

# Adaptabilidad y fracaso terapéutico en Leishmania.

MARITZA PADRÓN-NIEVES<sup>1</sup>, WILMER ALCÁZAR<sup>2</sup>, ALICIA PONTE-SUCRE<sup>3</sup>.

## Resumen:

La adaptabilidad de un agente patógeno involucra procesos biológicos que aseguran su supervivencia, reproducción y transmisión al siguiente hospedero. El tratamiento farmacológico promueve la selección de los organismos más flexibles capaces de sobrevivir en estas condiciones. En este contexto el fracaso terapéutico es un fenómeno complejo y multifactorial no siempre vinculado exclusivamente a la resistencia a fármacos del parásito infectante, adicionalmente los determinantes de la flexibilidad de Leishmania pueden condicionar este fracaso y modular la expresión de la quimio-resistencia. De allí la importancia de la información clínica detallada sobre el paciente, su estado inmunológico y factores relacionados que afectan la relación hospedero-parásito, la cinética de la infección, la progresión de la enfermedad y el éxito del tratamiento.

**Palabras clave:** adaptabilidad, quimio-resistencia, Leishmania, fracaso terapéutico, determinantes, costo de adaptación.

## *Adaptability and therapeutic failure in Leishmania*

## Abstract:

The fitness of a pathogen involves biological processes that ensure its survival, reproduction and transmission to the next host. Chemotherapy promotes the selection of the most adaptable instead organisms capable of surviving under stress conditions. In this context, therapeutic failure is a complex and multifactorial phenomenon not always exclusively linked to drug resistance of the infecting parasite; additionally, determinants of the adaptability of Leishmania may affect or determine this phenomenon and modulate the expression of the chemo-resistance. Hence the importance of detailed clinical information about the patient, their immunological status and related factors affects the host-parasite relationship, infection kinetics, disease progression and treatment success.

**Key words:** Fitness, chemo-resistance, Leishmania, therapeutic failure, determinants, cost of adaptation.

1. Profesor Asociado, Jefe de Cátedra de Farmacología y Toxicología. Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental. Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
2. Licenciado. Estudiante de Postgrado del Doctorado de Farmacología de la Facultad de Farmacia. Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
3. Profesor Titular de la Cátedra de Fisiología Humana. Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

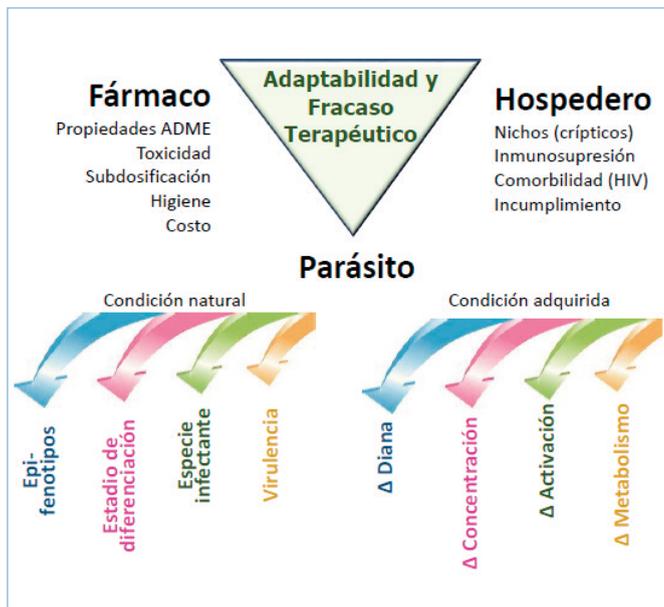
Autor para Correspondencia:  
Alicia Ponte-Sucre  
aiponte@gmail.com

## Introducción

La adaptabilidad (fitness en inglés) de un agente patógeno involucra procesos biológicos que aseguran su supervivencia, reproducción y transmisión al siguiente hospedero. El tratamiento farmacológico promueve la selección de los organismos más flexibles capaces de sobrevivir en estas condiciones. Esta situación representa un costo; los parásitos quimio-resistentes son menos aptos que sus homólogos de tipo silvestre. En el caso de la leishmaniasis, el fracaso terapéutico es detectado en pacientes tratados con la mayoría de los medicamentos de primera línea<sup>1-7</sup>. Este fracaso no siempre está vinculado a la resistencia a fármacos del parásito infectante; adicionalmente existen determinantes de la flexibilidad de *Leishmania* que condicionan este fracaso y modulan la expresión de esta quimio-resistencia. En esta revisión se discutirán algunos de esos factores.

