los pacientes con leishmaniasis es generalmente menor de 5 años, en cambio, en los focos endémicos en los que predomina la especie de *L. donovani* la edad media está comprendida entre los 13 a 23 años. La razón entre los sexos no se puede determinar con exactitud ya que existen disparidades en el acceso a la atención sanitaria (2).

### **Distribución geográfica de Leishmania:**

En la cuenca del Mediterráneo, la principal forma de la enfermedad es la leishmaniasis visceral, causada por *L. infantum*. Esta zoonosis se produce en zonas rurales, en pueblos de regiones montañosas y en algunas zonas periurbanas, generalmente esta especie de *Leishmania* vive en portadores asintomáticos como perros y animales domésticos. También se encuentran focos de transmisión zoonótica de *L. infantum* en países del continente asiático como Pakistán, Irán, Afganistán y Asia Central (2).

En Asia sudoriental la leishmaniasis visceral es la forma más común, en los focos de Bangladesh, India y Nepal, la enfermedad se produce en pueblos agrícolas, considerándose que el principal foco de *Leishmania* en esta región es el ser humano (2). En África Oriental la leishmaniasis se transmite en dos entornos ecológicos distintos: las regiones de la sabana seca de Acacia-Balanites en el norte y las zonas de sabana y bosque en el sur. El principal reservorio de *Leishmania* en esta región es el ser humano. Recientemente se ha registrado un aumento del número de casos de

leishmaniasis cutánea en África Occidental. En Uagadugú (Burkina Faso) se produjo un brote urbano en el que también se describieron coinfecciones por VIH (2).

La epidemiología de la leishmaniasis en América es compleja y presenta variaciones específicas. Ha habido una expansión del ámbito geográfico y de los factores de riesgo de transmisión, aunque la exposición ocupacional sigue siendo importante (relacionada con actividades como la recolección del caucho, operaciones militares, etc.), la extensa deforestación ha producido un aumento rápido de los casos. Los países más afectados son Brasil, Bolivia y México (2).

Los principales factores de riesgo para la transmisión de esta enfermedad son las condiciones socioeconómicas, siendo los países más pobres los que tienen más riesgo de leishmaniasis, la malnutrición, la movilidad de la población, ya que las epidemias de leishmaniasis se asocian a migración y desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas de transmisión activa de la enfermedad, así como a los cambios ambientales (2). La leishmaniasis es una enfermedad sensible al clima y ocupa un “espacio climático” característico que se ve muy afectado por las lluvias, la temperatura atmosférica y la humedad (Figura 2). Se espera que el calentamiento global a largo plazo afecte la epidemiología de la enfermedad, ampliando la extensión de esta y de los flebotomos vectores a regiones que en la actualidad están libres de ambos, como es el caso de Europa central (2).

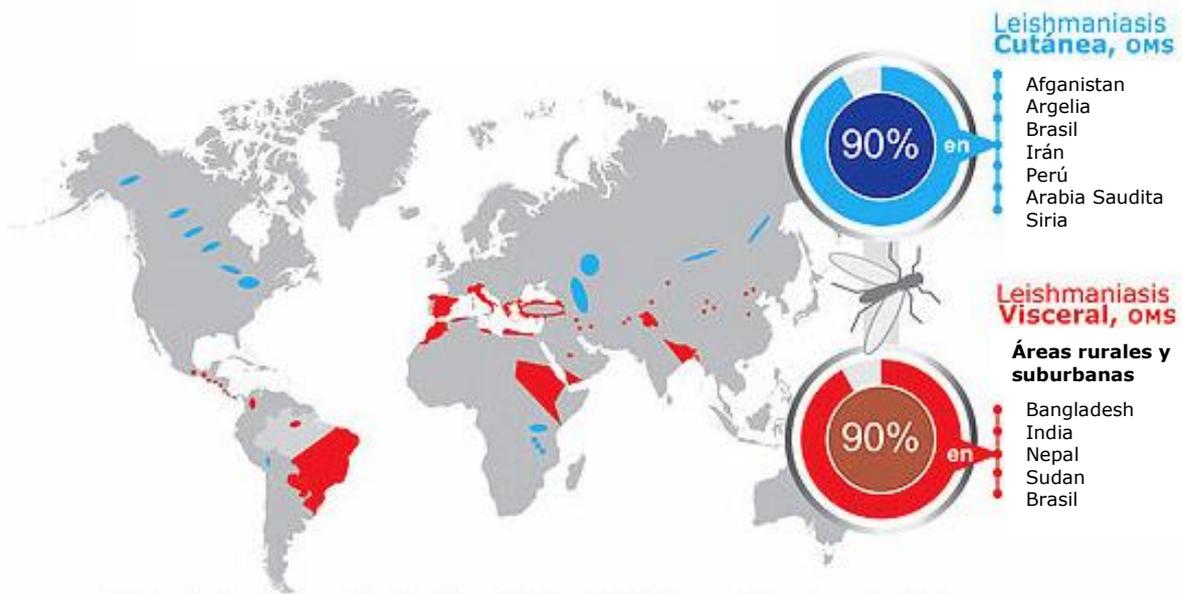


Fig. 2: Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea y visceral, la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015.

### 1.1.3 Diagnóstico y manifestaciones clínicas:

El diagnóstico de la leishmaniasis se basa en criterios clínicos y epidemiológicos que con una adecuada anamnesis y un examen físico minucioso permite establecer un plan diagnóstico, terapéutico y de seguimiento en los pacientes con sospecha de leishmaniasis.

Las técnicas diagnósticas creadas, originalmente fundamentadas en la identificación de los amastigotes de *Leishmania* en muestras esplénicas y lesiones cutáneas, se siguen utilizando en la actualidad. Más tarde, en los años noventa, se desarrolló la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) del cinetoplasto mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) lo que aumentó la sensibilidad de estas pruebas. Otras formas de diagnóstico menos utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta, la inmunoadsorción enzimática (ELISA), la aglutinación directa de los promastigotes y la detección inmunocromatográfica con tiras reactivas del antígeno K39 recombinante clonado.

Ante una leishmaniasis visceral tenemos que hacer un diagnóstico diferencial con enfermedades como la leucemia o la linfocitosis, con otras infecciones como la del virus Epstein Barr o el citomegalovirus, tifus y brucelosis si ha viajado a países endémicos, o tuberculosis y toxoplasmosis si se trata de un paciente VIH. La presencia de pancitopenia nos lleva a realizar un aspirado de médula ósea para descartar cáncer hematológico, en el frotis de médula ósea se pueden ver amastigotes que son el diagnóstico definitivo de la enfermedad, si da negativo se debe hacer una PCR de la muestra de médula ósea. Las pruebas serológicas pueden ser útiles, pero no distinguen entre infección actual y pasada. Los métodos de diagnóstico basados en la detección de antígenos de *Leishmania* en la orina están en desarrollo, permitiendo un diagnóstico rápido y en consecuencia, el inicio de tratamientos potencialmente vitales (3).

En el caso de la leishmaniasis cutánea el diagnóstico diferencial se hace con picaduras de artrópodos infectadas, impétigo, infecciones por dermatofitos y micobacterias, esporotricosis y algunos tumores. La leishmaniasis cutánea se puede diagnosticar clínicamente, pero en caso de duda, se debe hacer un frotis o biopsia para visualizar los amastigotes al microscopio. La PCR puede ser diagnóstica en situaciones en las que la carga parasitaria es baja. Los anticuerpos parasitarios muestran infección, pero no distinguen entre exposición pasada o enfermedad activa (3).

Las formas de manifestación clínica de la leishmaniasis pueden variar desde una enfermedad asintomática a una enfermedad localizada en la piel, diseminada a mucosas orales y respiratorias o a través del SRE. Estas presentaciones clínicas varían de acuerdo con: la especie de *Leishmania*, la respuesta inmune del huésped y el estado evolutivo de la enfermedad. El período de incubación es variable y las manifestaciones pueden aparecer desde 10 días hasta más de un año después de la exposición. Las formas clínicas de la leishmaniasis son:

- Leishmaniasis cutánea: Las manifestaciones cutáneas varían según la especie de *Leishmania* que produzca la infección. Se caracterizan por ser lesiones

cerradas como pápulas, nódulos y placas que pueden ser desde formas de aspecto verrugoso hasta formas ulceradas. Su localización es variable, aunque suelen expresarse en las partes expuestas del cuerpo como cara, cuello y extremidades (*Figura 3*). La leishmaniasis cutánea es generalmente una enfermedad autolimitada, la curación ocurre en varios meses o años, puede dejar una cicatriz y alteraciones permanentes de la pigmentación de la piel, aunque también puede ser crónica y progresiva en una proporción de casos, dependiendo del grado de activación de la respuesta inmune. En la leishmaniasis cutánea difusa no existe respuesta del sistema inmune y hay una intensa infiltración dérmica de macrófagos con vacuolas cargadas de parásitos (2,3).

- Leishmaniasis mucosa: es una forma de leishmaniasis que ocurre como resultado de la diseminación linfohematógena del parásito a partir de una lesión cutánea persistente en el tiempo. Es causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. amazonensis*. Existe una forma deformante de la enfermedad que puede causar mortalidad y puede presentarse de manera simultánea con las lesiones cutáneas. Afecta a las mucosas de las vías aéreas superiores nariz, faringe, boca, laringe, tráquea. En el 90% de los casos la enfermedad evoluciona formando una cicatriz característica que es hipopigmentada, atrófica, sin anexos y con borde hiperpigmentado, en algunas ocasiones con presencia de líneas radiadas centrípetas (2,3).
- Leishmaniasis visceral: A menudo conocida como kala-azar, es una enfermedad de progresión lenta en el SER. Esta forma es causada por las especies *L. donovani* y *L. infantum*. Su importancia radica en que una vez iniciado su cuadro clínico, en ausencia de tratamiento, puede ser mortal. El parásito entra por la piel y por mecanismos que son desconocidos migra y crea una hiperplasia en el SER en hígado, médula ósea y bazo, alterando la arquitectura esplénica, y produciendo reacciones granulomatosas autolimitadas a nivel hepático, otros órganos también afectados son la mucosa del intestino delgado, los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides (*Figura 4*). En el bazo y los órganos linfoides puede generarse una atrofia de las zonas paracorticales (pulpa blanca), por lo que la vida de los leucocitos y eritrocitos es menor, lo que genera una granulopenia y una anemia en el paciente. La función hepática puede estar bien o alterada, si está alterada disminuye la producción de protrombina, que junto con la trombopenia crea un estado de hipocoagulabilidad pudiendo producir hemorragias mucosas graves. También se puede producir una hipoalbuminemia que se asocia a edema y signos de malnutrición. La fiebre tiene comienzo gradual o repentino, es persistente e irregular (2,3). La enfermedad al afectar directamente a las células del sistema mononuclear fagocítico causa alteraciones en la inmunidad del paciente, por la una acumulación de células T disfuncionales, lo que origina una respuesta inmune ineficaz (5).



