



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

## Informe Final de Actividades Servicio Social

Laboratorio de Inmunobioquímica Molecular y  
Cardiopatías de la Unidad de Investigación  
UNAM-INC

Licenciatura en Química farmacéutica  
biológica

Presenta

**Pedro Zuriel Cruz Bautista**

Tutores

Interno: **Dra. Laura Estela Castrillón Rivera**  
Externo: **Dra. María Magdalena Aguirre García**

Mayo-noviembre 2023

---

DRA. MA. MAGDALENA  
AGUIRRE GARCÍA

---

DRA. LAURA ESTELA  
CASTRILLÓN RIVERA

## Contenido

<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>3</b>
<b>Marco teórico</b> .....	<b>5</b>
Leishmaniasis .....	5
Epidemiología .....	6
Vectores.....	12
Fármacos antileishmaniales de uso clínico.....	14
Desarrollo de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis .....	16
Moduladores selectivos de los receptores de estrógeno .....	18
Antimicóticos con actividad antileishmanial .....	20
Antecedentes.....	21
<b>Método</b> .....	<b>22</b>
Comparativa de la capacidad leishmanicida del clomifeno y el tamoxifeno en <i>Leishmania infantum</i> .....	22
Comprobación <i>in vivo</i> de la capacidad antileishmanial de la amorolfina .....	23
<b>Resultados</b> .....	<b>28</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>38</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>43</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>44</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad producida por protozoos del género *Leishmania*, de infección intracelular (macrófagos), caracterizada por provocar lesiones viscerales, cutáneas y mucosas, transmitida por la picadura de insectos de la familia *Phlebotomidae* de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Se presenta tanto en humanos como en animales, por lo que es considerada una zoonosis. (Fleta Zaragoza, 2001)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona a la leishmaniasis como un importante problema de salud en 4 regiones ecoepidemiológicas del mundo: las Américas, África Oriental, África del Norte y Asia Occidental y Sudoriental. Se estima que cerca de 12 millones de personas padecen alguna forma de la enfermedad y cada año mueren alrededor de 30 mil pacientes con leishmaniasis visceral (LV).

La presencia de este padecimiento se ve ligada directamente a la pobreza, haciendo un ciclo de enfermedad-pobreza que se ve retroalimentado debido al costo del tratamiento y el difícil acceso a la atención médica. Las condiciones habitacionales precarias, la poca capacidad para controlar la propagación del vector y un mayor número de reservorios generan una exposición activa que termina en la infección de personas sanas, haciendo de los sectores pobres una población vulnerable. (Organización Mundial de la Salud, 2023)

Hasta la fecha, no se han desarrollado vacunas efectivas y seguras para prevenir esta enfermedad. Los tratamientos disponibles son costosos, tóxicos y muestran una eficacia limitada. Además, el problema se ve agravado con el desarrollo de resistencia parasitaria a los medicamentos usado como primera línea de acción. (Sifontes, 2017) En esta estancia de servicio social, se evaluaron la actividad antileishmanial de dos fármacos mediante ensayos biológicos y la revisión bibliográfica disponible.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis puede ser causada por más de 20 especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania* y se conocen más de 90 especies de flebótomos que transmiten el parásito. La leishmaniasis es endémica de 99 países al año, se estiman entre 700 000 y 1 millón de nuevos casos, aunque esta cifra es solo un acercamiento a la realidad, solo una fracción de los casos son reportados lo que puede llegar a desencadenar brotes.

De los reportes anuales, de entre 50 000 y 90 000 casos corresponden a LV sin tratamiento el 95% de los casos es mortal. La leishmaniasis cutánea (LC) es aquella con mayor prevalencia, cerca de un millón de pacientes enfermos al año, aunque solo se reportan 200 000. La forma mucocutánea puede provocar la destrucción parcial o total de las mucosas de la nariz, boca y garganta. (Organización Mundial de la Salud, 2023)

En México durante 2019, se reportaron 1014 contagios de LC, sin embargo, en 2020 solo se presentaron 324 casos. Se estima que la incidencia se ha visto directamente afectada por la pandemia de COVID-19, debido a que las acciones de búsqueda activa, detección temprana y tratamiento de los casos se vieron pausadas, así como en ciertas actividades de campo. (Secretaría de Salud de México, 2022)

Del 100% de los casos de leishmaniasis en México, 99% son de leishmaniasis cutánea localizada (LCL) mientras el 1% de LV, sin embargo, todos los pacientes con esta manifestación terminan en la defunción.

La mayoría de los medicamentos disponibles para la leishmaniasis son muy antiguos y presentan una elevada toxicidad; su administración debe ser prolongada y dolorosa; lo que ha llevado a que los pacientes abandonen los tratamientos, generando resistencia parasitaria y una disminución progresiva en la efectividad de los fármacos disponibles. (Danilo C., 2008) (Organización Mundial de la Salud, 2023) Por todo esto, la búsqueda de nuevos esquemas terapéuticos y el desarrollo de principios activos más seguros es una tarea indispensable. (Adriano C. Coelho, 2015).

La leishmaniasis es considerada una enfermedad olvidada del tercer mundo, el avance sobre su tratamiento debe ser considerando los recursos limitados y la población a la que va dirigida, por lo que, el reposicionamiento de fármacos resulta una alternativa económica y eficaz. (Sifontes, 2017) Un ejemplo de esto, es el tamoxifeno, el cual es un anticancerígeno el cual ha comprobado ser efectivo como leishmanicida o los antimicóticos, que han sido estudiados por su capacidad para combatir la *Leishmania*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria transmitida por vectores y causada por un protozoo intracelular flagelado perteneciente al género *Leishmania*, que engloba más de 20 especies. Típicamente, esta enfermedad afecta a poblaciones en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. La transmisión de la enfermedad ocurre a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (América), y del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África). (Allan Ching Chacón, 2022)

##### 3.1.1 Ciclo vital de la leishmaniasis

El ciclo de la enfermedad inicia con la picadura del hospedero mamífero por un vector hembra infectado. Durante la picadura, los parásitos son inoculados en la piel y fagocitados por macrófagos, donde se multiplican en forma de amastigotes. La propagación de la infección ocurre tras la muerte del macrófago. Cuando otro insecto pica e ingiere la sangre del hospedero infectado, los amastigotes se transforman a promastigotes en el intestino medio del insecto y migran hacia su cavidad oral para ser propagados a otro hospedero, completando así el ciclo de la enfermedad.