La adaptabilidad fue inicialmente descrita en virus como su capacidad para sobrevivir, reproducirse e infectar exitosamente. En *Leishmania* se podrían formular dos interrogantes al respecto: ¿Está relacionado con su competencia dentro del hospedero, o se relaciona con su infectividad hacia el hospedero?<sup>8</sup>

Como se menciona en el párrafo anterior, esta revisión está dedicada a examinar algunos de los determinantes de esta adaptabilidad de *Leishmania* y su vinculación al fracaso terapéutico; los mismos se resumen en la figura 1.



**Figura 1.** En esta figura se ilustran algunos de los determinantes de la adaptabilidad de *Leishmania* y su vinculación al fracaso terapéutico. Δ = cambio en la función reseñada.

## Epi-fenotipos y Fracaso Terapéutico

A fin de sobrevivir como población, el parásito infectante no debería (al menos teóricamente) matar a su anfitrión. En este sentido *Leishmania* constituye un ejemplo inadecuado puesto que el espectro de la enfermedad desde la visceral (LV, letal si no se trata) hasta la cutánea localizada (LCL, auto limitante en algunos casos) no se traduce en todas las oportunidades en una coexistencia armoniosa entre los hospederos y los parásitos<sup>9</sup>.

En el extremo letal para su hospedero se ubica la infección causada por *L. (L.) donovani*. De hecho, aislados de parásitos, de pacientes con LV, infectados con esta especie, que presentan fracaso terapéutico a antimoniales, exhiben una adaptabilidad e infectividad acorde con una patogenicidad, virulencia y/o capacidad de transmisión mayor que sus contrapartes silvestres<sup>10</sup>.

En el otro extremo -no-letal para su hospedero- se ubican las especies que causan la Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA). Por ejemplo, pacientes de Perú infectados con *L. (V.) guyanensis*, responden mejor a los antimoniales que los pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis*. Lo opuesto ocurre en pacientes de Brasil. Por otra parte, pacientes con Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) venezolanos, infectados con *L. (L.) amazonensis* o *L. (L.) mexicana* responden pobremente a los antimoniales<sup>11-14</sup>.

Curiosamente, se han referido aislados de *L. (V.) braziliensis* naturalmente resistentes a los antimoniales, incluso antes del inicio del tratamiento, a pesar de que probablemente nunca han estado en contacto con los fármacos<sup>10</sup>. El análisis exhaustivo de esta situación ha llevado a postular que, a pesar de que los contextos epidemiológicos y genéticos son diferentes entre ambas especies, los hallazgos descritos en *L. (V.) braziliensis*, pudieran analizarse bajo un razonamiento similar a los relativos a *L. (L.) donovani*. Es decir, que la contribución del parásito al fracaso terapéutico, no sólo podría corresponder a la expresión de resistencia a drogas, y que la existencia de fenotipos adicionales (denominados epi-fenotipos) podrían ser determinantes para el fenómeno de fracaso terapéutico. Estos fenotipos no son necesariamente fáciles de identificar en los sistemas experimentales disponibles y por lo tanto, es necesario describir para ellos marcadores celulares específicos fáciles de evaluar en el laboratorio clínico, situación que desafía la visión clásica de la forma como se identifican los factores responsables de ese fracaso terapéutico<sup>8, 10, 15-17</sup>.

De hecho, el fracaso terapéutico puede definirse como un fenotipo clínico. En él, el paciente no mejora al final de un tratamiento (ausencia de respuesta), o los síntomas clínicos reaparecen después de la curación inicial (recaída). En este contexto puede ocurrir que los términos "resistencia clínica" y fracaso

terapéutico se usen como sinónimos, lo cual aumenta la ambigüedad de los significados. La resistencia a drogas por su parte, es una característica intrínseca de parásitos, que expresan una susceptibilidad significativamente menor frente a un fármaco que el de sus homólogos susceptibles. Es un rasgo adaptativo que aumenta su frecuencia de aparición y se propaga en una población de parásitos al ser expuestos al fármaco. A diferencia de la tolerancia al fármaco (característica innata debido a las propiedades metabólicas intrínsecas de algunas especies o etapas de la vida), la resistencia a drogas se expresa en un paciente, pero el fenotipo asociado debe evaluarse experimentalmente en parásitos aislados de la lesión<sup>18-21</sup>.

Los epi-fenotipos podrían o no estar directamente relacionados con la resistencia a drogas. Sin embargo, existen adaptaciones de los parásitos que contribuyen al fracaso terapéutico, incluso en ausencia de la resistencia clásica a drogas, y que podrían involucrar modificaciones en la virulencia o la existencia de espacios crípticos donde se alojan los parásitos. Esto significa que los ensayos *in vitro* estándar de susceptibilidad a los fármacos no siempre son útiles para detectar los epi-fenotipos y que el entorno del paciente (inmunología, nutrición, infecciones concomitantes) pudieran ser cruciales en la definición y detección de esos fenotipos.