Fig. 3: Lesiones psoriasiformes en paciente con leishmaniasis cutánea.

<https://www.elrincondelamedicinainterna.com/2016/07/leishmaniasis-cutanea-a-proposito-de-dos.html>



Fig. 4: Hepatoesplenomegalia en paciente con leishmaniasis visceral.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462007000100008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462007000100008)

## 2. TRATAMIENTO FRENTE A LEISHMANIA. MOLÉCULAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

El parásito intracelular *Leishmania* se trata de un microorganismo eucariota, por lo que sus tratamientos no son antimicrobianos al uso, son quimioterapia, por este motivo los fármacos empleados presentan efectos secundarios y toxicidad en el paciente al interferir con sistemas de metabolismo eucariota. La situación actual en el tratamiento de la leishmaniasis es mucho más prometedora que en las últimas décadas ya que se están investigando posibles alternativas empleando nuevas formulaciones de fármacos, así como combinaciones de los ya comercializados.

Los primeros fármacos empleados en el tratamiento de las leishmaniasis cutáneas y mucocutáneas fueron los antimoniales trivalentes introducidos por Vianna en Brasil, en 1912. En 1922 Brahmachari introdujo la urea estibamina, el primer antimonial pentavalente, mucho más seguro. Estos han sido los fármacos estándar durante 70 años y continúan siendo utilizados como fármacos de primera línea en varias partes del mundo. Pero este tratamiento empezó a desarrollar resistencias, por lo que se necesitaban compuestos más eficaces y con menos toxicidad. En esta búsqueda fue cuando se registró por vez primera para la leishmaniasis visceral la amfotericina B liposómica en 1996, la miltefosina en 2004, y la paromomicina en 2006 (2). Todos ellos presentan muchos inconvenientes ya que ninguno de ellos ha sido creado con el objetivo de tratar esta enfermedad, si no que han sido desarrollados para ser aplicados en enfermedades producidas por otros agentes infecciosos o para tratar el cáncer, y a pesar de ello se han convertido en tratamiento para la leishmaniasis debido a la falta de medicación específica para ella. Algunos de estos inconvenientes son la presencia

de muchos efectos adversos, la ineficacia contra el agente etiológico y el aumento de las resistencias (4).

### **Antimonio pentavalente**

La primera vez que se utilizó el antimonio como tratamiento de la leishmaniasis fue a principios de 1900 tras descubrirse que el tartrato de potasio antimonio (Sb) (III) era eficaz en el tratamiento de la leishmaniasis mucocutánea. Después de este hallazgo se utilizó en la forma clínica de leishmaniasis visceral dónde también dio resultados favorables. Sin embargo, estos fármacos causaban una gran toxicidad en los pacientes que los tomaban por lo que su uso se hizo muy limitado. Varias décadas después surgió el antimonio pentavalente (V), una forma más segura ya que reducía mucho su toxicidad. En la actualidad, hay dos tipos de complejos de antimonio pentavalente (V) comercializados: Glucantime® (antimoniato de meglumina) y Pentostam® (estibogluconato de sodio) (*Figura 5*), en la mayoría de las partes del mundo, más del 90% de los pacientes con leishmaniasis, no tratados previamente, responden a los antimoniales pentavalentes siendo el tratamiento de primera línea recomendado (6).

Existen dos hipótesis posibles sobre sus mecanismos de acción. La primera se basa en la capacidad del parásito o de las células infectadas por él para bioconvertir las moléculas de Sb (V) en Sb (III), que sería un agente activo. La segunda habla de que el Sb (V) es el agente activo. Sb (III) se une fuertemente a biomoléculas que contienen restos sulfhidrilo y forma pares conjugados con tripanotona, un factor de virulencia que ayuda al parásito a resistir el estrés oxidativo del entorno de la célula infectada. La conjugación inactiva la actividad antioxidante de la tripanotona. Otra característica de la Sb (III) es la inhibición de la tripanodiona reductasa, una enzima que recicla la tripanodiona oxidada para mantener la tripanión en un estado reductor. Sb (V) entra en las células huésped infectadas y es capaz de actuar de forma selectiva contra la topoisomerasa del promastigote en lugar de contra la del monocito, también se puede unir a ribonucleósidos en un entorno similar al de los lisosomas. Por lo que se demostró que el efecto que ejercía tanto en promastigotes como en amastigotes era una reducción de la adenosín trifosfato (ATP) y guanósín trifosfato (GTP) en relación con la adenosín difosfato (ADP) y la guanósín difosfato (GDP) (6).

Desafortunadamente, estos fármacos que han utilizado en todo el mundo para el tratamiento de la leishmaniasis durante más de seis décadas, han desarrollado resistencias, lo que es una barrera muy importante para que el tratamiento sea exitoso. El mecanismo de resistencia es multifactorial y se debe principalmente a una disminución de la absorción de Sb (III), a un aumento del nivel de tripanodiona y una mayor expresión de la bomba metaloidetiol, aunque existen muchos más mecanismos de resistencia (4).

La variación en la respuesta clínica en las distintas formas de leishmaniasis ante los antimonios pentavalentes se puede deber a la diferencia intrínseca en la sensibilidad de las especies a estos fármacos. En algunos estudios se ha demostrado que el estibogluconato de sodio produce una tasa de curación significativamente mayor en

pacientes con lesiones de *L. braziliensis* (96%) que aquellos con Lesiones de *L. mexicana* (57%) (7).

En cuanto a la posología, hasta finales de la década de 1970, una pequeña dosis diaria (10 mg/kg, hasta 600 mg máximo) de corta duración (6 a 10 días) se consideró adecuada, hasta que se vio que aproximadamente en un 30% de los pacientes el tratamiento no era efectivo, por lo que se aumentó a dos ciclos de 10 días cada uno. A los pocos años de este cambio se volvió a notificar una disminución de la eficacia del tratamiento por lo que se recomendó aumentar la dosis a 20 mg/kg/día hasta un máximo de 850 mg durante 20 días y prolongarlo hasta 40 días si fuera necesario. A pesar de estos aumentos la tasa de curación iba disminuyendo debido a las resistencias a estos fármacos. Aunque se ha comprobado que subiendo la dosis de fármaco podría superar la falta de respuesta, incluso las dosis actuales producen mucha toxicidad, por lo que un mayor aumento en la cantidad de fármaco podría poner en grave peligro la seguridad de los pacientes (7).

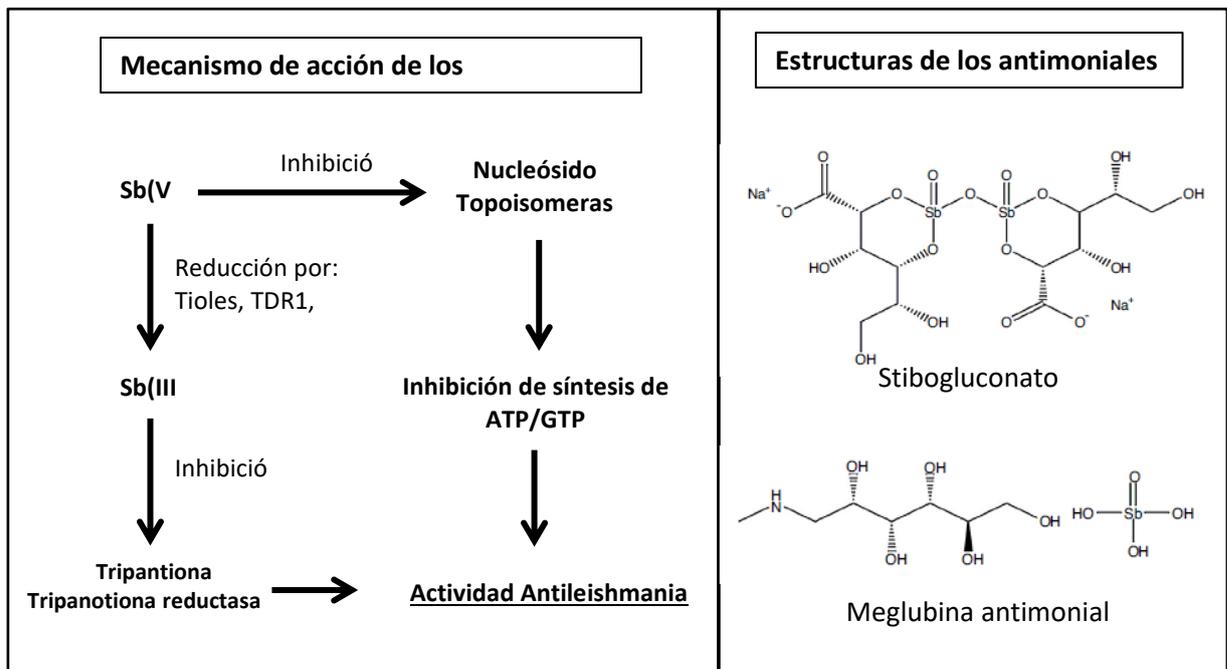


Fig. 5: Esquemas del mecanismo de acción y la estructura de los fármacos antimoniales (6).

### Amfotericina B (AmpB)

La AmpB es un antibiótico natural aislado por primera vez en 1955 del *Streptomyces noclosus* en Venezuela, es un metabolito de polieno con actividades antifúngicas y antiparasitarias. Actualmente, la AmpB se usa para tratar infecciones fúngicas sistémicas de *Candida Albicans* y *Aspergillus*, siendo muy efectivo en pacientes inmunodeficientes. Actualmente su uso se está limitando debido a los graves efectos secundarios que produce como la nefrotoxicidad y la hematotoxicidad. Por ello se han

investigado diversas formulaciones para intentar reducir la toxicidad de este fármaco (6).

La estructura química de la AmpB (*Figura 6*) comprende dos componentes principales del núcleo estructural: un anillo de macrolactona y una micosamina glicosilada en la posición del carbono 19 (C19). El anillo de macrolactona, presenta siete dobles enlaces que sirven de cadena principal rígida, mientras que los grupos hidroxilo hidrófilos se encuentran en el otro lado del anillo. El grupo de micosamina contiene un grupo amina en la posición C3' y, junto con un ácido carboxílico en la posición C16 en el anillo de lactona, da lugar a la propiedad anfótera del compuesto. La selectividad de este fármaco se debe a la mayor afinidad de la AmpB por el ergosterol, el esteroles predominante en el hongo o el parásito, sobre el colesterol, el esteroles predominante en las células huésped de los mamíferos. En general, AmpB se une al ergosterol a través de una interacción hidrofóbica entre ergosterol y el estiramiento de polieno en el anillo macrolídico de AmpB. EL mecanismo de acción más aceptado de la AmpB es la formación de poros en la membrana del parásito (*Figura 7*). Los poros permiten que los iones, el agua y las moléculas de glucosa entren a través de la bicapa lipídica, causando la muerte del microorganismo (6,7).