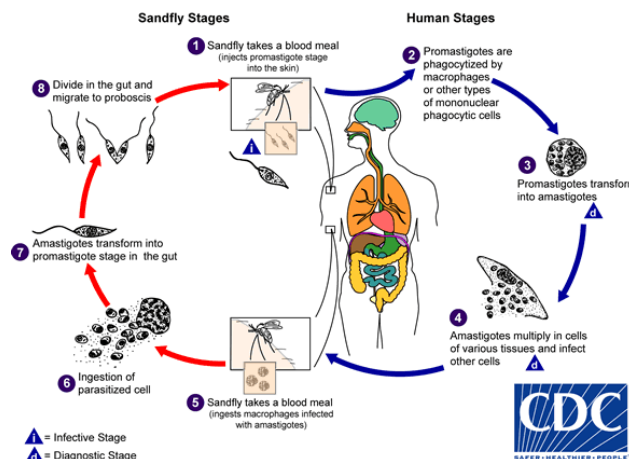


Ilustración 1. Ciclo de vida de la leishmaniasis en humanos  
Fuente: Centro para la Prevención y Control de Enfermedades US

### 3.1.2 Epidemiología

Es una enfermedad desatendida que prevalece en 99 países, y se estima que tiene una incidencia cercana a los 1.3 millones de casos nuevos cada año, aunque aproximadamente solo la mitad de estos se reportan. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica esta enfermedad en cuatro regiones ecoepidemiológicas en todo el mundo: las Américas, África Oriental, África del Norte y Asia Occidental y Sudoriental. Se estima que alrededor de 12 millones de personas padecen alguna forma de la enfermedad.

En términos generales, las formas clínicas más comunes son la leishmaniasis cutánea localizada y difusa, que causan alrededor de 1 millón de nuevos casos, especialmente en países como Brasil, Colombia y Perú. Por otro lado, la leishmaniasis visceral provoca alrededor de 300 mil nuevos casos cada año, principalmente en Brasil, y resulta en aproximadamente 30 mil muertes. (Isaza-Jaimes, Rodríguez, Chacón, Silva, & Bravo, 2018)

En México, los estados con casos activos de leishmaniasis en los últimos años son: Campeche, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Siendo la LC la de mayor prevalencia (99% de los casos).



*Ilustración 2. Distribución geográfica de la leishmaniasis en México*

Fuente: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.

Datos reportados por los Programas Nacionales de Leishmaniasis/Vigilancia.

Entre 2017 y 2020 el número de contagios se vio disminuido, se atribuye esta reducción a la pandemia de COVID-19, debido a que las actividades de vigilancia y control de las enfermedades fueron desatendidas, al igual que las acciones de búsqueda activa, detección temprana y el tratamiento de los casos, así como las actividades de campo donde se encuentra principalmente el vector.

Durante 2019 se reportaron 1,014 casos de LCL, sin embargo, durante el 2020 sólo se presentaron 324 casos. Durante casi una década la LV ha tenido una letalidad del 100%, con una transmisión intermitente entre Oaxaca, Guerrero, Puebla, Morelos y Chiapas, este último con una transmisión activa de casi 30 años. (Secretaria de Salud de México, 2022)

La leishmaniasis puede clasificarse según: Las manifestaciones clínicas, que pueden abarcar desde lesiones ulcerativas en el sitio de la picadura (leishmaniasis cutánea localizada) hasta la formación de múltiples nódulos no ulcerativos (leishmaniasis cutánea difusa), así como la destrucción de las mucosas (leishmaniasis mucosa) e infección visceral diseminada (leishmaniasis visceral). (Rosal Rabesa, 2010)

### **3.1.3 Leishmaniasis cutánea**

Es la presentación más común de la enfermedad, se divide por la manera en la que se va a presentar la lesión en la piel, principalmente en 2: a) leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y b) leishmaniasis cutánea difusa. (LCD). (Hidalgo Solís, 2021)



a) leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Después de semanas o incluso meses después de la picadura, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) suele comenzar con la aparición de una pequeña protuberancia en el sitio de la inoculación. Esto ocurre generalmente en áreas del cuerpo expuestas, como los pabellones auriculares, donde a veces se denomina "úlceras del chiclero", así como en la cara, extremidades superiores y tobillos. Con el tiempo, esta protuberancia aumenta gradualmente de tamaño, se ulcerará, formará costra y tejido de granulación, y mostrará induración y realce de los bordes. Característicamente, estas lesiones son asintomáticas, pero en ocasiones pueden volverse dolorosas, especialmente si hay una sobreinfección.



*Ilustración 3. Lesión de leishmaniasis cutánea localizada*  
Fuente: Revista médica y de enfermería Cronos. Reporte de caso

b) leishmaniasis cutánea difusa. (LCD).

La infección está asociada a estados de inmunodepresión, se caracteriza por comenzar como una lesión localizada que no presente ulceración. En esta forma de la enfermedad, los amastigotes se propagan a los macrófagos de otras áreas de la piel. Esto da lugar a la formación de nódulos o placas blandas en la cara y la superficie de las extremidades, pero puede afectar prácticamente cualquier parte del cuerpo. Un rasgo distintivo en esta condición es que puede dar al rostro y a las orejas similar a lo observado en la lepra producida por *Mycobacterium leprae*



*Ilustración 4. Paciente con leishmaniasis cutánea difusa*

**Fuente:** Olga Zerpa & Jacinto Convit en el artículo "Leishmaniasis Cutánea Difusa en Venezuela"

### **3.1.4 Leishmaniasis mucocutánea**

Frecuentemente, se presenta después de una aparente resolución de infección cutánea, aunque también puede coexistir con la afectación de la piel. Por lo general, las lesiones comienzan a aparecer en un plazo de hasta 2 años después de la infección cutánea, pero en algunos casos pueden tardar hasta 30 años en desarrollarse.

La infección puede diseminarse a través del sistema circulatorio (vía endovenosa) o el sistema linfático. La mayoría de los casos están relacionados a *L. braziliensis*, pero también se ha implicado a otras especies como *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*. (Abadías-Granado, 2021).



*Ilustración 5. Paciente inmunocomprometido con leishmaniasis mucocutánea*  
Fuente: Martin R. et al. En la Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial

### 3.1.5 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral, es comúnmente conocida como kala-azar (enfermedad negra) y se debe a la coloración grisácea de la piel adquirida por los habitantes contagiados en la India, es causada por especies pertenecientes al complejo de *Leishmania donovani*. El período de incubación de esta enfermedad es muy variable, puede oscilar entre 15 días y 2 años, aunque normalmente se efectúa en un rango de 3 a 6 meses.

El proceso de la LV comienza gradualmente con la aparición de fiebre, que persiste de 2 a 8 semanas. Esta fiebre puede ser continua o presentarse de manera repentina hasta dos o tres veces al día. En esta fase inicial, los pacientes pueden experimentar síntomas como diarrea, tos, dolor muscular y pérdida de apetito. Durante este período, el bazo suele ser apenas palpable, pero con el tiempo, aumenta de tamaño de manera considerable.