Esto implica que el estudio de los fenotipos relacionados con fracaso terapéutico es cardinal, pero que prevenir su aparición lo es más aún. Por ejemplo, hallazgos recientes sugieren que en niños sub-expuestos a miltefosina se presenta una consecuente mayor tasa de fracaso terapéutico, lo que impele la necesidad de afinar los estudios farmacocinéticos en las etapas preclínicas del desarrollo de drogas. En otro sentido, existen evidencias de que el estado nutricional del paciente podría modular la probabilidad de infección inicial y de recaída; de hecho, se ha demostrado que el aumento de la ingesta de colesterol protege contra la infección por *L. (L.) donovani* y facilita su eliminación intracelular. Finalmente, los estudios preclínicos deberían incluir regímenes de combinación de drogas, unas dirigidas hacia el parásito, otras activadoras de la célula hospedera, y evaluar clínicamente su efecto<sup>10, 22-24</sup>. Es decir, que la investigación multidisciplinaria, transdisciplinaria y traslacional son cruciales para identificar alternativas de terapia y garantizar la eficacia de la misma.

### Estudios *in vitro* vs estudios *in vivo*

A pesar de que los antimoniales son los fármacos para los cuales se han definido mejor los conceptos de fracaso terapéutico y resistencia a drogas, en pacientes inmuno-competentes infectados con *Leishmania*, estudios realizados con *L. (L.) donovani* y *L. (V.) braziliensis* comparando la susceptibilidad de amastigotes

intracelulares aislados de pacientes con fracaso terapéutico, antes y después del tratamiento, arrojan resultados poco concluyentes, incluso después de 12 meses de seguimiento<sup>18</sup>.

Esto sugiere que las pruebas de susceptibilidad actuales son predictores pobres del resultado del tratamiento e implica un desafío a la visión tradicional de los parasitólogos sobre los estudios a realizar para identificar los factores parasitarios que contribuyen al fracaso terapéutico, especialmente a la luz del hecho de que clásicamente, estos estudios se realizan en las denominadas "cepas de laboratorio", aisladas hace décadas, adaptadas a condiciones experimentales de cultivo y parásitos que no necesariamente son de la zona geográfica de interés. Es decir, cada vez con mayor fuerza cobra sentido que es fundamental utilizar parásitos aislados recientemente y de la región endémica de interés<sup>25</sup>.

Aunado a ello no se puede dejar de mencionar cuán importante es utilizar amastigotes intracelulares en estos estudios, al ser ellos las formas celulares expuestas al fármaco, al menos en el hospedero mamífero, vs los estudios en promastigotes, donde el tratamiento del hospedero y los resultados encontrados en cuanto a resistencia a drogas podrían ser divergentes. Idealmente, los fenotipos promastigotes deben ser estudiados en el insecto vector.

De hecho, los estudios realizados en promastigotes o amastigotes axénicos son fundamentales para identificar las dianas de un fármaco y los mecanismos celulares que modulan su expresión en parásitos cultivados bajo la presión de la droga; sin embargo, este modelo experimental carece de la célula hospedera y adolece de este elemento crucial en la supervivencia del parásito, en presencia (o ausencia) de medicamentos. Su inclusión es esencial para comprender cabalmente la acción de la droga y los mecanismos de adaptación parasitaria que afectan su propia supervivencia y persistencia (nichos) en el hospedero.

Otros elementos fundamentales de considerar para la realización de estas evaluaciones son el tipo de célula hospedera que se está utilizando, los nichos en los cuales los parásitos se esconden, el entorno inmunológico determinante y determinado del paciente, etc. Todo este panorama pone en evidencia la complejidad del modelo y cómo la simplificación del mismo impone una visión parcializada de la globalidad de la enfermedad.

Por ello, es necesario cuestionar la relevancia de los estudios clásicos realizados con cepas de laboratorio aisladas hace varias décadas ya descritas. No puede negarse que los mismos han sido fundamentales para definir en ambientes controlados los mecanismos fisiológicos que se disparan al inducir quimio-resistencia *in vitro* en una población de *Leishmania*. Sin embargo, enfatizamos que su utilidad clínica necesita ser

corroborada en aislados de pacientes de regiones endémicas con fracaso terapéutico<sup>26-32</sup>.