La AmpB se ha utilizado como tratamiento de segunda línea para la leishmaniasis desde principios de la década de 1960. Actualmente, para reducir los efectos secundarios graves, se han desarrollado diferentes formulaciones que están disponibles en el mercado con los nombres comerciales Abelcet®, Amphocil®, Amphotec® (complejos lipídicos) Ampholip® y AmBisome® (liposomas), éste último se administra por vía intravenosa para tratar la leishmaniasis visceral y tiene una tasa de curación mayor del 90% en una terapia de un solo ciclo. Aunque actualmente hay negociaciones abiertas entre la OMS y el productor de este fármaco, ya que esta formulación sigue teniendo un alto costo, factor limitante para su utilización en muchos países (6).

Su formulación liposomal, en la que el fármaco se intercala en una membrana lipídica que consiste en fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y diestearoilfosfatidilglicerol, es la más utilizada contra la leishmaniasis visceral. Dado en una dosis de 1-4 mg/kg/día, hasta una dosis total de 15-24 mg/kg. El principal beneficio de AmBisome® es que disminuye su toxicidad para las células de mamífero, permitiendo administrar dosis más altas y su principal inconveniente es su alto coste (4).

Pueden esperarse diferencias en la sensibilidad de las especies debido a la variación en el tipo y la cantidad de esteroides en membranas de diferentes especies. Aunque la mayor eficacia de la AmpB liposomal contra *L. donovani* frente a *L. infantum* probablemente se relacione más con la carga de parásitos y el estado inmune del hospedador que con la sensibilidad de la especie. Las resistencias a este fármaco están muy estudiadas en hongos, pero no existen demasiados estudios sobre resistencia en Leishmania. (7) Sin embargo, un estudio ha demostrado que está relacionada con el aumento de la fluidez de la membrana celular que ocurre cuando el ergosterol se modifica a su precursor colest-5,7,24-trien-3β-ol, esta modificación reduce la unión de AmpB a las membranas modificadas con esteroles (4).

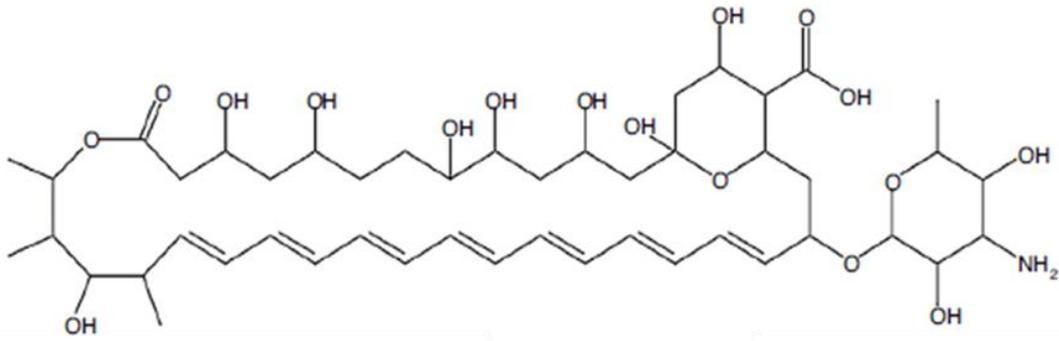


Fig. 6: Estructura de la amfotericina B (6).

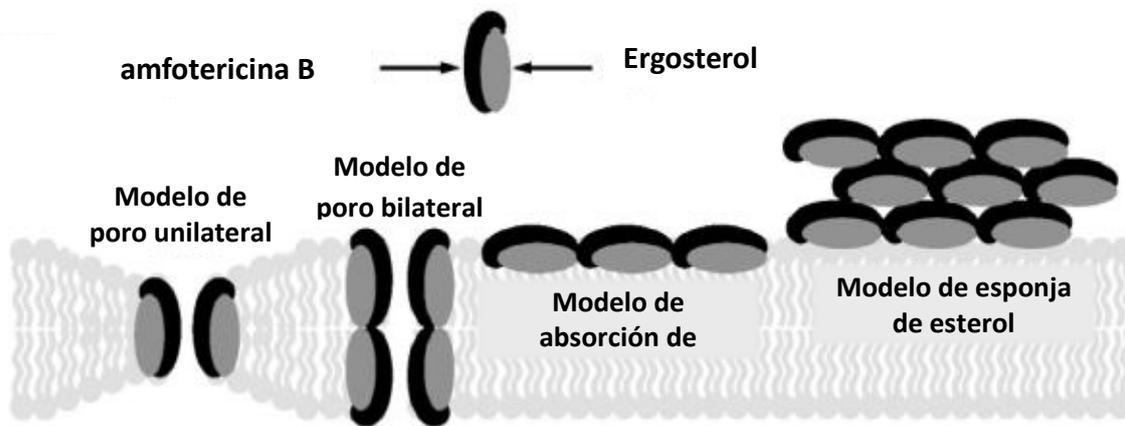


Fig. 7: Esquema mecanismo de acción de la amfotericina B (6).

### Paromomicina

La paromomicina (Figura 8), un antibiótico aminoglucósido aislado de *Streptomyces krestomuceticus*, presenta acción bactericida contra bacterias grampositivas y gramnegativas y se usa para tratar infecciones intestinales como la amebiasis y la

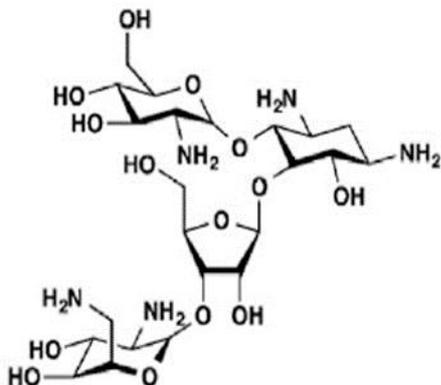


Fig. 8: Estructura de paromomicina (6).

criptosporidiosis. Su actividad como fármaco antileishmanial fue descubierta por primera vez en la década de 1960, con una alta tasa de curación. En cuanto a su administración la paromomicina tiene una baja absorción por vía oral, por lo que se tiene que administrar por vía parenteral, aunque también se ha empleado paromomicina por vía tópica para tratar la leishmaniasis cutánea (6).

El mecanismo de acción de la paromomicina en su actividad antileishmanial no se conoce con demasiada precisión, pero se ha

propuesto que puede ser debida a la síntesis de proteínas. Otros mecanismos posibles que han sido propuestos son: la alteración de la fluidez de la membrana y los efectos sobre el potencial de membrana mitocondrial. Este fármaco, como el resto de los antibióticos aminoglucósidos, actúa en el complejo ribosomal, que es el que se encarga de traducir la información genética de ARNm a proteína. Este complejo está compuesto por una subunidad pequeña 30S, que es la encargada de la decodificación del ARNm, y una subunidad grande 50S, que contiene el sitio catalítico. La subunidad 30S está formada por ARNr 16S y la proteína ribosómica S21, la paromomicina se une directamente al ARN en éste lugar, estabilizando el complejo de síntesis de la proteína ribosomal y causando una lectura errónea de los codones en el ARNm, inhibiéndose finalmente la síntesis de proteínas (*Figura 11*) (6).

El uso de la paromomicina ha sido limitado en el tratamiento de la leishmaniasis visceral, por lo que no se han encontrado resistencias de esta forma de la enfermedad al fármaco. Sin embargo, se ha usado más extensamente para el tratamiento de la enfermedad cutánea, donde hay estudios que sugieren posibles resistencias a la paromomicina. Aunque la resistencia de las bacterias a los aminoglucósidos se conoce muy bien, la resistencia de *Leishmania* no está descrita, por lo que se cree que están implicados en ella los ribosomas mitocondriales, la inducción de la disfunción respiratoria y la despolarización de la membrana mitocondrial (7).

### **Miltefosina**

La miltefosina (*Figura 9*) es un fármaco desarrollado en la década de 1980 que pertenece a la familia de los fármacos de alquilfosfocolina, que se crearon como tratamiento de cánceres de mama, piel y tumores sólidos. En este período se identificó en ratones infectados con *Leishmania* que este fármaco tenía actividad antileishmanial, debido a su alta biodisponibilidad vía oral comparado con los tratamientos estándares que existían. Este fármaco se desarrolló gracias a la asociación entre la OMS, el gobierno de la India y la actual farmacéutica Zentaris GmbH. En 2002, miltefosina se convirtió en el primer tratamiento oral para la leishmaniasis visceral. En modelos animales este fármaco mostró toxicidad teratogénica, por lo que su uso está limitado en pacientes embarazadas (6).

El nombre químico de miltefosina es hexadecil 2-(trimetil-azaniumil) etilfosfato, un éster de fosfocolina con una cadena alquílica de 16 carbonos, también conocida como hexadecilfosfocolina. Otros compuestos estructuralmente similares como edelfosina, ilmofosina, y perifosina poseen también actividad antileishmanial. En un estudio se observó que la miltefosina va dirigida a la vía de supervivencia de fosfoinositol 3quinasa-Akt / PKB asociada a la apoptosis lo que le da su actividad anticancerígena. En cambio su actividad antiparasitaria se dirige a la acción sobre el metabolismo del fosfolípido del éter, la biosíntesis del anclaje del GPI y la transducción de la señal, por lo que los promastigotes de *L. Donovanii* que se observaron resistentes a miltefosina mostraron una composición alterada de los lípidos de membrana, en la que el contenido de cadenas de alquilo fosfolípido era menor que el de la *Leishmania* de tipo salvaje, ya que *L. Donovanii* tenía una disminución del contenido de fosfatidilcolina y un

aumento en el contenido de fosfatidiletanolamina. En cambio, en otro estudio se vio que la muerte del parásito *Leishmania* en animales tratados con miltefosina seguía la vía de la apoptosis celular de las células cancerígenas. Se encontró que la miltefosina afecta la función mitocondrial al despolarizar el potencial de membrana e inhibir a la citocromo c oxidasa, lo que puede estar relacionado con la apoptosis de *Leishmania* (Figura 11) (6). La eficacia del tratamiento con miltefosina depende mucho de la especie de *Leishmania*, ya que en un estudio se observó que en Colombia, donde *L. panamensis* es común, la tasa de curación fue del 91%, mientras que en Guatemala, donde *L. braziliensis* y *L. mexicana* son comunes, la tasa de curación fue del 53% (7).

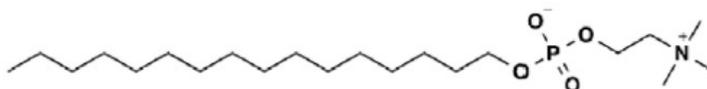


Fig. 9: Estructura química miltefosina (6).