Después de la fase inicial, su diagnóstico es complicado, la fiebre puede ceder, dejando al paciente con fiebre baja o presentando nuevos episodios de fiebre de carácter irregular en pocos días.

En los casos no tratados se afecta rápidamente el estado general, con caquexia progresiva, amenorrea, hepatomegalia y esplenomegalia, color terroso de la piel, edemas y nódulos cutáneos. Esta fase caquética se inicia a partir del octavo mes y persiste hasta la fase terminal de la enfermedad (segundo-tercer año), que acaba con la muerte de los pacientes no tratados en un 85-95% de los casos. La muerte sobreviene por infección bacteriana secundaria (neumonía, diarrea infecciosa o tuberculosis), anemia o hemorragia gastrointestinal. (Martín R, 2001)



*Ilustración 6. Pacientes pediátricos con hepatoesplenomegalia debido a leishmaniasis visceral*  
Fuente: Lamounier C. & Nery C. del artículo "Espectro clínico de la leishmaniasis"

### 3.2 Vectores

La enfermedad se propaga por la picadura de pequeñas moscas conocidas como flebotominos o moscas de la arena. En México también son denominadas como papalotillas, palomillas, jején pringador, manta blanca o chitre. Se han descrito 700 especies pertenecientes a dos géneros: *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en América. Tanto los machos como las hembras se alimentan de néctares de plantas y secreciones de azúcar. Sin embargo, las hembras requieren de sangre para desarrollar sus huevos. El ciclo de vida de esta mosca es holometábolo (Sufren metamorfosis completa; pasan por los estados de huevo, larva, pupa y adulto) que tarda entre 30 y 100 días, según la especie y la temperatura ambiental. El promedio de vida del adulto es de 25 a 30 días. (Cañeda Guzmán, 2017)

La *Lutzomyia* es un pequeño insecto de 2 a 3 mm de longitud, con el cuerpo y alas densamente cubierto de pelos y un período de vida en la naturaleza aproximadamente de 40 a 50 días. La mayoría de las hembras están listas para ingerir sangre de 1 a 4 días luego de emerger de la pupa; una vez ingerida la sangre comienza el proceso de ovogénesis. Su periodo de vida es de 40 a 50 días. (Alberto Cortés, 2008)

Los flebotominos adquieren la infección de *Leishmania sp.* al alimentarse de un hospedador previamente infectado. Sin embargo, durante este intervalo de tiempo, el vector se nutre de azúcares y proteínas procedentes de las plantas. Estos nutrientes pueden tener un efecto tanto facilitador como inhibidor en la transmisión de *Leishmania*. Se considera que la alimentación del vector y sus condiciones de su intestino pueden afectar la capacidad de *Leishmania* para sobrevivir y transmitirse. (Vásquez, 2002)



*Ilustración 7. Vectores de la leishmaniasis, Lutzomya (izquierda) y Phlebotomus (derecha)*  
Fuente: Zaragozano F., Martínez R., & Clavel P. en la Revista Medicina Integral

### **3.3 Fármacos antileishmaniales de uso clínico**

Actualmente existen cinco tipos de fármacos con actividad antiparasitaria recomendadas para el tratamiento de la leishmaniasis: antimoniales pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, pentamidina y miltefosina. (Monge-Maillo, 2021)

#### **3.3.1 Antimoniales pentavalentes (SbV)**

Durante más de medio siglo han sido el principal tratamiento de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis. Actualmente, se dispone comercialmente de dos formulaciones con SbV, el antimonio de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®) que se consideran equivalentes en términos de eficacia clínica, efectos secundarios, farmacocinética y mecanismos de acción. Según recomendación de la OMS, su dosis es de 20mg/kg/día. Sin embargo, en la actualidad se han presentado cepas resistentes a este fármaco, por lo que se han reportado un mayor número de fallos terapéuticos. (Hernán Henao, 2004)

#### **3.3.2 Anfotericina B**

Se introdujo como terapia desde 1958, fue el primer antifúngico de uso sistémico, posee una estructura química peculiar que consiste en un anillo monocíclico polieno-lactona unido a una micosamina. Se presentan dos formulaciones, la primera en surgir con desoxicolato (AmB-D) que son micelas formadas en solución acuosa, más tarde se comprobó que se podía mejorar de forma importante la tolerancia de los pacientes al administrarlo en forma de lípidos, lo que generó el desarrollo comercial de diversas formulaciones lipídicas de este fármaco (AmB-L). Actualmente usada como segunda línea de acción para fallos terapéuticos, la OMS recomienda el uso de la presentación liposomal para tratar la LV en dosis de 3 mg/kg/día durante 7 días hasta 20 mg/kg. (Perea, 2021)

### **3.3.3 Mitefosina**

Inicialmente se desarrolló como tratamiento antineoplásico. Empleado principalmente de forma tópica en pacientes con metástasis cutáneas de cáncer de mama. Destacado por ser el primer tratamiento aprobado para ser administrado por vía oral contra la leishmaniasis visceral, con altas tasas de curación incluso en pacientes que no responden al tratamiento con antimoniales. En India fue implementado en 2002 para tratar la LV con tasas de curación mayores a 95%. Las guías de práctica clínica recomiendan una dosis de 100mg/kg/día durante 28 días para adultos con un peso superior a 50kg, 50mg/kg/día para aquellos con menor peso, y 2.5mg/kg/día en niños (con una dosis máxima de 100mg/día). Parece no ser efectivo para tratar la LC y no posee eficacia sobre ciertas especies de Leishmania. (Piccolo Johanning, 2018)