Por ejemplo, parásitos resistentes a antimoniales reducen su exposición al medicamento al manipular la fisiología de las células hospederas, lo cual implica que ésta (la célula hospedera) es un jugador estrella en la relación parásito-hospedero<sup>9</sup>. Los modelos *in vivo* permiten a los parásitos ejercer plenamente sus habilidades de manipulación del hospedero y viceversa. Sin embargo, los modelos animales tampoco son tan sencillos. Los ratones se utilizan debido a la pureza de las cepas manipuladas genéticamente<sup>10</sup>, lo cual tampoco está tan cerca de la realidad que viven los pacientes. Por ello, la combinación de modelos estandarizados *in vitro* y ensayos *in vivo* son primordiales para discernir qué factores están en juego en escenarios de fracaso terapéutico e identificar marcadores celulares y moleculares de infectividad, éxito y quimio-resistencia<sup>26</sup>.

En conclusión, la diferenciación entre los fenotipos "verdaderos" relacionados con la resistencia a los fármacos y otros fenotipos que pueden afectar el resultado del tratamiento no será exitosa aplicando solo un modelo experimental anterior. La combinación de ensayos estandarizados *in vitro* e *in vivo* pareciera ser fundamental para diseccionar qué factores están en juego en diferentes focos de fracaso terapéutico.

### Nichos y fracaso terapéutico

Los parásitos (eucariotas) de *Leishmania* conviven con sus hospederos humanos desde hace milenios. Su flexibilidad le ha permitido invadir células exitosamente y desviar los mecanismos de "limpieza" de las mismas. Estos incluyen la muerte celular programada y la activación de la inmunidad celular. Un desafío adicional son los sistemas de vigilancia ejercidos por los receptores tipo Toll y los sistemas sensores intracelulares<sup>2</sup>. La persistencia puede depender de su capacidad de infectar tejidos (nichos) menos accesibles al sistema inmune y a las drogas. Los amastigotes permanecen en el sitio de infección (LCL), o migran al tegumento (leishmaniasis mucocutánea, LMC o diseminada, LD), o a las vísceras (LV) y pueden pasar desapercibidos. Además, invaden sitios distintos a los esperados (con capacidad restringida de eliminar los parásitos).

La presencia de ADN de *Leishmania* en el torrente sanguíneo, la orina y mucosas aparentemente sanas de pacientes con LC y LMC y de pacientes con LV y en la piel en la leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL) sugiere que este ADN debe provenir de amastigotes recién muertos, posiblemente alojados en nichos donde la infección puede re-activarse inesperadamente<sup>10, 33-35</sup>. La

LMC y la PKDL son ejemplos de recidivas que aparecen muchos años luego de la aparente curación. Los tejidos y órganos afectados en la LMC tienen buena perfusión (la mucosa), mientras que la piel (en PKDL), es un órgano menos perfundido. Esto sugiere que los nichos son focos críticos desde los cuales la infección podría extenderse de nuevo<sup>10, 36</sup>.

Incluso después de la curación, los parásitos pueden permanecer latentes; esto trae a colación la importancia de distinguir entre curación clínica y cura parasitológica, que no ocurre siempre. Tal es caso de la PKDL o la LCD, o en pacientes asintomáticos. Estos últimos son especialmente relevantes de estudiar puesto que ¿Por qué permanecen asintomáticos?, ¿Cuál es su contribución a la expansión de la enfermedad?, ¿Portan epi-fenotipos como los arriba descritos?.

### Estadios de diferenciación y fracaso terapéutico

Estudios recientes han demostrado que hay adaptaciones moleculares relacionadas con fracaso terapéutico que ya están presentes en los promastigotes, que viven en el insecto vector (*Lutzomyia* en el Viejo Mundo o *Phlebotomus* en el Nuevo Mundo). De hecho, aislados de *L. (L.) donovani* de pacientes con fracaso terapéutico y/o resistentes a presentar una mayor tasa de metacicloogénesis en experimentos *in vitro*<sup>37,38</sup>. Como la metacicloogénesis representa el proceso que permite a los promastigotes procíclicos no infecciosos diferenciarse a infecciosos, una metacicloogénesis aumentada es evidencia de un aumento de la infectividad<sup>37-40</sup>. Es interesante resaltar que en especies del Nuevo Mundo como *L. (L.) amazonensis* ocurre exactamente lo contrario, es decir que disminuye la metacicloogénesis en especies resistentes a drogas<sup>41</sup>. Esto sugiere que pre-adaptaciones en la mosca de la arena pueden conducir a un comportamiento diferencial en el hospedero. Por ejemplo, la metacicloogénesis aumentada equivale a una mayor infectividad y eventualmente una mayor carga parasitaria que a su vez podría modular de una forma más efectiva al sistema inmunitario impidiendo a los fármacos a eliminar el parásito<sup>42-47</sup>. Si lo contrario ocurre en el caso de las cepas del Nuevo Mundo no ha sido aún dilucidado. Estas pre-adaptaciones en el insecto vector pueden promover el fracaso terapéutico en el hospedero infectado puesto que los rasgos genotípicos y fenotípicos de los promastigotes pueden originar, por ejemplo, cambios en la afinidad de los parásitos por tejidos crípticos, donde los fármacos tienen menos acceso<sup>10, 47</sup>.