### Pentamidina

La pentamidina como fármaco antileishmanial se descubrió gracias al desarrollo de fármacos sintéticos análogos de la insulina, cuando se vio que uno de estos análogos, un compuesto a base de diguanidina llamado sintaína, tenía actividad contra la infección por el protozoo *Trypanosoma*, lo que llevó al descubrimiento de diamidinas aromáticas antiparasitarias entre las cuales se encuentra la pentamidina (Figura 10). Este fármaco se ha utilizado como tratamiento de segunda línea para la leishmaniasis visceral durante más de 40 años, y también para pacientes refractarios después del tratamiento antimonial pentavalente. Aunque el uso de pentamidina para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea fue revisado en la década de 1990, este fármaco no es un antileishmanial ampliamente utilizado frente a este parásito. Este fármaco es altamente efectivo contra la fase aguda de la enfermedad parasitaria conocida como tripanosomiasis africana humana, también conocida como enfermedad del sueño, causada por *Trypanosoma brucei*. Sin embargo, su creciente tasa de fracaso del tratamiento y severa toxicidad ha disminuido gradualmente su uso (6,7)

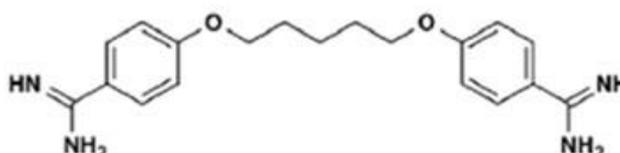


Fig 10: Estructura química pentamidina (6).

El nombre químico de la pentamidina es 4-[5-(4-carbamimidoylfenoxy)-pentoxyl-benzenecarboximidamida. Su estructura presenta diamidinas aromáticas de forma simétrica conectadas entre sí a través de enlaces de éter a una cadena de cinco átomos de carbono. La acción de la pentamidina sobre el parásito *Leishmania* no se conoce con certeza, pero se sugiere que produce una inhibición en los sistemas de transporte activo y mitocondrias. La pentamidina actúa como un inhibidor de los transportadores de arginina y poliamina. También se ha demostrado que la pentamidina inhibe el complejo de la cadena respiratoria, induciendo un gran eflujo de  $Ca^{2+}$  y un aumento significativo en la muerte del parásito asociada a la apoptosis. Además, se observó la inhibición de la actividad de la enzima topoisomerasa II en *L. panamensis* y *L. donovani*, seguido de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C, la activación de metacaspasa y fragmentación del ADN, todos los signos típicos de la apoptosis. En general, la pentamidina parece promover la muerte celular programada al actuar sobre las mitocondrias, afectando el complejo de la cadena respiratoria o inhibiendo el proceso de replicación (Figura 11) (6).

Los parásitos resistentes a la pentamidina se ha sugerido que tienen menor acumulación de esta en las mitocondrias, lo que hace que haya más fármaco disponible para el flujo de salida y la pentamidina sea menos tóxica para ellos (7).

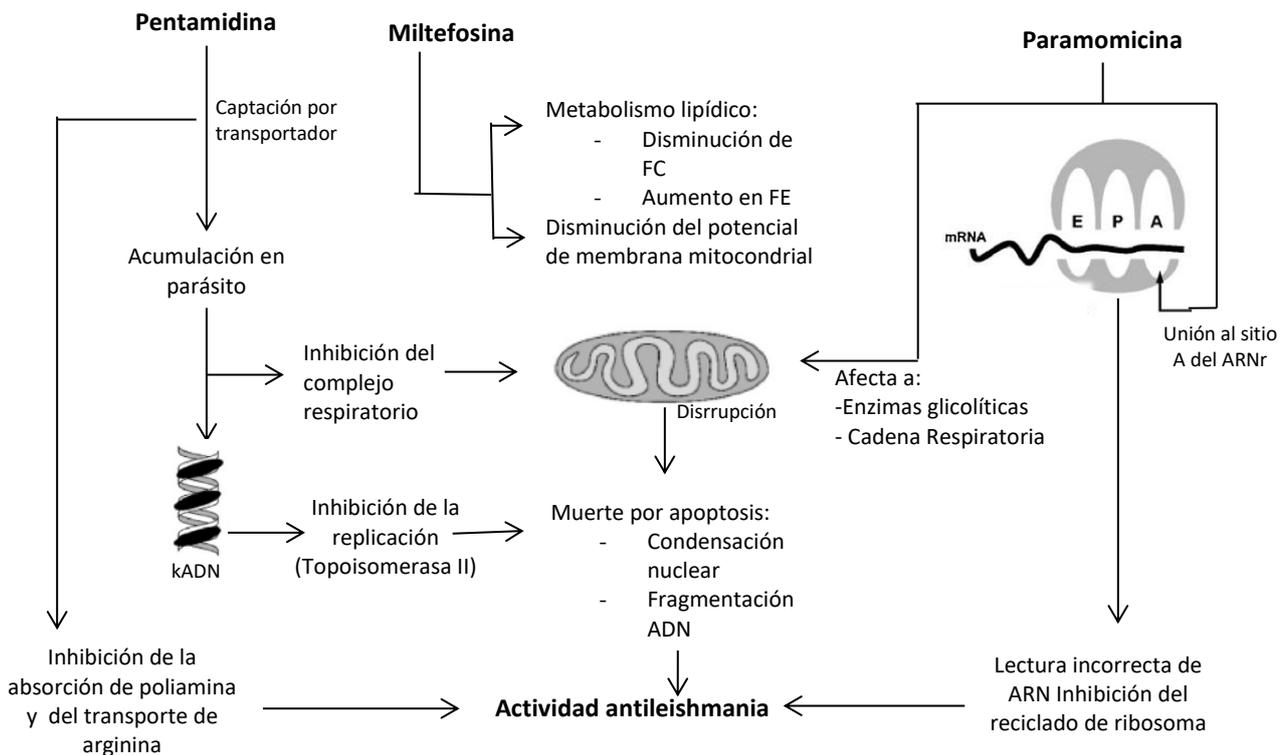


Fig. 11: Esquema mecanismos de acción de pentamidina, miltefosina y paramomicina (6).

Tras el fracaso de los fármacos anteriores en el control de la leishmaniasis, asociaciones como “Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi)” y la OMS junto con algunas fundaciones y laboratorios farmacéuticos están invirtiendo y promoviendo el desarrollo de nuevos fármacos basados en la nanotecnología como principal estrategia contra la leishmaniasis. El uso de transportadores coloidales cargados con agentes activos administrados por vía intravenosa, penetran con facilidad en las células del sistema fagocítico mononuclear gracias a que sigue una vía de captación fisiológica. Los nanosistemas pueden conducir altas concentraciones de fármaco en las células infectadas y en los fagosomas que contienen a los amastigotes (1).

Una de las cosas a tener en cuenta en el tratamiento de un paciente es el estado de su sistema inmune, ya que éste se sabe que afecta a la eficacia de los fármacos utilizados. Esto pasa por ejemplo con el empleo de antimoniales pentavalentes y de la pentamidina que dependen de las células T, mientras que la anfotericina B y la miltefosina son independientes de la respuesta inmune. Por lo que una buena inmunidad en el paciente es un factor clave en los fármacos empleados en la leishmaniasis. Un ejemplo de esto serían los pacientes con el VIH, que tienen una deficiencia de linfocitos T CD4, los cuales tienden a recaer con frecuencia en la enfermedad a pesar del tratamiento y tienen una menor tasa de curación (7).

También es importante contar con la farmacocinética de cada uno de estos tratamientos ya que según el tipo clínico de leishmaniasis que tenga el paciente habrá fármacos que tengan más eficacia que otros en cada una de las formas clínicas de la enfermedad. Por ejemplo, hay fármacos que tienen mayor afinidad por las vísceras como el hígado y que se emplearán con una mayor eficacia para tratar la leishmaniasis visceral, y otros con mayor afinidad por la piel se emplearán para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. También habrá que tener en cuenta el metabolismo y excreción de estos fármacos (7).

Otro factor de importancia es el tipo de especie de *Leishmania* que ha producido la infección, ya que entre las especies existen algunas diferencias bioquímicas y moleculares que pueden producir variaciones de la sensibilidad intrínseca de cada especie a algunos fármacos. Estas variaciones sumadas a la selección que ejerce un fármaco en los organismos que no son sensibles a él son, probablemente, la causa de la alta tasa de resistencias que existen a los tratamientos actuales. Además, las distintas especies pueden desarrollar mecanismos para disminuir la eficacia de los fármacos como: disminuir su captación, aumentar su eliminación o la inactivación por distintos metabolitos (7).

La tabla que se muestra (*Tabla 2*) a continuación resume los principales fármacos antileishmania y sus características más relevantes.

Tabla 2: Fármacos antileishmania y sus características principales (5).

Fármaco	Tipo de enfermedad	Eficacia	Toxicidad	Limitaciones
Antimonioales	L. visceral y cutánea	Varía entre el 35% y el 95% en función del área	Cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, pancreatitis y hepatotoxicidad	Resistencia confirmada en Bihar, India. Problemas de cumplimiento (tratamiento prolongado y dolorosa administración)
Amfotericina B deoxicolato	L. visceral y cutánea	>90%	Nefrotoxicidad, tromboflebitis y hipopotasemia	Inestabilidad térmica. Hospitalización por infusión intravenosa lenta
Amfotericina liposomal	L. visceral	>96%	Ligera nefrotoxicidad, escalofríos y fiebre durante la infusión	Inestabilidad térmica. Coste elevado.
Miltefosina	L. visceral	>94%	Hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogeneidad	No se puede administrar a pacientes embarazadas. Vida media larga, puede mostrar resistencias.
Paromomicina	L. cutánea y musculocutánea	>94% en Asia y 46–85% en África	Hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y ototoxicidad	La eficacia varía entre diferentes cepas.
Pentamidina	L. visceral y cutánea	Entre el 35% y el 95% según el área	Hiper glucemia miocarditis, hipotensión y taquicardia	Variación de eficacia

### 3. NANOMEDICINA EN LEISHMANIA. VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS

La nanotecnología se define como el desarrollo de la ciencia y la tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm, (un nanómetro es la billonésima parte de un metro). Es el resultado del progreso y la fusión de diversas disciplinas científicas, incluidas la mecánica cuántica, la biología molecular, la química, la genómica y la medicina. El desarrollo de la nanotecnología ha sido nombrada como la "próxima revolución industrial" (Iniciativa Nacional de Nanotecnología 2000) y promete tener un impacto sustancial en muchas áreas de nuestras vidas (8). El concepto de nanotecnología fue concebido por primera vez por Richard Feynman en su famosa conferencia *"There's Plenty of Room at the Bottom"* (Hay mucho espacio en el fondo) en 1959, donde Feynman exploró la posibilidad de manipular material a escala atómica. Gracias al descubrimiento de las partículas subatómicas por G. J. Stoney y J. J. Thompson, se pudo avanzar mucho en el desarrollo del campo moderno de las nanociencias. A principios de los años setenta

la investigación sobre nanotecnologías se disparó, los beneficios derivados de ellas han sido tan evidentes que ya son muchas las compañías que trabajan en investigar este campo (9).