### **3.3.4 Paramomicina**

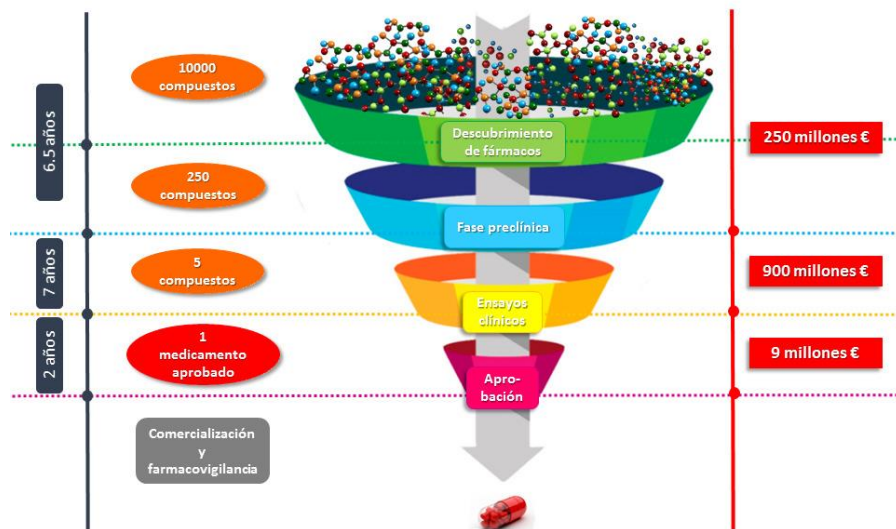
Es un aminoglucósido de la familia de la neomicina/kanamicina que ha mostrado eficacia en el tratamiento de la leishmaniasis y de otras infecciones causadas por protozoos. Se ha aplicado por vía parenteral (dosis de 16 a 18 mg/kg/día) sola o combinada con antimoniales para tratar leishmaniasis visceral. Los índices de curación son variables según los autores. Y fluctúan entre el 68 % y 89 %, especialmente en áreas donde existe resistencia a los antimoniales. Actualmente se realizan diversos ensayos clínicos para la implementación de su uso tópico en LC, a una concentración del 15%, siendo el primer posible tratamiento en presentación de crema. (Ricciardi, 2009)



### 3.4 Desarrollo de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis

#### 3.4.1 Búsqueda de nuevos fármacos

Durante muchos años, la estrategia primordial de la industria farmacéutica ha consistido en la búsqueda de nuevas moléculas químicas dirigidas hacia dianas farmacológicas específicas. Este proceso es complicado y comienza con la identificación de compuestos que pueden unirse a un blanco terapéutico o que muestran actividad biológica en ensayos de detección. Los compuestos que demuestran esta actividad biológica se denominan "hits". La siguiente etapa implica la búsqueda de compuestos que posean propiedades farmacéuticas favorables, como baja toxicidad y solubilidad adecuada para la administración oral, entre otras características farmacocinéticas esenciales. Este proceso de desarrollo de fármacos puede llevar de 10 a 15 años, y conlleva una inversión significativa, aproximadamente de 800 millones de dólares en promedio. Lo que es aún más desafiante es que este proceso presenta una tasa de fracaso del 90%, lo que resulta en pérdidas sustanciales tanto en términos económicos como temporales para la industria farmacéutica. (Sánchez-Puelles, 2020) (Vidal, 2022)



*Ilustración 8.* Proceso del desarrollo clínico de un medicamento  
**Fuente:** María del Carmen Fernández y Nuria E. Campillo en el blog "Ciencia para llevar"

### 3.4.2 Reposicionamiento de fármacos

El Reposicionamiento de fármacos consiste en proponer una nueva aplicación terapéutica a un medicamento ya existente y previamente aprobado para un propósito terapéutico diferente. Aunque también se consideran aquellos que fueron retirados del mercado o que no pasaron la fase clínica. Esta práctica se ha vuelto ampliamente utilizada en los últimos años como una alternativa al desarrollo de nuevos fármacos. (Siria, 2021) (Parra, 2021).

Esta estrategia tiene ciertas ventajas respecto al método tradicional de desarrollo de fármacos, principalmente reduce la inversión de tiempo y dinero en alrededor de 60%. Se estima que se requiere de aproximadamente 300 millones de dólares y entre 3 a 6 años. Esto se debe a que los fármacos candidatos a reposicionar ya han sido aprobados para su uso en humanos, por lo que han superado los estándares regulatorios, incluyendo estudios preclínicos, clínicos y de farmacovigilancia posteriores a la comercialización. (Parra, 2021).



*Ilustración 9. Fases del reposicionamiento de fármacos*  
*Fuente:* Cendhy en el blog "Desde la molécula al botiquín: el camino de un medicamento"

### **3.4.3 Moduladores selectivos de los reguladores de estrógeno**

Los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (MSRE) son moléculas que poseen un perfil especial debido a su capacidad de ejercer efectos estrogénicos o anti estrogénicos en función del tejido considerado y de la molécula específica. Estos moduladores fueron concebidos y desarrollados a lo largo de varias generaciones con el objetivo de lograr efectos beneficiosos en diversos tejidos.

En la actualidad, se utilizan principalmente en tres áreas terapéuticas clave: el tratamiento y la prevención del cáncer de mama dependiente de hormonas, la inducción de la ovulación y la prevención de fracturas osteoporóticas (Chabbert-Buffe, 2016)

### **3.4.4 Tamoxifeno**

Su efecto anti estrogénico se basa al bloquear la acción de la hormona estrógeno que estimula el desarrollo de las células tumorales. Este efecto no se limita únicamente a la mama, ya que diversos órganos del cuerpo tienen receptores para estrógenos. En el útero, el tamoxifeno actúa como un agonista estrogénico, mientras que, en el hueso mejora la absorción de calcio, lo que lo hace beneficioso en el tratamiento de la osteoporosis.

Es importante destacar que se considera un profármaco, ya que necesita ser transformado en sus respectivos metabolitos, los cuales son los responsables de su actividad farmacológica. El proceso de metabolismo del tamoxifeno incluye tanto metabolitos primarios como secundarios, y se lleva a cabo principalmente en el hígado, con la participación de enzimas del citocromo P450. (Ariza Márquez, Briceño Balcázar, & Ancízar Aristizábal, 2016)

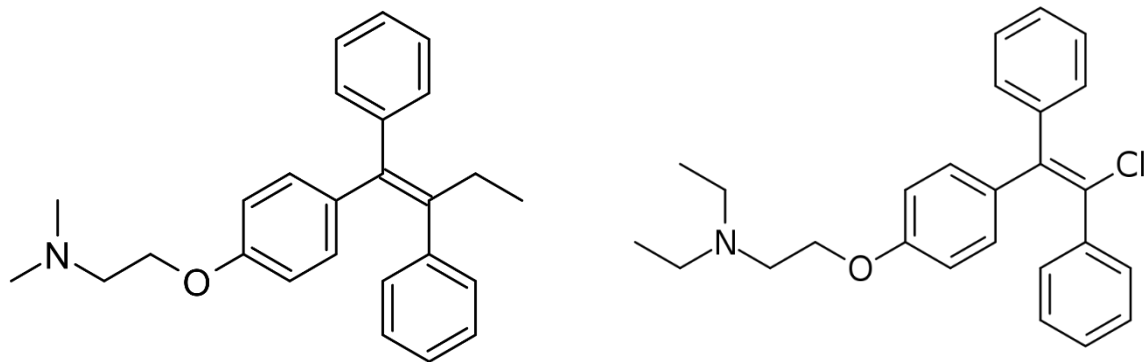
### **3.4.5 Clomifeno**

El clomifeno es capaz de inducir la ovulación en mujeres que tienen problemas de anovulación. Su mecanismo de acción implica la unión a los receptores estrogénicos citoplásmicos. Una vez unido, el complejo formado por el clomifeno y el receptor se

traslada al núcleo de la célula. Esto lleva a una señal engañosa para el hipotálamo y la hipófisis, haciéndoles creer que las concentraciones de estrógeno en el cuerpo son bajas. Como respuesta el hipotálamo y la hipófisis aumentan la secreción de factores liberadores de LH/FSH (hormona luteinizante y hormona estimulante del folículo) y gonadotropinas. Esto, a su vez provoca una estimulación en los ovarios, induciendo la ovulación y manteniendo la función del cuerpo lúteo. También conduce al agrandamiento de los ovarios y a la formación de quistes ováricos.