Por otro lado, hay evidencias que sugieren que los amastigotes podrían ser menos susceptibles a las drogas debido a su menor metabolismo. También se sugiere que en ellos ocurre una menor

transcripción y traducción, situación que coincide con el menor nivel de polisomas descrito en amastigotes axénicos. Además, cambios en el sistema inmune o el medio que rodea al tejido infectado, luego de varias rondas de tratamiento, podrían seleccionar parásitos específicos (con un estado metabólico optimizado, codificado en el genoma del parásito), que promuevan recidivas que no responden al tratamiento<sup>10, 48</sup>. Esto ha sido demostrado en *Mycobacterias* y podría eventualmente suceder en leishmaniasis<sup>49, 50</sup>.

### Especie infectante y fracaso terapéutico

En la LCA, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* conducen principalmente a formas tegumentarias de la enfermedad, y *L. (L.) infantum* a la enfermedad visceral. Esto sugiere que la especie constituye un predictor de la forma clínica de la enfermedad producida por *Leishmania*. Sin embargo, la susceptibilidad de pacientes infectados con distintas especies, en los diferentes contextos geográficos, a los antimoniales es muy diverso (Perú- *L. (V.) guyanensis* > susceptibilidad, *L. (V.) braziliensis* < susceptibilidad vs. Brasil- *L. (V.) guyanensis* < susceptibilidad, *L. (V.) braziliensis* > susceptibilidad, Venezuela LCD infectados con *L. (L.) amazonensis* o *L. (L.) mexicana* no responden a los antimoniales), lo cual evidencia el papel desempeñado por la susceptibilidad natural de las especies a las drogas<sup>10, 36</sup>. En este sentido es relevante mencionar que en LCA, los parásitos del subgénero *Viannia* pueden estar infectados por un virus específico (*Leishmania* ARN del virus-1, o LRV1), que en pacientes deteriora la respuesta inmune y promueve la persistencia del parásito. No se conoce la prevalencia de los virus en la clínica de *L. (V.) braziliensis*, su asociación con la metástasis hacia LMC y el resultado del tratamiento. Tampoco se conoce la influencia de esta endosimbiosis viral en la biología y la genómica del parásito, ni su influencia en la adaptabilidad del parásito<sup>10</sup>.

### HIV y fracaso terapéutico

Un factor que está cambiando la naturaleza de la infección humana, la respuesta al tratamiento y la epidemiología de la leishmaniasis en África, Europa y Brasil es la probabilidad de coinfección entre VIH y leishmaniasis. Los pacientes con VIH están inmuno-suprimidos y el tratamiento de LV necesita un tratamiento largo; los pacientes coinfectados tienen mayor riesgo de recaída y son propensos a desarrollar resistencia a los medicamentos. La supresión del sistema inmunológico por el VIH exacerba la situación. Los pacientes coinfectados tienen mayor carga parasitaria y respuesta inmune débil o ausente, y responden lentamente al tratamiento con los antimoniales. Su cura clínica no se correlaciona

con la eliminación del parásito; alrededor del 60% de los pacientes tratados con cualquier fármaco contra *Leishmania* muestra recidivas y resistencia secundaria al cabo de 1 año. Además, el *Phlebotomus ariasi*, común en el sur de Europa, se infecta experimentalmente con pacientes coinfectados por VIH. Sin embargo, los pacientes con LV no son infecciosos para este vector. Este hecho prende las alarmas en cuanto al concepto de los pacientes coinfectados como reservorio humano para la epidemiología de la enfermedad en el sur de Europa, con el agravante de la potencial aparición de resistencia a los medicamentos<sup>47</sup>.

### Virulencia, inmunidad y fracaso terapéutico

Durante su ciclo de vida *Leishmania* oscila entre dos estadios de diferenciación (amastigotes y promastigotes) y al menos, entre dos hospederos, el insecto vector y el mamífero. La interacción parásito-hospedero es el espacio en el cual se consolida el éxito de la transmisión e infección al siguiente hospedador. La virulencia es uno de los principales elementos involucrados y es un marcador de adaptabilidad cuya expresión constituye el mecanismo por excelencia que garantiza la "supervivencia de los mejores" y la transmisión exitosa. Se espera que las poblaciones parasitarias expresen nuevos niveles de virulencia como resultado de la terapia farmacológica<sup>51</sup>.