La nanotecnología permite a los científicos aprovechar los efectos naturales a nivel de nanoescala que influyen en las propiedades biológicas, físicas, químicas, mecánicas y ópticas, ya que estas propiedades se comportan de forma diferente cuando los materiales se reducen a nanoescala. En este contexto nace la nanomedicina, que es la aplicación de la nanotecnología en las ciencias de la salud. Es una de las ramas de la nanotecnología con mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas (10).

La nanomedicina se ha utilizado para mejorar una serie de productos y procesos médicos; estos incluyen fármacos, imágenes médicas, dispositivos médicos, protectores solares, apósitos para quemaduras y heridas, agentes de unión dental, proporcionando numerosos beneficios. En el caso de los fármacos sus beneficios incluyen una mayor biodisponibilidad, una mayor relación dosis-respuesta, personalización y seguridad en comparación con los medicamentos convencionales (10). Estas características es lo que se conoce como terapia dirigida o vectorización de fármacos. Dirigir un determinado fármaco de forma específica a su diana farmacológica proporcionando una mayor eficacia terapéutica, en menos dosis, así como una mejora de la farmacocinética de la molécula, como puede ser un aumento en la semivida plasmática reduciendo otras propiedades como la frecuencia de administración del fármaco o su biodistribución por el organismo. Esto podría superar las deficiencias que presenta la monoterapia (empleo de un solo fármaco) al actuar sobre diversas vías de señalización a la vez, disminuyendo las resistencias a múltiples fármacos para una terapia más eficaz y creando una oportunidad para administrar dos o más fármacos simultáneamente como una terapia combinada que induzca un efecto sinérgico (9).

En las últimas dos décadas, un gran número de fármacos generados por la aplicación de la nanomedicina han recibido aprobación regulatoria como agentes terapéuticos y de diagnóstico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades como: el asma, el dolor, la alergia, diferentes infecciones, enfermedades autoinmunes, degeneración macular, hepatitis, etc. Se estima que existen más de 800 fármacos que utilizan nanotransportadores comercializados actualmente (9).

### **3.1 Tipos de sistemas de nanoencapsulación empleados en la leishmaniasis**

La forma de suministrar los fármacos es un aspecto muy importante en las ciencias farmacéuticas. Normalmente, el fármaco de interés se administra disuelto, encapsulado, adsorbido o adherido dentro o alrededor de los diferentes nanosistemas (*Figura 12*). La liberación de fármacos está íntimamente relacionada con el tamaño de las partículas o moléculas involucradas. Por una parte, las partículas pequeñas tienen una mayor relación área superficial-volumen, lo que favorece una mayor asociación del fármaco con las moléculas del tejido diana (al estar más expuesto). Por otra parte,

las partículas de mayor tamaño tienen grandes núcleos, lo que permite una mayor cantidad de fármaco encapsulado en ellas.

Los nanosistemas administrados por vía sistémica tienen propiedades de biodistribución y farmacocinética variables, estas dependen de múltiples factores fisicoquímicos y biológicos interrelacionados, un ejemplo es la opsonización, un mecanismo fisiológico conocido para el aclaramiento de organismos microbianos. Recientemente, se ha observado que los nanosistemas también se someten a opsonización y, por lo tanto, se eliminan rápidamente del cuerpo, es decir, pueden ser reconocidos por el sistema inmune del huésped cuando se administran por vía intravenosa y ser fagocitados por el SRE. Además según varios estudios, la carga superficial del nanosistema puede influir en este proceso, se evidencia que las partículas con carga neutra tienen una tasa de opsonización mucho más baja que las partículas cargadas (11).

Algunos de los factores que determinan las propiedades farmacocinéticas de los nanosistemas son: el tamaño, la morfología, características de la superficie (como carga y composición), así como el recubrimiento con proteínas plasmáticas. Una vez en el torrente sanguíneo, los nanosistemas a los cuales no les ha sido modificada su superficie son rápidamente captados por el sistema mononuclear fagocítico. Para evitar esta captación, algunos nanosistemas se deben recubrir con polímeros o surfactantes de carácter hidrófilo, o ser formulados mediante materiales biodegradables con características hidrofílicas, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), el óxido de polietileno o el polisorbato 80 (Tween 80). Si el nanosistema está cubierto por algún polímero, la liberación es controlada por la difusión del fármaco a través de la membrana polimérica. El revestimiento de la membrana actúa como una barrera de liberación del fármaco, por lo tanto, la solubilidad de los fármacos y su difusión a través de la membrana polimérica se convierte en un factor determinante en la liberación del mismo. Por otra parte, la velocidad de liberación también puede verse afectada por interacciones iónicas entre el fármaco y el resto de los componentes de la formulación, cuando el fármaco atrapado interactúa con otros componentes puede formarse un complejo menos soluble en agua, lo que puede retrasar la liberación del fármaco.

El uso de nanosistemas se presenta como una estrategia complementaria para el desarrollo de nuevos tratamientos y terapias de combinación para la leishmaniasis, esto permite transportar una alta concentración de fármaco necesaria en el fagolisosoma, donde se aloja el parásito. La estrategia principal en el tratamiento de Leishmania es dirigir los fármacos directamente a los macrófagos, utilizando nanosistemas de administración adecuados (*Figura 13*). Otra de las ventajas del uso de nanosistemas en leishmaniasis es la posibilidad de administrar múltiples cargas de distintos fármacos en una sola molécula portadora, proporcionando así una terapia combinada que puede tener un efecto sinérgico, disminuyendo las resistencias y mejorando el efecto terapéutico (4).

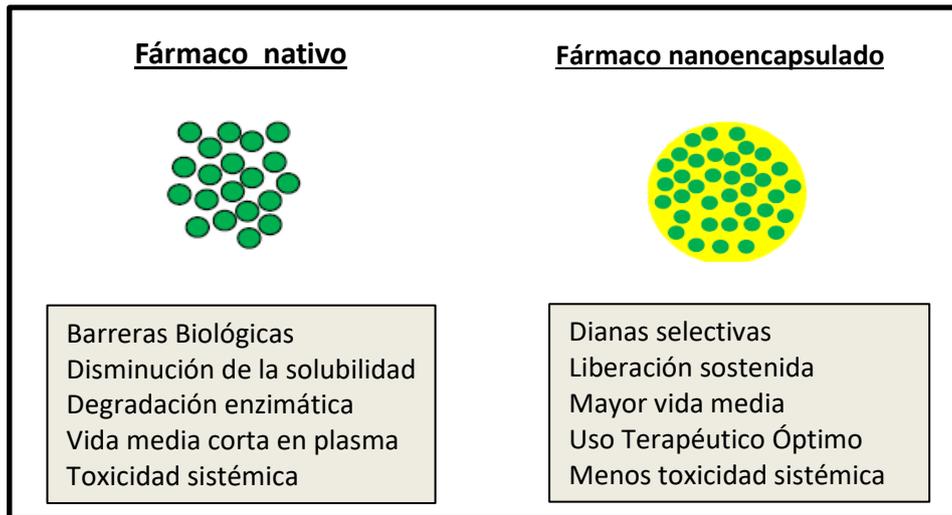


Fig. 12: Diferencias entre fármaco nativo y en nanoencapsulación (9).

Los materiales y procesos que se han utilizado para la construcción de nanosistemas de administración de fármacos en el tratamiento de la Leishmania son muy diversos, actualmente existen varios tipos de nanosistemas tanto orgánicos como inorgánicos que se utilizan con este fin, a continuación se describen algunos de ellos:

### **Nanoemulsiones**

Las nanoemulsiones son mezclas de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante el uso de un agente tensioactivo (emulsionante) a través de interacciones electrostáticas repulsivas. La adición de surfactante es necesaria para la creación de pequeñas gotas (100 nm) ya que disminuye la tensión interfacial. Se han desarrollado formulaciones lipídicas de AmpB potencialmente buenas para administración oral (4).

### **Cocleatos lipídicos**

Los nanococleatos son nanoestructuras estructuradas en forma de cigarro compuestas por bicapas lipídicas cargadas negativamente unidas por un catión divalente, normalmente calcio. El calcio induce una deshidratación de los dominios, por lo que la cantidad de agua en esta región baja, lo que permite una mejor eficacia de encapsulación de fármacos hidrófobos, que tienen una alta afinidad por el interior hidrófobo de las bicapas lipídicas. Este sistema es un enfoque interesante en la producción de sistemas lipídicos para el suministro oral (4).

### **Nanopartículas lipídicas sólidas**

Las nanopartículas lipídicas sólidas son nanoesferas hechas de lípidos sólidos, con un tamaño en el rango de 50-1.000 nm. Consisten en una matriz sólida de lípidos, es decir,

glicéridos, ácidos grasos y ceras, estabilizados por emulsionantes fisiológicamente compatibles, como fosfolípidos, sales biliares, éteres de polioxietileno y alcohol polivinílico. Los lípidos utilizados en su producción son sólidos a temperatura ambiente, y la mayoría de ellos tienen baja toxicidad (4).

### **Nanopartículas de polímeros**

Las nanopartículas de polímeros consisten en una matriz polimérica (nano o microesferas) o un sistema de depósito (nano o microcápsulas). Se pueden usar varios polímeros sintéticos para preparar nanopartículas, que incluyen poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA), poli-láctido-co-glicólido (PLGA), poli-caprolactona (PCL) y policianoacrilato (PCA). Sin embargo, los polímeros proteínicos naturales, como la albúmina y la gelatina, y los polisacáridos, como el quitosano, alginato y almidón, también se han descrito como candidatos para el suministro de nanopartículas. Otros polímeros, como polietilenglicol (PEG) y N-2-hidroxipropil-metacrilamida (HPMA), se han usado predominantemente para producir polímeros conjugados de fármacos en forma de profármacos macromoleculares. El mecanismo de liberación implica dividir el enlazador entre el polímero y el agente bioactivo. Las nanopartículas de polímeros pueden ser importantes en el tratamiento de enfermedades infecciosas como la leishmaniasis, ya que su pequeño tamaño les permite atravesar barreras biológicas tras la administración parenteral, mejorando también la captación celular y permitiendo la administración de agentes terapéuticos a los tejidos infectados (4).

### **Polímeros de polisacáridos**

Los polisacáridos son nanosistemas ideales para aplicaciones biomédicas, ya que se obtienen fácilmente de fuentes naturales. Algunos ejemplos de polisacáridos de origen vegetal son almidón, celulosa, hemicelulosa, ácidos hialurónicos, alginato y goma guar, mientras que los polisacáridos procedentes de animales incluyen quitina y sulfato de condroitina. Los polisacáridos con diferentes estructuras actúan por diferentes mecanismos de acción en la misma diana, en el caso de la leishmaniasis, actúan en los macrófagos por distintas vías, por ejemplo, los polisacáridos sulfatados, aumentan la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos, mientras que el arabinogalactano estimula de la producción de O<sub>2</sub> y TNF-113 (4).