En el caso de los hombres, el clomifeno puede aumentar la producción de células sexuales masculinas (gametogénesis) y la producción de hormonas esteroideas. Por lo tanto, se utiliza en terapias para tratar la infertilidad relacionada con la oligospermia (baja cantidad de espermatozoides).

El clomifeno se absorbe eficientemente por vía oral y sufre circulación enterohepática. Alrededor del 50% del fármaco se excreta en las heces en los cinco días posteriores a su administración, mientras que el resto se elimina de manera gradual a lo largo de varias semanas (Carranza, 2015)



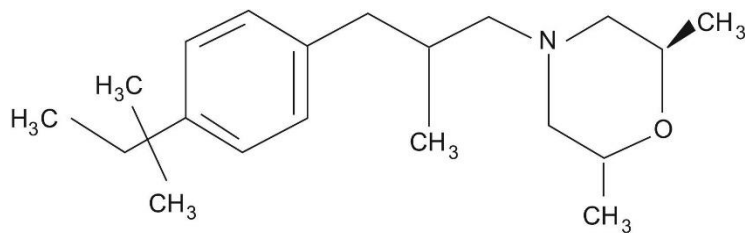
*Ilustración 10. Estructura química del clomifeno (izquierda) y el tamoxifeno (derecha)*

### 3.4.6 Antimicóticos

Este término refiere a cualquier sustancia con la capacidad de inducir alteraciones a la estructura de la célula fúngica e inhibir su crecimiento. Este impacto puede ocurrir de manera directa o indirectamente, contribuyendo a la eficiencia del sistema inmune del huésped. (Gregorí Valdés, 2005)

### 3.4.7 Amorolfina

La amorolfina es una sustancia activa de amplio espectro antifúngico, que incluye dermatofitos, levaduras y mohos. Auxiliar en el tratamiento de la onicomicosis, perteneciente a la familia de la morfolina, normalmente usado en presentación de laca al 5% 2 veces a la semana durante 6 meses. Actúa Inhibiendo la 14-delta-reductasa y la 7-8 delta isomerasa, enzimas en la vía de la síntesis del ergosterol reduciendo el riesgo de reaparición. (Martínez-Méndez, 2023) (Martin Aragon, 2004)



*Ilustración 11. Estructura química de la amorolfina*

### 3.5 Antecedentes

Posterior al descubrimiento de la anfotericina B como antileishmanial, los antifúngicos han sido blanco de investigación para tratar la leishmaniasis, principalmente aquellos con la posibilidad de ser un tratamiento de vía oral, con menos reacciones adversas y baja toxicidad. En 2016, Carvajal y colaboradores estudiaron la familia de los azoles frente a cepas causantes de leishmaniasis cutánea, comprobando la eficacia *in vitro* del ketoconazol, itraconazol y fluconazol.

En 2017, se hace mención por primera vez del clomifeno y la amorolfina como posibles leishmanicidas, por Sifontes S. en su tesis doctoral publicada con el nombre “Descubrimiento racional de compuestos químicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas”. En donde realiza una búsqueda de compuestos potencialmente activos frente a estos protozoos empleando herramientas quimio-informáticas acopladas a ensayos biológicos, y orientado a fármacos con otras indicaciones. Obtuvo una selección de compuestos con la mayor potencialidad (según los modelos) y las mejores perspectivas (según la información farmacológica y toxicológica disponible) para concluir evaluándolos frente a los parásitos *in vitro* e *in vivo*.

Más tarde, en 2023 Sifontes S. comprueba la actividad antileishmanial del clomifeno frente a tres diferentes cepas causantes de leishmaniasis cutánea, a través de la evaluación *in vitro* con amastigotes y promastigotes e *in vivo* en un modelo murino con ratones BALB/c. Obteniendo resultados favorables, se postula el clomifeno como un posible nuevo tratamiento.

Al mismo tiempo, realizó la comprobación *in vitro* de la amorolfina frente a promastigotes y amastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, obteniendo resultados favorables para dar lugar a la experimentación *in vivo*, presentada en este informe.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Cepa

Los promastigotes de *L. Infantum* y *L. Mexicana* utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Inmunobioquímica Molecular y Cardiopatías de la Unidad de Investigación UNAM-INC. Conservados en medio 199 a 26°C suplementado con suero fetal bovino (Gibco REF:16000-044) al 10%, vitaminas (MEM 100X SIGMA M6895) y solución penicilina/estreptomicina (Biowest 100X) al 1%. Los pases del cultivo se realizaron cada 72 horas con una concentración inicial de  $2.5 \times 10^5$

### 4.2 Comparativa de la actividad antileishmanial del clomifeno y el tamoxifeno frente a *L. Infantum*

#### 4.2.1 Preparación de los fármacos a probar

Se disolvieron los fármacos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyeron para obtener una concentración de 25µg (200x). En una placa de 96 pozos se realizó el diseño, el cual consistía en un grupo de referencia con anfotericina B, un grupo con clomifeno, uno con tamoxifeno y controles (positivo y negativo). Se agregaron 2µL de cada fármaco en los pozos de la fila A, se aforó a un volumen de 200µL y se re suspendió. Se adicionaron 100µL de medio a cada pozo vacío, se traspasaron 100µL de la fila A a la fila B, así sucesivamente hasta la G. El control negativo solo contenía medio 199 y el control positivo anfotericina B en una concentración de 250µg/mL.

#### 4.2.2 Actividad in vitro de clomifeno y tamoxifeno frente a *Leishmania infantum*.

Se usaron promastigotes en el día 5 de cultivo, se realizó un conteo en cámara de Neubauer y a través de la fórmula  $V_i = \frac{V_s * C_f}{C_i - C_f}$ , se llevaron a una concentración de  $10^6$  células/mL. Se adicionaron 100 µL a la placa antes realizada. Se incubó a 28°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

Pasado ese tiempo, se preparó una solución de p-nitrofenil fosfato (pNPP) a 3 mg/mL con buffer de pH 5,5 y se adicionaron 30µL a toda la placa, se incubó por 3 horas a 37°C en agitación (120 rpm), posteriormente se neutralizo el medio con 50µL de NaOH 0.5M y se leyó en el espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 405nm.