Subsiguiente a la picada de la mosca de la arena, parásitos y componentes de la saliva son inoculados en la piel del hospedero y los parásitos invaden las células de mamífero. *Leishmania* interactúa con diversos receptores de superficie de sus células hospederas y esta interacción desencadena actividades fagocíticas que permiten el acceso de *Leishmania* a ellas. Este contacto modula las etapas críticas de la infección en función de la especie infectante. Posteriormente a la interacción parásito-hospedero, el promastigote se transforma en amastigote y eventualmente el sistema inmune es activado con el fin de controlar la infección<sup>51, 52</sup>.

A este acto, sucede lo siguiente: o el sistema inmune del hospedero controla con éxito la infección, o la infección se hace patente y evoluciona a leve o grave. Los amastigotes son formas parasitarias inmóviles, esféricas, con un cinetoplasto en forma de barra y un flagelo rudimentario, derivado del cuerpo basal. Viven paradójicamente en el interior de las células que constituyen la principal defensa contra la invasión de organismos patógenos.

Las células hospederas de *Leishmania* incluyen macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Después de la infección inicial, los neutrófilos (NT) son reclutados al sitio de la picadura y la supervivencia del parásito en estas células determina su destino. En

los NT los parásitos establecen vacuolas que no se fusionan a los lisosomas; esto provee un entorno protector para la supervivencia, más no para la replicación. Con el avance de la infección, menos neutrófilos y más macrófagos son infectados<sup>10</sup>.

El parásito manipula la función celular; i.e., los amastigotes modulan la función de las células hospederas e inhiben la producción de superóxido y de óxido nítrico por macrófagos infectados y su activación por el interferón- $\gamma$ . Previenen la acción de la interleucina (IL)-12. Los macrófagos infectados producen citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  o IL-1, o citocinas moduladoras como IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ . Incluso, las formas clínicas de la enfermedad se asocian a perfiles específicos de macrófagos y monocitos formados en el ambiente inflamatorio desencadenado por la activación de la respuesta inmune. Es decir, el medio intracelular se transforma en un espacio de protección donde la respuesta adaptativa del parásito se expresa en su potencial patogénico y los amastigotes utilizan los procesos celulares para consolidar la infección<sup>10</sup>.

El sistema inmune es determinante en el resultado final de la enfermedad. De hecho, en algunos casos de LV ocurre al cabo de los años una recidiva, la PKDL. La presencia de células T reguladoras y su reclutamiento selectivo a los sitios infectados juegan un papel crítico en la persistencia de la carga parasitaria residual. Esta situación puede traducirse en una recaída de la enfermedad visceral o en el desarrollo de la PKDL<sup>10</sup>.

Más aún, la quimioterapia con antimoniales necesita un sistema inmune competente para ejercer su acción. Al disminuir la carga parasitaria, el sistema inmune puede retomar el control y montar la respuesta efectiva. La miltefosina, el medicamento alternativo por excelencia contra la LV no requiere un sistema inmune potente para ejercer plenamente su acción, pero activa el mismo en los pacientes con esta enfermedad<sup>52</sup>.

### Fármacos, higiene y fracaso terapéutico

En otro sentido, amen que los medicamentos y factores del hospedero y del parásito contribuyen al resultado final, la leishmaniasis del Viejo Mundo tiene una respuesta terapéutica más homogénea, excepto aquella causada por *L. (L.) aethiopica*. En el Nuevo Mundo la respuesta al tratamiento en pacientes infectados difiere significativamente. Las mismas pueden llegar a ser impredecibles y reflejan la complejidad multifactorial de la enfermedad. Es decir, que las pautas de tratamiento deben ser reevaluadas sobre una base global, teniendo en cuenta las diferencias entre el Viejo y Nuevo Mundo. Por su parte, la escasa

calidad y los niveles inadecuados (propiedades de administración, distribución, metabolismo y eliminación) de los compuestos activos en los medicamentos son la consecuencia inevitable de la impropia regulación local de las compañías farmacéuticas y la falta de buenas prácticas de manufactura en muchos países. Los fármacos con concentraciones inferiores a las necesarias condicionan una mala respuesta al tratamiento, fomentan la selección de patógenos que tienen la ventaja para sobrevivir, constituyen un factor positivo para la selección de parásitos resistentes presentes en un paciente y aumentan el riesgo de propagación de estos agentes patógenos resistentes a los fármacos<sup>26</sup>.