### **Micelas poliméricas**

Las micelas poliméricas son nanoestructuras con núcleo/corteza compuestas de copolímeros de bloques con naturaleza anfifílica, en las que los grupos polares están en la superficie y las partes apolares quedan inmersas en el interior de la micela. Las propiedades intrínsecas y modificables de las micelas poliméricas las hacen especialmente adecuadas para la administración de fármacos. Entre los polímeros utilizados para la preparación de micelas y poloxámeros presentan un comportamiento

interesante y se han aplicado en una amplia gama de industrias biomédicas y farmacéuticas. Particularmente, el poloxámero en medios acuosos exhibe estructuras micelares, que pueden convertirse en estructuras de tipo gel en función de su longitud, concentración y temperatura. En el caso de la leishmaniasis se ha empleado la combinación de la AmpB-micela de poloxámero, ésta se convierte en un gel semirrígido al contacto con el tejido local, creando un reservorio y manteniendo el fármaco en el espacio extracelular; esto le permite actuar contra parásitos en el sitio de infección local. Con el tiempo, a medida que la matriz del gel se diluye con los fluidos corporales y la fagocitosis, el fármaco se libera gradualmente a la circulación sistémica, permitiendo controlar su acción sistémica (4).

### **Compuestos inorgánicos**

La mayoría de los nanosistemas de interés para la industria farmacéutica están hechas de polímeros orgánicos (biodegradables o no), pero los sistemas inorgánicos, así como los materiales híbridos orgánico-inorgánicos, también están recibiendo una atención considerable. Nanopartículas de sílice, nanoestructuras de hidroxiapatita, nanopartículas metálicas como óxidos de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), oro (Au) y plata (Ag), así como nanoestructuras basadas en carbono (nanotubos, grafeno, nano-cebollas y cuernos) tienen varias características interesantes y permiten diferentes funcionalidades (por ejemplo su empleo en terasnostica, es decir, pueden ser utilizados de forma diagnóstica y terapéutica) para combinarse en un solo sistema (4).

Pequeños agregados de metales bien definidos pueden ser producidos con métodos muy precisos y controlados, modulando las condiciones de reacción usadas en su preparación. Pueden ser interesantes los metales en forma de nanopartículas en el tratamiento de la leishmaniasis, debido a su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno (ERO). En particular, se descubrió que las nanopartículas de plata inhibían la supervivencia de amastigotes en células hospedadoras y, en presencia de luz UV, el efecto era más significativo (4).

Las nanopartículas de óxido metálico, especialmente dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), óxido de zinc ( $\text{ZnO}$ ), óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ) y, más recientemente, nanopartículas de óxido de selenio ( $\text{SeO}_2$ ), han sido muy estudiadas, demostrando un importante efecto antibacteriano. Actualmente, los compuestos de carbono están atrayendo el interés de las farmacéuticas debido a sus excelentes propiedades mecánicas, térmicas y ópticas (4).

Debido a sus dimensiones, similares a las de los componentes inorgánicos de los tejidos calcificados, se espera que los materiales de fosfato cálcico de tamaño nanométrico tengan una mejor bioactividad y biocompatibilidad que los materiales convencionales. Además, el fosfato de calcio es transportador económico, químicamente estable, compuesta de minerales inorgánicos nativos del organismo, que pueden metabolizarse como un producto de degradación no tóxico (4).

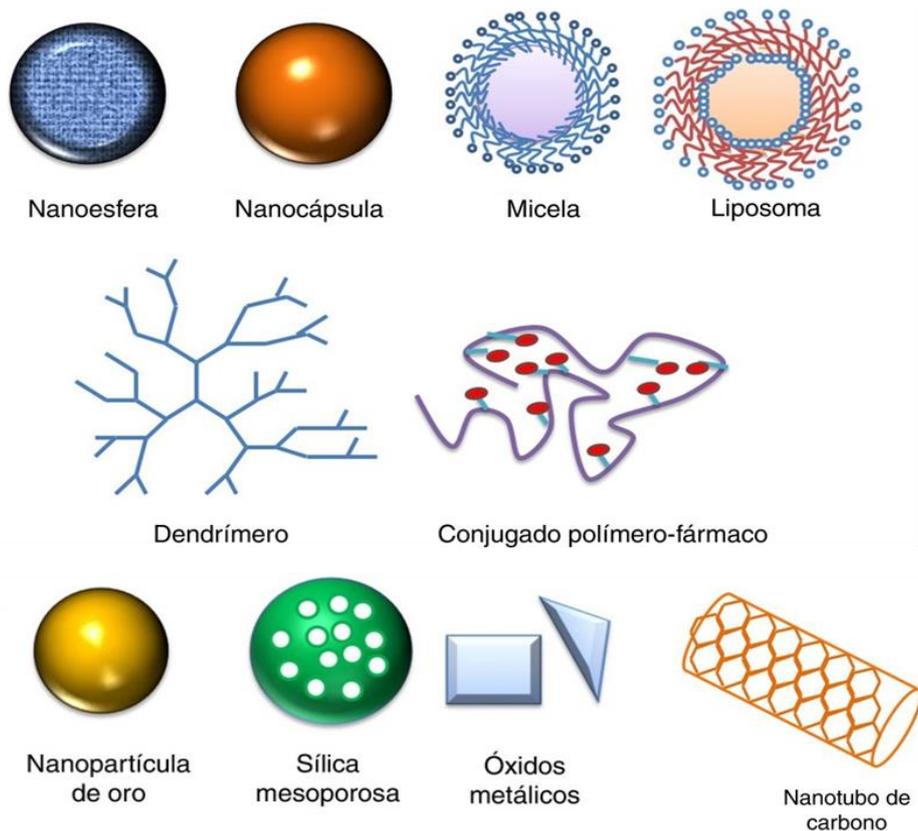


Fig 13: Tipos de nanosistemas (12).

### 3.2 Liposomas

Dentro de los nanotransportadores encontramos los liposomas, dichos nanosistemas constituyen pequeñas vesículas lipídicas artificiales de forma esférica, que se pueden crear a partir de colesterol y de fosfolípidos, formadas por una o más bicapas fosfolípídicas que rodean un núcleo acuoso (*Figura 14*). Estas estructuras han sido ampliamente estudiadas para el transporte de fármacos debido a sus diversas características, incluyendo una flexibilidad para modificaciones superficiales, el uso de diferentes métodos de producción, tamaño reducido, biocompatibilidad con sistemas biológicos y versatilidad en el transporte. Varían en tamaño dependiendo de cómo están diseñados, pueden variar entre 10 y 200 nm de diámetro. Estas y otras características específicas de los liposomas los han convertido en un objetivo para la investigación en nanomedicina porque estas estructuras tienen el potencial de mejorar el transporte y liberación de muchos fármacos (1).

El trabajo de numerosos investigadores en el campo de la nanomedicina condujo a la aparición de avances técnicos en el desarrollo de diferentes tipos de liposomas (liposomas PEGilados o liposomas de liberación activada, liposomas que contienen polímeros de ácido nucleico o liposomas dirigidos a ligandos, liposomas cargados de fármacos) que han demostrado su eficacia en numerosos ensayos clínicos como vehículos de muchos medicamentos anticancerígenos, antifúngicos y antibióticos, así como de medicamentos genéticos y medicamentos antiinflamatorios. La liberación del

fármaco tiene una implicación importante en las actividades terapéuticas, el fármaco atrapado en los liposomas se vuelve biodisponible cuando se libera del sistema para tener una actividad terapéutica óptima (9).

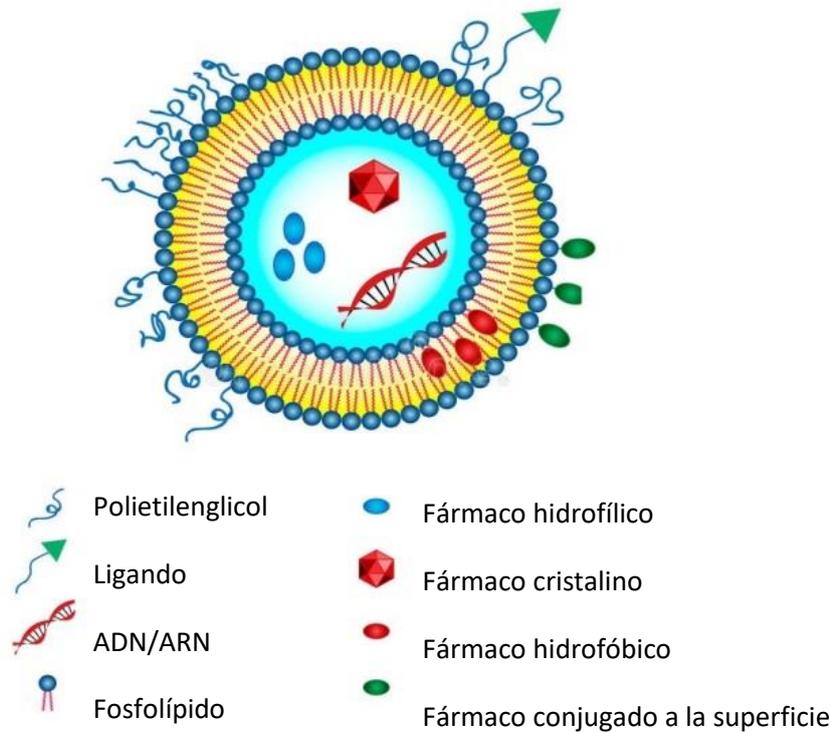


Fig. 14: Estructura liposoma

<https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-sistema-de-env%C3%ADo-scheme-de-la-droga-de-los-liposomas-image79276746>

Algunas de las primeras demostraciones de la actividad *in vivo* en modelos animales de los fármacos cargados en liposomas utilizaron el fármaco anticanceroso citosina arabinósido para demostrar aumentos significativos en los tiempos de supervivencia de ratones portadores de leucemia L1210, a partir de esto empezaron a probar los efectos de una amplia variedad de características en los liposomas para obtener resultados terapéuticos. Estos experimentos fueron seguidos de extensos estudios que empleaban AmpB y doxorubicina liposomal que finalmente condujeron a los primeros ensayos clínicos de fármacos liposómicos. Tras estos primeros ensayos se demostró una serie de problemas asociados con el uso *in vivo* de los liposomas de primera generación, uno de ellos fue la dificultad para retener algunos tipos de moléculas atrapadas en el interior de los liposomas. Además la liberación del fármaco se vio afectada por la exposición a las proteínas séricas, ante esto se demostró que el aumento del contenido de la bicapa de liposomas, en particular, mediante la incorporación de colesterol, compactaba las bicapas fluidas y evita la liberación del contenido de los nanosistemas. El cambio de una bicapa de fosfolípidos en fase líquida a una bicapa en fase sólida también redujo esta liberación, al igual que la

incorporación de esfingomielinina en estos nanosistemas. Como pasa en las membranas biológicas, las de los liposomas tienen una baja permeabilidad a los fármacos hidrófilos y una alta permeabilidad a los fármacos hidrófobos. Un avance importante en esta área fue el desarrollo de la carga de fármaco en respuesta a los gradientes de pH transmembrana que se generan en respuesta a los tampones ácidos internos o sales disociables generadoras de protones. Los fármacos que son bases débiles precipitan fácilmente dentro de los liposomas y tienen excelentes propiedades de retención, en cambio los fármacos que no son bases débiles se pueden convertir a profármacos de base débil, lo que permite la encapsulación y la retención liposomal (13).