#### **4.2.3 Cálculo de la concentración que inhibió el crecimiento parasitario en un 50% (Ci50)**

Se calculó el valor promedio de los controles (positivo y negativo) y a través de la fórmula  $=100*[1 - (\text{promedio de las concentraciones}) - (C-)] / [(C-) - (C+)]$  se calculó el % de inhibición (%IC) de cada fármaco. Se calculó la concentración plasmática máxima (Cmax) y la concentración plasmática mínima (Cmin) con el que se obtuvo el logaritmo de la ci50 para posteriormente con antilogaritmo el ci50.

### **4.3 Comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina en un modelo de infección en cojinete plantar**

#### **4.3.1 Modelo de infección**

Se usaron 12 ratones BAL/c hembras de entre 10 y 12 semanas, divididas en 4 grupos. Se inocularon  $10^7$  promastigotes de *L. Mexicana* resuspendidos en 20µL de PBS (phosphate buffered saline) (ilustración 12). El tratamiento se inició 21 días después de la infección.





*Ilustración 12. Inoculación de ratón BAL/c en cojinete plantar*

#### **4.3.2 Tratamiento farmacológico**

Se uso anfotericina B como tratamiento control, en una dosis de 7 mg/kg, aplicada cada 48 h, por 7 dosis; amorolfina en ungüento al 0.25% cada 24 horas durante 15 días; amorolfina en laca al 5%, cada 72 horas, 5 dosis. El grupo restante no presentaba tratamiento, que nos servía como control negativo.

#### **4.3.3 Evaluación del experimento**

Se llevaron a cabo dos evaluaciones, la primera de manera semanal donde se realizaba la medición del cojinete plantar y, la segunda era la evaluación final del tratamiento, donde se media el peso de la lesión.

## 4.4 Comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina en un modelo de leishmaniasis cutánea ulcerativa

### 4.4.1 Modelo de infección

Se usaron 18 ratones BAL/c hembras de entre 10 y 12 semanas, divididas en 4 grupos. Se inocularon  $10^7$  promastigotes de *L. Mexicana* resuspendidos en 20 $\mu$ L de PBS (phosphate buffered saline) en la base de la cola de cada ratón. El tratamiento se inició cuando se presentaron las ulceraciones (cerca de 14 días). (Ilustración 13)

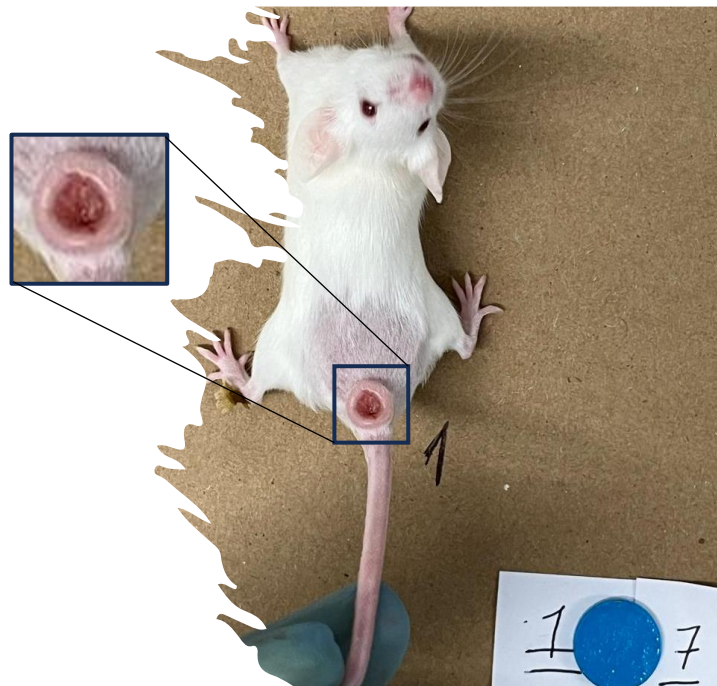


Ilustración 13. Lesión ulcerativa del modelo de leishmaniasis cutánea por *L. Mexicana*

### 4.4.2 Tratamiento farmacológico

Se empleó anfotericina B como tratamiento control, administrando una dosis de 7 mg/kg cada 72 horas durante un total de 7 dosis, aplicada vía intramuscular. Para otro grupo, se aplicó amorolfina en ungüento al 0.25% cada 24 horas durante un período de 15 días.

Además, se trató a otro grupo con amorolfina en laca al 5%, administrando una dosis cada 72 horas, por 7 dosis. El grupo restante no recibió tratamiento, sirviendo como control negativo en el estudio.

#### **4.4.3 Evaluación del experimento**

Se llevaron a cabo mediciones semanales de las úlceras mediante capturas fotográficas utilizando especificaciones constantes de distancia y zoom. Estas imágenes fueron procesadas utilizando un software bioinformático denominado ImageJ. En el análisis, se calcularon los píxeles correspondientes a cada úlcera para posteriormente convertir esta medida a centímetros cuadrados. Este procedimiento permitió evaluar de manera cuantitativa la evolución de las úlceras a lo largo del tiempo.

#### **4.5 Cálculo de la influencia del DMSO en la respuesta inflamatoria de los cojinetes plantares**

Al utilizar el DMSO como vehículo para los fármacos evaluados, se buscó examinar la influencia de este compuesto en la respuesta inflamatoria de los cojinetes plantares, con el objetivo de evitar sesgos en los datos obtenidos.

Para llevar a cabo este estudio, se emplearon 20 ratones hembra de la cepa BAL/c, los cuales fueron asignados a cuatro grupos. Un grupo de control recibió una aplicación de 20  $\mu$ L de agua inyectable, mientras que los grupos restantes fueron tratados con 20  $\mu$ L de DMSO en concentraciones del 50%, 75% y 100%, respectivamente, cada cuatro días. Se realizaron mediciones de los cojinetes plantares de cada roedor antes de iniciar el experimento y posteriormente cada cuatro días a lo largo de un período de 16 días.

## **4.6 Comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina por tratamiento intralesional**

### **4.6.1 Modelo de infección**

Se usaron 32 ratones BAL/c hembras de entre 10 y 12 semanas, divididas en 4 grupos. Se inocularon  $10^7$  promastigotes de *L. Mexicana* resuspendidos en 20 $\mu$ L de PBS (phosphate buffered saline) en el cojinete plantar de cada ratón. Iniciando el tratamiento intralesional en el día 15.