Finalmente, las menesterosas medidas de higiene y control de la transmisión en el mundo en vías de desarrollo, el espacio natural para la leishmaniasis, conducen a la inconveniente disposición y eliminación de los medicamentos en las clínicas y hospitales. Esto constituye una amenaza debido a la existencia de genes de resistencia en la microflora humana y en los suelos, que podrían servir como donantes para la transferencia de genes a los patógenos, mediante la transferencia horizontal de genes<sup>26,53</sup>. La contaminación ambiental constituye un factor de riesgo adicional. Por ejemplo, hay regiones de la India donde la incidencia de LV se considera hiperendémica. En estas áreas se ha descrito una correlación positiva entre la ocurrencia de fracaso terapéutico a los antimoniales y la contaminación por arsénicos de las aguas aptas para consumo humano o potable<sup>54</sup>. El arsénico es un metaloide químicamente parecido al antimonio y la naturaleza de esta superposición de eventos es llamativa<sup>9</sup> y aún hoy en día existe escasa información relacionada a estos temas. De más está decir que no podemos excluir la relevancia que estos mecanismos podrían tener en el tema aquí tratado<sup>26,54</sup>.

### Conclusión y perspectivas

Lo planteado a lo largo de esta revisión implica que los factores determinantes que contribuyen al éxito o no del tratamiento deben incluir la resistencia por parte de los parásitos a los medicamentos como responsable (parcial) del fracaso del tratamiento, pero que es fundamental tomar en cuenta factores, inherentes al parásito, al hospedero, al ambiente e incluso a las características de los fármacos y del sistema de salud local que se está evaluando. Todo ello nos lleva a concluir que el fracaso terapéutico es un fenómeno extremadamente complejo y fundamental de evaluar desde diversos ángulos.

Se han discutido los determinantes de la flexibilidad de *Leishmania* que condicionan el fracaso terapéutico en pacientes que sufren de leishmaniasis. Estos determinantes evidencian que el fracaso terapéutico es un fenómeno multifactorial. De allí la

importancia de la información clínica detallada sobre el paciente, su estado inmunológico y factores relacionados que afectan la relación hospedero-parásito, la cinética de la infección, la progresión de la enfermedad y el éxito del tratamiento●

### Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico UCV (CDCH-UCV PG-09-7378-2008; CDCH-UCV PI-09-8717-2013; CDCH-UCV PI-09-8717-2013, al Consejo Alemán de Investigación y Desarrollo (DFG), a la Fundación Alejandro de Humboldt, Alemania.