El SRE es el sitio principal de acumulación de liposomas después de su administración sistémica, aquí los liposomas son eliminados principalmente por los macrófagos residentes. Los órganos primarios asociados con el SRE incluyen el hígado, el bazo, el riñón, los pulmones, la médula ósea y los ganglios linfáticos (4). Esto hace que sea un nanotransportador óptimo para enfermedades que afecten al SRE, debido a su rápida eliminación del torrente sanguíneo, que reduce su distribución a otros órganos con tejidos aunque implica toxicidad para los órganos del sistema mononuclear fagocítico. Debido a esto se intentó aumentar la vida media de los liposomas para que pudieran llegar a los distintos órganos, llegando al recubrimiento de PEG en la superficie del liposoma que da como resultado reducciones sustanciales en la eliminación rápida (13).

La mayoría de las toxicidades de los fármacos se reducen cuando están atrapados en nanotransportadores, entre ellos los liposomas. Se ha demostrado que los fármacos liposomales son muy útiles debido a que su diámetro promedio está en el rango ultrafiltrable (10-200 nm), y por su capacidad para reducir los efectos secundarios de los fármacos encapsulados en relación con los fármacos libres. Esto ha resultado en un aumento general de la eficacia y una mayor seguridad (13).

#### **4. LIPOSOMAS EN LEISHMANIASIS. PRESENTE Y FUTURO DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Como ya se ha comentado anteriormente, el tratamiento actual de la leishmaniasis está lejos de ser un tratamiento ideal ya que requiere la administración de altas concentraciones de fármacos al ser una enfermedad intracelular, que son tóxicos y poco tolerados por las personas a las que se le administra, además, la mayoría de estos fármacos han desarrollado a lo largo de su uso numerosas resistencias (1). El descubrimiento de fármacos tarda entre 10 a 12 años en general e implica altos costes. Una posibilidad para mejorar el tratamiento de la leishmaniasis sería la aplicación de nanosistemas de liberación que puedan potenciar la eficacia terapéutica de los fármacos existentes al optimizar su absorción, distribución, metabolismo, excreción y reducir la toxicidad, por lo tanto, el desarrollo de sistemas que sean capaces de administrar fármacos y atacar parásitos dentro de las células huésped es crucial. Además, *Leishmania* plantea un desafío adicional para la administración de fármacos ya que estos tienen que alcanzar niveles terapéuticos en múltiples sitios (hígado, médula ósea, bazo, lesiones cutáneas) y alcanzar los parásitos dentro del fagolisosoma de los macrófagos. En concreto, los liposomas han mostrado un potencial significativo para mejorar la eficacia y la tolerancia de los fármacos antileishmania, al ser

eliminados principalmente por los macrófagos residentes en el SRE (14). Dado que AmpB es actualmente el agente antileishmaniano más potente, la mayoría de los esfuerzos en nanotecnología se han centrado en este medicamento. En un

La primera aplicación de liposomas en la enfermedad de leishmaniasis fue en 1978, cuando Alving y cols., informaron sobre el uso de liposomas en hámsters infectados con leishmaniasis visceral. Este trabajo y estudios posteriores demostraron la eficacia de compuestos antimoniales encapsulados en liposomas contra *Leishmania* (1). Actualmente, a pesar de que la quimioterapia antimonial es el tratamiento de primera línea en muchos países, hay muy pocos estudios en modelos experimentales con respecto al uso de liposomas que contienen antimoniales para el tratamiento de la leishmaniasis. La formulación liposómica de antimonio de meglumina fue 10 veces más efectiva que el fármaco libre contra amastigotes intracelulares de *L. major*. Se observó que la absorción de liposomas que contenían antimonio de meglumina era mayor que la observada para los macrófagos no infectados, lo que podría haber contribuido a la mejora del índice de selectividad (14).

Una forma liposomal de AmpB (AmBisome®) fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en 1997 para el tratamiento de pacientes con leishmaniasis visceral. Esta formulación comprende una organización de vesículas unilaminares pequeñas compuestas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, diestearoil fosfatidilglicerol y AmpB, desde entonces las líneas de estudio han continuado la investigación de la acción antileishmanial de AmBisome® (1).

En 1998, Gangneux y cols., realizaron un estudio comparando los efectos de Fungizone® (AmpB desoxicolato) (seis dosis de 0.8 mg/kg, iv) y AmBisome® (seis dosis de 0.8, 5 y 50 mg/kg, intravenosa (i.v.)) con respecto a la tolerancia y eficacia en ratones con leishmaniasis visceral inducida por *L. infantum*. A dosis bien toleradas de 5 o 50 mg/kg, AmBisome® erradicó por completo los parásitos del hígado, el bazo y los pulmones. Con 0,8 mg/kg, AmBisome® demostró ser más eficaz que el Fungizone® administrado a la misma dosis y redujo de 4-6 veces más la carga parasitaria (15).

Sundar y cols., en sus experimentos analizaron la dosis efectiva de AmBisome® más baja contra la leishmaniasis visceral, y en 2004, este autor publicó un estudio que comparó los tratamientos convencionales con formulaciones lipídicas y concluyó que la formulación liposomal causaba menos toxicidad para el paciente que la Fungizone® (16).

En 2005, Kafetzis y cols., realizaron un estudio durante la hospitalización de 29 niños (0 - 14 años) diagnosticados con leishmaniasis visceral, en este estudio, los autores encontraron que 10 niños habían sido tratados con antimonio como primera línea, mientras que los otros 19 pacientes fueron tratados con AmBisome® en diferentes regímenes de dosificación. Todos los niños se curaron de la infección; sin embargo, se observó una diferencia importante en el tiempo de hospitalización: aproximadamente 19 días para el tratamiento con antimonio pero solo 7 días para el tratamiento con AmBisome®, lo que indica la eficacia terapéutica de la formulación y la reducción del tiempo de hospitalización del paciente (17).

Más tarde, en 2008, Sundar y cols., compararon en Bihar (India) hogar de casi la mitad de la carga mundial de leishmaniasis visceral y dónde la resistencia al antimonio pentavalente ha puesto fin a su uso, la eficacia de AmpB liposomal en dosis única (5 mg/kg) y la asociación de una dosis única de AmpB liposomal (5 mg/kg) seguida de miltefosina oral de ciclo corto de 7 a 14 días. Ambos tratamientos fueron tolerados satisfactoriamente y todos los sujetos mostraron respuestas aparentes iniciales de curación, nueve meses después del tratamiento, las tasas de curación final fueron similares siendo de un 91% para la dosis única de AmpB y de un 98% para la combinación con miltefosina durante 14 días (18). En 2009, este mismo autor volvió a comparar la eficacia de una sola infusión de AmpB liposomal (a una dosis de 10 mg/kg) con la terapia parenteral convencional, que consistía en 15 infusiones (1 mg/kg) de AmpB desoxicolato a días alternos. La hospitalización de los pacientes que recibieron AmpB liposoma fue de un día mientras que la de los pacientes que recibieron la terapia convencional fue de 29 días. La tasa de curación fue parecida en ambos grupos (95.7% en el grupo de terapia liposomal y 96.3% en el grupo de terapia convencional). Los efectos secundarios fueron menores en el grupo de la AmpB liposomal. Por lo que concluyeron que una única infusión de Amp B liposomal no fue inferior y fue menos costosa que la terapia convencional con Amp B desoxicolato (19).

Posteriormente, Romero GAS y cols., en 2017 realizaron un ensayo multicéntrico, para evaluar la eficacia y seguridad de la amfotericina B desoxicolato (AmpB) (1 mg/kg/día durante 14 días), amfotericina B liposomal (LAmpB) (3 mg/kg/día durante 7 días) y una combinación de LAmpB (dosis única de 10 mg/kg) más antimoniato de meglumina (MA) (20 mg Sb + 5/kg/día durante 10 días), en comparación con tratamiento estándar con MA (20 mg Sb + 5/kg/día durante 20 días) en pacientes con leishmaniasis visceral. Una alta toxicidad de AmpB provocó un análisis de seguridad interno no planificado y este brazo de tratamiento se descartó. Las tasas de curación a los 6 meses fueron las siguientes: 77.5% para MA, 87.2% para LAmpB y 83.9% para LAmpB más MA, mostrando la monoterapia con LAmpB menos efectos secundarios adversos que las otras dos terapias. Demostrando que la LAmpB sería un tratamiento de primera línea más adecuado para la leishmaniasis visceral que el tratamiento estándar en Brasil (20).

Tras todas estas evidencias la AmpB liposómica comercial, Ambisome®, producida por Gilead Sciences, es recomendada por la OMS como terapia de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis visceral causada por *L. donovani* en India, Bangladesh, Bhutan y Nepal o *L. infantum* en la cuenca del Mediterráneo, Medio Oriente, Asia Central y América del Sur. Esta formulación liposomal es 350-750 veces más activa que el antimoniato de meglumina y 2-5 veces más activa que el AmpB libre. Ambisome® se ha utilizado para tratar a pacientes coinfectados con VIH-Leishmania, sin embargo, este tratamiento no ha podido reducir la recaída y las tasas de mortalidad en esos pacientes coinfectados (14).

Aunque Ambisome® es la formulación de liposomas más eficaz de AmpB, existen otras formulaciones de esta corriente de fármaco disponible en el mercado: la formulación coloidal Amphocyl® en Europa, que comprende una dispersión coloidal de sulfato de colesteroilo de sodio, conformada como discos planos (también llamada Amphotec® en EE. UU.), la suspensión inyectable Abelcet®, un complejo de AmpB con una estructura lipídica multilaminar de tipo cinta que consiste en fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol

(EE. UU.), Fungisome® (India) y la emulsión Amphomul® (India), pero la administración y toxicidad del fármaco aún plantea problemas en cada una de estas alternativas terapéuticas (14).

Los investigadores continúan trabajando con la encapsulación de fármacos en liposomas para el tratamiento de la leishmaniasis. En un modelo de hámster de leishmaniasis, Sarkar y cols., observaron que la quercetina nanoencapsulada era más potente para reducir la carga de fármaco y para reducir la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad en comparación con el fármaco libre (21). Otro estudio utilizó liposomas para transportar atovacuona, un antiparasitario eficaz en el tratamiento de leishmaniasis. Las actividades del compuesto libre y el fármaco liposomal se compararon en un modelo murino de infección con *L. infantum*. Los resultados mostraron que la atovacuona liposomal es 23 veces más efectiva que el compuesto en su forma libre (22).

La miltefosina, también ha sido estudiada en su forma liposomal. En este estudio, Papagiannaros y cols., demostraron que la miltefosina liposomal tenía una mayor eficacia que la droga libre en promastigotes de Leishmania que eran resistentes a la miltefosina convencional (23).