### **4.6.2 Tratamiento farmacológico**

El grupo de control fue tratado con Glucantime, administrando una dosis de 20  $\mu$ L cada tercer día durante un total de 5 dosis. Por otro lado, los grupos restantes fueron asignados de la siguiente manera: un grupo recibió Amorolfina (Sigma) en una concentración del 0.5%, disuelta en DMSO al 50%, con una aplicación de 20  $\mu$ L. Otro grupo fue tratado exclusivamente con DMSO al 50%, aplicando 20  $\mu$ L cada tercer día. Todas las administraciones se llevaron a cabo de manera intralesional. Adicionalmente, se incluyó un grupo de control negativo que no recibió ningún tipo de tratamiento.

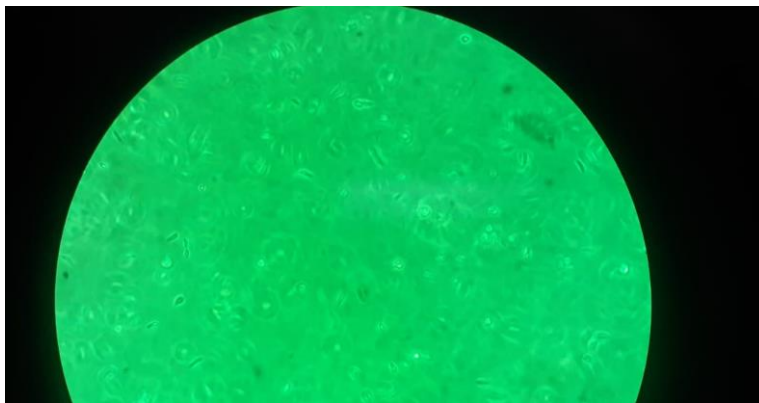
### **4.6.3 Evaluación del experimento**

Se realizó una medición del cojinete plantar de los roedores antes de iniciar el tratamiento y una al finalizar la quinta dosis.

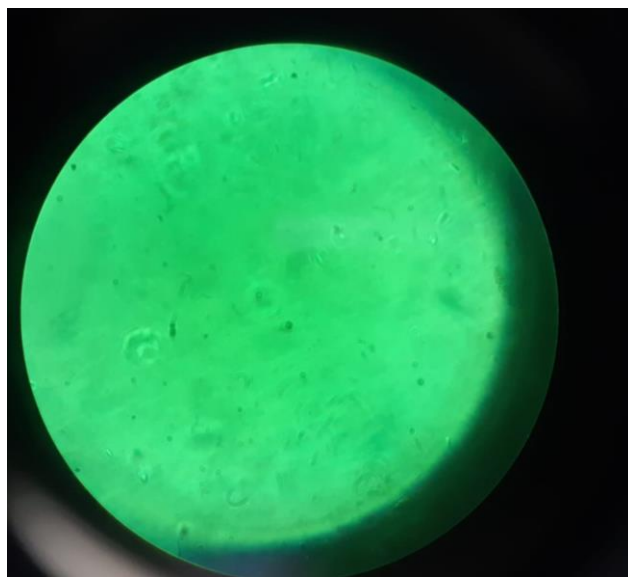
## 5 RESULTADOS

### 5.1. Resultados de la comparativa de la actividad antileishmanial del clomifeno y el tamoxifeno frente a *L. Infantum*

Se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento de los promastigotes de *L. infantum* con diferentes concentraciones de los tres fármacos probados. Para clomifeno y tamoxifeno se partió desde una concentración de 25 $\mu$ g hasta 0.4 $\mu$ g, y para anfotericina B de 1.4 $\mu$ g a 0.02 $\mu$ g.



*Ilustración 14. Leishmania Infantum antes de iniciar ensayo de inhibición con clomifeno*



*Ilustración 15. Leishmania infantum posterior al tratamiento con clomifeno en ensayo de inhibición de crecimiento*

Tras realizar por triplicado las placas, se obtuvieron las siguientes  $ci_{50}$ :

Clomifeno	Tamoxifeno	Anfotericina B
2.611	7.615	0.062
1.159	4.249	0.069
2.093	7.954	0.072

*Tabla 1. Resultados de las  $ci_{50}$  de los fármacos probados*

Dos de las tres placas mostraron valores constantes, por lo que la placa inconsistente se descartó en el análisis de los resultados.



*Ilustración 16. Placa descartada con inconsistencia en los resultados obtenidos*

Para unificar valores de  $ci_{50}$ , se obtuvo la media de las concentraciones, presentadas a continuación:

Ci50		
Clomifeno	Tamoxifeno	Anfotericina B
2.352	7.785	0.064

*Tabla 2. Media de las  $ci_{50}$  obtenidas*

### 5.1.2 Análisis estadísticos de los resultados

Se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos mediante la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias entre los grupos. Los resultados arrojaron un valor de 7.2, evidenciando una diferencia significativa entre los valores de CI50 del tamoxifeno y el clomifeno.

$$H' = \frac{12}{n(n+1)} \left( \frac{R_1^2}{n_1} + \frac{R_2^2}{n_2} + \dots + \frac{R_k^2}{n_k} \right) - 3(n+1)$$
$$H' = \frac{12}{9(9+1)} \left( \frac{15^2}{3} + \frac{24^2}{3} + \frac{6^2}{3} \right) - 3(9+1) = 7.2$$
$$H = \frac{H'}{1-0} = 7,2$$