### Referencias

- Rijal S, Ostyn B, Uranw S, et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin Infect Dis*. 2013;56:1530-8.
- Anabwani GM, Ngira JA, Dimiti G, Bryceson AD. Comparison of two dosage schedules of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Lancet*. 1983;1:210-3.
- Thakur CP, Kumar M, Pandey AK. Evaluation of efficacy of longer durations of therapy of fresh cases of kala-azar with sodium stibogluconate. *Indian J Med Res*. 1991;93:103-10.
- Prata A. Treatment of kala-azar with amphotericin B. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1963;57:266-8.
- Giri OP. Treatment of visceral leishmaniasis unresponsive to pentamidine with amphotericin B. *J Assoc Phys India*. 1994;42:688-9.
- Obonaga R, Fernández OL, Valderrama L, Rubiano LC, Castro Mdel M, Barrera MC, Gomez MA, Gore SaraviaN. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):144-52. doi: 10.1128/AAC.01023-13. Epub 2013 Oct 21.
- Utaile M, Kassahun A, Abebe T, Hailu A. Susceptibility of clinical isolates of *Leishmania aethiopica* to miltefosine, paromomycin, amphotericin B and sodium stibogluconate using amastigote-macrophage in vitro model. *Exp Parasitol*. 2013 May;134(1):68-75. doi: 10.1016/j.exppara.2013.01.022. Epub 2013 Feb 19.
- Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, et al. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29: 637-42.
- Vanaerschot M, Decuyper S, Berg M, et al. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness, can medicines boost pathogens? *Crit Rev Microbiol*. 2013; 39:384-94.
- Vanaerschot M, Dumetz F, Roy S, et al. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi) phenotype? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12:937-46.
- Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with american tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007;195:1846-51.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:456-65.
- Zerpa O, Convit J. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Gaz méd Bahia*. 2009; 79:30-34.
- Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol*. 2007;156:1328-35.
- Padrón-Nieves M, Machuca C, Díaz E, et al. Correlation between glucose uptake and membrane potential in *Leishmania* parasites isolated from DCL patients with therapeutic failure: a proof of concept. *Parasitol Res*. 2014;113:2121-8.
- Ponte-Sucre A. Leishmaniasis, the biology of a parasite. In: Ponte-Sucre A, Padron Nieves M (eds) *Drug Resist. Leishmania parasites. Consequences, Mol. Mech. possible Treat*. Springer Verlag Wien, 2013.p.1-12.
- Padron-Nieves M, Ponte-Sucre A. Marcadores de resistencia en *Leishmania*: susceptibilidad in vitro a drogas leishmanicidas vs. retención de calceína en aislados de pacientes venezolanos con leishmaniasis cutánea difusa. *Arch Venez Farmacol y Ter*. 2015;32:29-33.
- Yardley V, Croft SL, De DS, et al. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:272-75.
- Vermeersch M, da Luz RI, Tote K, et al. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3855-59.
- Rijal S, Yardley V, Chappuis F, et al. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of in vivo therapy outcome? *Microbes Infect*. 2007;9:529-35.
- Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, et al. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 2006;194:1168-75.
- Dorlo TP, Huitema AD, Beijnen JH, et al. Optimal dosing of miltefosine in children and adults with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:3864-72.
- Ghosh J, Das S, Guha R, et al. Hyperlipidemia offers protection against *Leishmania donovani* infection: role of membrane cholesterol. *J Lipid Res*. 2012;53:2560-72.
- Ghosh J, Guha R, Das S, et al. Liposomal cholesterol delivery activates the macrophage innate immune arm to facilitate intracellular *Leishmania donovani* killing. *Infect Immun*. 2014;82:607-17.
- Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, et al. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Trop Med Int Health*. 2008;1:1272-76.
- Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M. The concept of fitness and drug resistance in *Leishmania*. En Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M, editores, *Drug resistance in Leishmania parasites. Consequences, Molecular Mechanisms, and possible treatments*. SpringerVerlagWien. 2013;p.431-49.
- Gupta S. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res*. 2011;133:27-39.
- Seifert K, Escobar P, Croft SL. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother*.2010;65:508-511.
- Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*. 2005;38:147-60.
- Alcolea PJ, Alonso A, Gomez MJ, et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. *Int J Parasitol* 2010 ;40 :1497-1516.
- Michel G, Ferrua B, Lang T, et al. Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1323.
- Biyani N, Madhubala R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824:1342-50.
- Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1:385-9.
- Veland N, Espinosa D, Valencia BM, et al. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:556-61.
- Figuerola RA, Lozano LE, Romero IC, et al. Detection of *Leishmania* in uninfected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Infect Dis*.2009;200:638-46.
- Zerpa O, Ponte-Sucre A. American tegumentary leishmaniasis. En Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M, editores, *Drug resistance in Leishmania parasites. Consequences, Molecular Mechanisms, and possible treatments*. Springer Verlag Wien. 2013; p. 199-211.
- Rai K, Cuypers B, Bhattarai NR, et al. Relapse after treatment with miltefosine for visceral leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting *Leishmania donovani* strain. *MBio*. 2013;4:e00611-e00613.
- Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, et al. Increased metacyclogenesis of

- antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology*. 2011;138:1392-99.
39. Vanaerschot M, Maes I, Ouakad M, et al. Linking in vitro and in vivo survival of clinical *Leishmania donovani* strains. *PLoS One* 2010;5:e12211.
  40. Vanaerschot M, De DS, Rijal S, et al. Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased in vivo parasite burden. *PLoS One*. 2011;6:e23120.
  41. Silva N, Camacho N, Figarella K, et al. Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in a strain resistant to an ABC-transporter blocker. *Parasitology*. 2004;128:629-34.
  42. Alves CF, de Amorim IF, Moura EP, et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128:349-58.
  43. Manna L, Reale S, Vitale F, et al. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*. 2009;87:76-8.
  44. Rijal S, Bhandari S, Koirala S, et al. Clinical risk factors for therapeutic failure in kala-azar patients treated with pentavalent antimonials in Nepal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104:225-29.
  45. Thakur CP, Mitra DK, Narayan S. Skewing of cytokine profiles towards T helper cell type 2 response in visceral leishmaniasis patients unresponsive to sodium antimony gluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:409-12.
  46. Verma S, Kumar R, Katara GK, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2010;5:e10107.
  47. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:334-59.
  48. Bogdan C, Donhauser N, Doring R, et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med*. 2010;191:2121-30.
  49. Fauvart M, De Groot VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol*. 2011;60:699-709.
  50. Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, et al. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. *Science*. 2013; 339:91-5.
  51. Ponte-Sucre A. Leishmaniasis, the biology of a parasite. En Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M, editores, Drug resistance in *Leishmania* parasites. Consequences, Molecular Mechanisms, and possible treatments. Springer Verlag Wien. 2013; p.1-12.
  52. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*. 2014;36:367-76.
  53. Newton PN, Green MD, Fernández FM (2010) Impact of poor-quality medicines in the "developing" world. *Trends Pharmacol Sci* 31:99-101.
  54. Perry MR, Wyllie S, Prajapati VK, et al. Visceral leishmaniasis and arsenic: an ancient poison contributing to antimonial treatment failure in the Indian subcontinent? *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1227.
-