Montari y cols., observaron que una ftalocianina mostraba un 20% de actividad anti promastigoto y un 20% de actividad anti amastigota contra *L. braziliensis* después de 15 minutos de irradiación solar. Sin embargo, cuando se cargó en liposomas ultraformables, este compuesto provocó un 100% de actividad anti promastigoto y un 80% de actividad anti amastigota a la misma dosis de luz. Además, se observó que la estructura liposomal ultradeformable podía penetrar más profundamente y de forma homogénea en la capa córnea. Estos resultados muestran el potencial de esta formulación para la leishmaniasis cutánea (24).

La química de la superficie y la carga de los liposomas se pueden modular para mejorar la orientación. Por ejemplo, los liposomas que contienen azúcar en sus superficies se desarrollaron para dirigirlos a los macrófagos porque estas moléculas tienen receptores que reconocen azúcares y residuos de glucósidos. En esta área, se han llevado a cabo estudios usando liposomas azucarados como agentes antileishmaniales en modelos *in vivo*. Se ha demostrado que los liposomas cargados positivamente muestran una acción antiparasitaria, aunque el mecanismo de esta interacción no se conoce bien, la interacción del liposoma catiónico con la membrana cargada negativamente del parásito causa daño celular y la alteración del metabolismo del oxígeno. De manera similar al ejemplo anterior, el uso de liposomas, junto con tuftsin, un tetrapéptido activador de macrófagos naturales, mejora la orientación de estas estructuras a las células del sistema de fagocitos mononucleares claros y también las estimulan no específicamente contra infecciones, ayudando en el tratamiento de la infección por Leishmania (1).

Adicionalmente, se ha estudiado el uso de liposomas como adyuvantes en el desarrollo de vacunas, por ejemplo, en el trabajo de Mazumber y cols., que emplearon liposomas catiónicos como adyuvantes para transportar antígenos y ADN (25).

## 5. DISCUSIÓN

La viabilidad comercial es una de las características más deseadas de cualquier sistema de administración y transporte novedoso y se rige por el coste del material y la facilidad de fabricación. Aunque la AmpB liposomal es actualmente la estrategia más efectiva, este fármaco presenta un alto coste en comparación con las formas convencionales, pero debe abordarse la rentabilidad. El tratamiento con la formulación convencional de Amp B desoxicolato para la leishmaniasis cuesta aproximadamente 17 € por día (6,5 € el vial que contiene 50 mg de AmpB), considerando un paciente de 70 kg y la dosis de 1 mg / kg, mientras que el tratamiento con AmpB liposomal puede exceder 680 € por día. La Amp B liposomal tenía un precio de 170 € por vial de 50 mg, sin embargo, un nuevo acuerdo de precio preferencial para países en desarrollo ha reducido el costo a 17 € por vial (precio negociado por la OMS). Por lo tanto, el tratamiento puede costar hasta 240 € por día considerando un paciente de 70 kg y una dosis de 10 mg/kg. Además, debe considerarse la duración del tratamiento de cada fármaco, para los antimoniales pentavalentes el tratamiento recomendado es de 20 días, mientras que para la formulación liposómica de Amp B se recomienda una administración de 3 a 5 días y una vez a la semana durante las siguientes dos semanas.

Otro parámetro a considerar para elegir el tratamiento es el beneficio terapéutico, porque a pesar de que las formulaciones convencionales son menos costosas que las liposomales, pueden requerir la sustitución de la terapia por ineficacia, interacción negativa con otra medicación, efectos adversos pronunciados. Por lo tanto, el precio más bajo no indica el coste más bajo, ya que puede dar lugar a gastos de hospitalización, administración concomitante de otros fármacos (1) (14).

Por último, otro ámbito a tener en cuenta en el empleo de un nanotransportador de fármacos, en el caso de las enfermedades olvidadas como la leishmaniasis, es la conservación y la administración al paciente, ya que en los países donde la leishmaniasis es endémica las altas temperaturas y una población empobrecida dificulta el buen estado del medicamento. Por otra parte, la administración del mismo debe ser cómoda y asequible para el paciente, tanto en la vía de administración (por ejemplo, una vía oral frente a una vía parenteral), como el traslado al centro de salud o posterior estancia en el mismo durante el tratamiento, ya que se mejora la calidad del paciente y reduce costes que es una de las finalidades de los fármacos novedosos basados en la nanomedicina frente a los tratamientos convencionales.

## 6. CONCLUSIÓN

La leishmaniasis, a pesar de su importancia global, ha sido relativamente poco investigada por las compañías farmacéuticas, principalmente debido a la complejidad de la infección parasitaria y la falta de incentivos económicos. Aunque el cambio climático está causando que la leishmaniasis se propague a áreas donde nunca antes se había identificado, como en el caso de España con un aumento en el número de casos cada año, las zonas más afectadas siguen siendo países en vías de desarrollo como India, Brasil, Nepal o Afganistán, donde esta enfermedad se asocia con altos niveles de mortalidad y/o morbilidad. El escenario es crítico porque las medidas

preventivas que reducen la transmisión de infecciones a menudo se implementan de manera deficiente, y los tratamientos farmacológicos adecuados no están disponibles o tienen un coste que no puede asumirse.

Los fármacos habitualmente utilizados en la práctica clínica, siendo actualmente el tratamiento de elección los antimoniales, son tóxicos y en su mayoría tienen se administran por vía intravenosa, lo que hace que aumente la tasa de abandono del tratamiento, además por lo general no dan lugar a la cura de la enfermedad generando resistencias. El desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento antileishmania requiere largo tiempo y extensos ensayos, lo que supondría una inversión económica importante, mientras que la mejora de los fármacos que ya están establecidos es una ruta menos costosa. Gracias a la nanotecnología se han creado sistemas de encapsulación que son capaces de hacer que estos fármacos sean más selectivos para los parásitos y menos tóxicos, gracias a la especificidad para alcanzar la célula diana, en este caso el sistema fagocítico mononuclear. De entre los nanosistemas que existen, los liposomas representan la vía más exitosa ya que son opsonizados rápidamente y absorbidos por los macrófagos, permitiendo una rápida interacción fármaco- parásito.

La investigación de nanosistemas para fármacos antileishmania está más avanzada que la de otras “enfermedades olvidadas” ya que existen varios estudios que se encuentran en fase clínica con humanos, pero a pesar de una extensa investigación, la terapia en humanos con fármacos leishmanicidas encapsulados en liposomas no es aún una realidad. Hasta ahora, la única formulación liposómica comercializada con éxito es el Ambisome®, que ha mejorado significativamente el tratamiento de leishmaniasis visceral en muchos países, proporcionando la erradicación casi completa de la carga del parásito, con menos efectos tóxicos. Esta formulación es el mejor tratamiento disponible en la actualidad teniendo en cuenta los resultados obtenidos en algunos ensayos clínicos en los que se observó que un tratamiento intravenoso de 10 mg/kg de Ambisome® proporcionaba una curación de hasta el 98%. Además este tratamiento ha disminuido el tiempo de hospitalización, disminuyendo de esta manera el coste sanitario.

Actualmente existen varios estudios que han analizado sustancias que no se prescriben habitualmente para la leishmaniasis, pero que presentan actividad frente a ella como la quercetina, la curcumina y los derivados de fosfolípidos. Estas sustancias tienen inconvenientes en cuanto a su uso por una baja biodisponibilidad y/o estabilidad, por lo que el uso de la nanomedicina puede proponer nuevas alternativas en el tratamiento de la leishmaniasis con un potencial uso en el futuro, y se puede esperar que surjan nuevas terapias a partir de estos estudios.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Khalil NM, Cristina De Mattos A, Moraes TC, Carraro M, Ludwig DB, Mainardes RM. Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases. *Curr Pharm Des.* 2013;19(2012):7316–29.
2. OMS. Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS. 2010;1–200.
3. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014;69(S1):S10–8.
4. Bruni N, Stella B, Giraudo L, Della Pepa C, Gastaldi D, Dosio F. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: A critical review. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:5289–311.
5. Zulfiqar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today [Internet].* 2017;22(10):1516–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>
6. No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop [Internet].* 2016;155:113–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.016>
7. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. *Society.* 2006;19(1):111–26.
8. Allhoff F. The coming era of nanomedicine. *Am J Bioeth.* 2009;9(10):3–11.
9. Dilnawaz F, Acharya S, Sahoo SK. Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. *Int J Pharm [Internet].* 2018;(January). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731830022X>
10. Ventola CL, Bharali DJ, Mousa SA. The Nanomedicine Revolution: Part 1: Emerging Concepts. *Pharmacy and Therapeutics. Pharmacol Ther [Internet].* 2010;128(9):512–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725810001506>
11. Chaudhury K, Kandasamy J, Kumar H S V, RoyChoudhury S. Regenerative nanomedicine: current perspectives and future directions. *Int J Nanomedicine [Internet].* 2014;Volume 9(1):4153. Available from: <http://www.dovepress.com/regenerative-nanomedicine-current-perspectives-and-future-directions-peer-reviewed-article-IJN>
12. Rojas-aguirre Y. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ Química.* 2016;27:286–91.
13. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2013;65(1):36–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
14. De Almeida L, Fujimura AT, Del Cistia ML, Fonseca-Santos B, Imamura KB, Michels PAM, et al. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis-a review. *J Biomed Nanotechnol.* 2017;13(2):117–33.
15. Gangneux JP, Sulahian A, Garin YJ, Farinotti R, Derouin F. Ther-apy of visceral

- leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 40: 1214-8. 1998;
16. Sundar S, Agrawal G, Rai M, Makharia MK, Murray HW. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomized trial. *B M J* 2001; 323: 419-22. 2001;
  17. Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G. Treatment of pediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 26-30. 2005;
  18. Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agrawal N, Vaillant M, et al. New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single-Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short-Course Oral Miltefosine. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008;47(8):1000–6. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/591972>
  19. Sundar, Shyamgarwal D, Rai M, Murray HW. for Visceral Leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. 2010;362(2):504–12.
  20. Romero GAS, Costa DL, Costa CHN, de Almeida RP, de Melo EV, de Carvalho SFG, et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):1–25.
  21. Sarkar S, Mandal S, Sinha J, Mukhopadhyay S, Das N, Basu M. Quercetin: critical evaluation as an antileishmanial agent in vivo in hamsters using different vesicular delivery modes. *J Drug Target* 2002; 10: 573-8.
  22. Cauchetier E, Paul M, Rivollet D, Fessi H, Astier A, Deniau M. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2000; 30: 777-83.
  23. Papagiannaros A, Bories C, Demetzos C, Loiseau P. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 545-50. 2005;
  24. Montanari J, Maidana C, Esteva MI, Salomon C, Morilla MJ, Romero EL. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. *J Control Release* 2010; 147: 368-76.
  25. Mazumder S, Ravindran R, Banerjee A, Ali N. Non-coding pDNA bearing immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vac*.