*Ecuación 1. Prueba de Kruskal-Wallis*

*N: el tamaño total de las muestras (la suma de los tamaños de las muestras).*

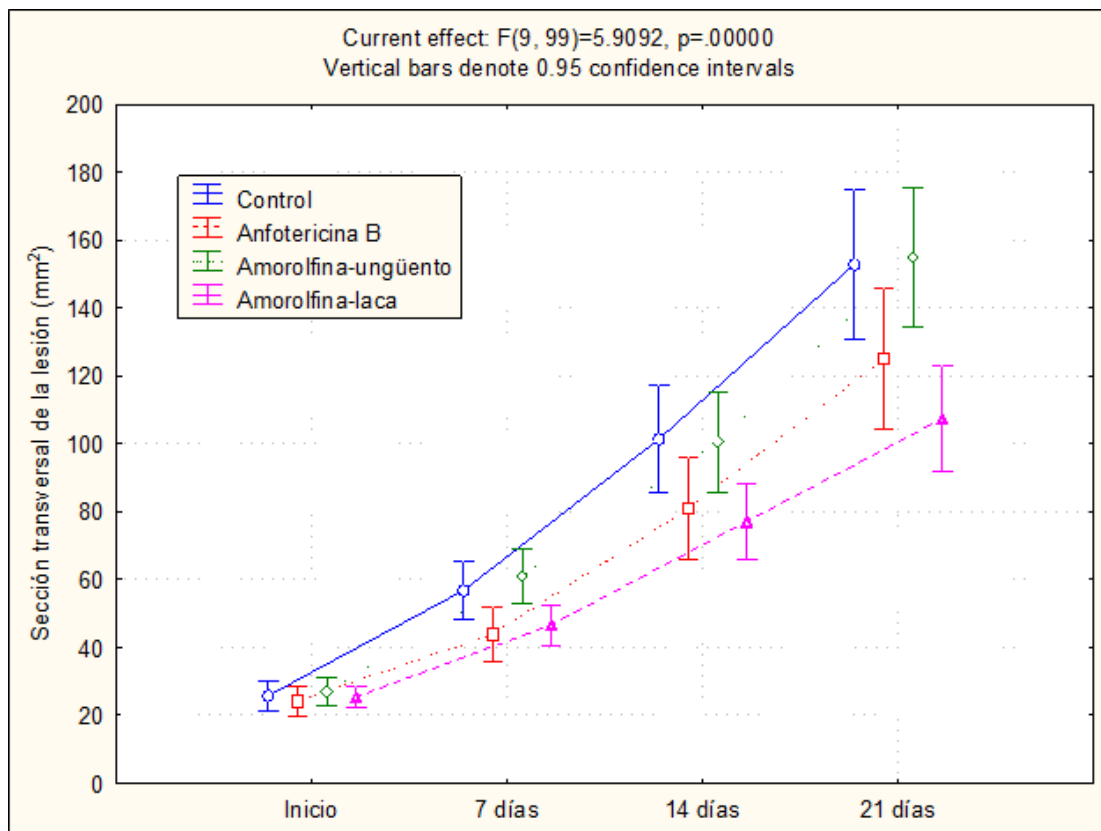
*K: es el número de grupos o tratamientos.*

*R<sub>i</sub>: es la suma de los rangos para la muestra  $i$  (de un total de  $k$  muestras).*

*N<sub>i</sub>: es el tamaño de la muestra  $i$*

## 5.2 Resultado de la comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina en un modelo de infección en cojinete plantar

Los resultados semanales fueron promediados para cada grupo y posteriormente graficados en relación con el tamaño del cojinete plantar y el tiempo transcurrido, utilizando herramientas estadísticas para facilitar la visualización y análisis de los datos.

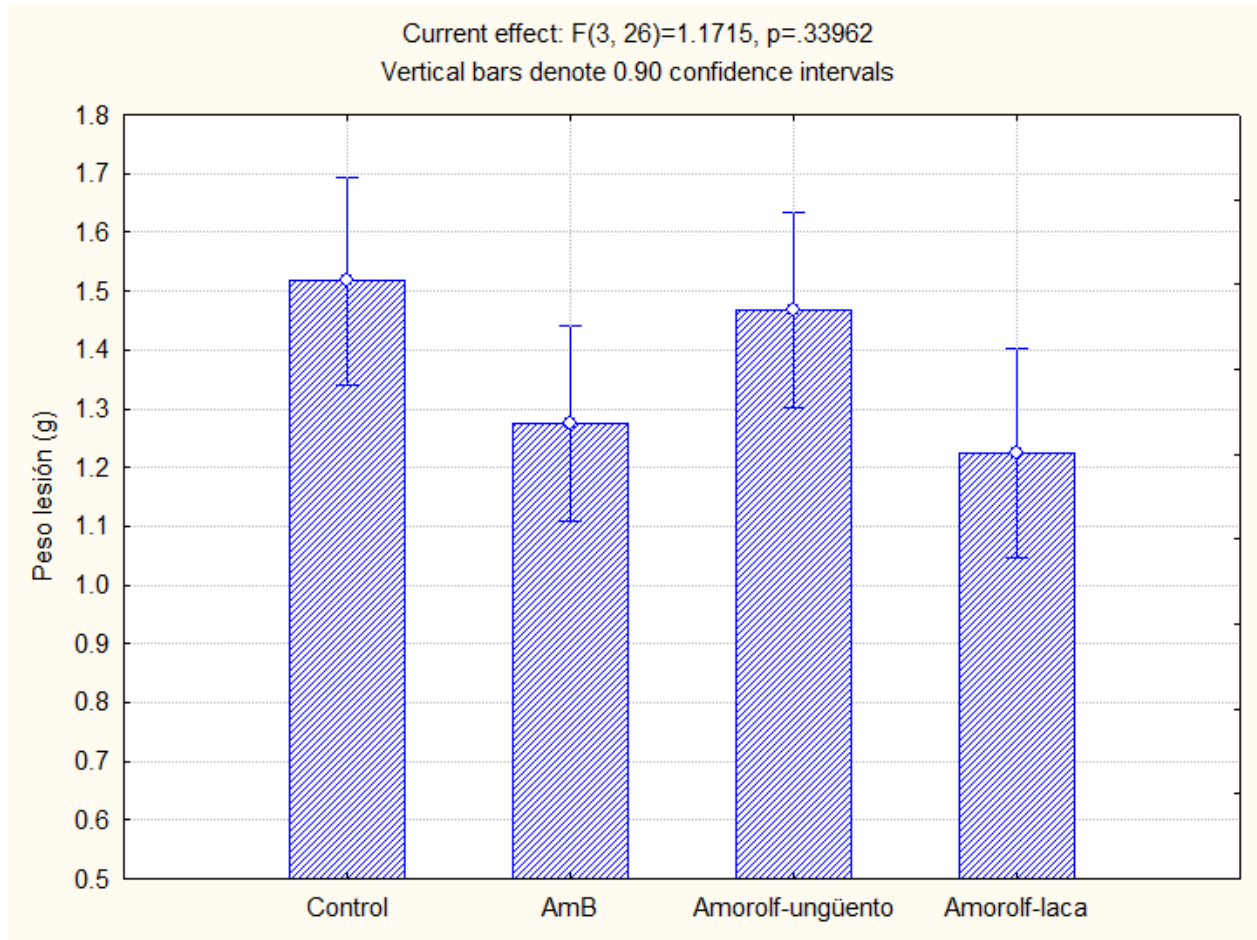


*Ilustración 17. Resultados semanales de la comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina en un modelo de infección en cojinete plantar*

El grupo control presentó la mayor inflamación como estaba previsto, seguida del grupo de la amorolfina en ungüento y la anfotericina B. Aunque, no existe diferencia significativa entre los grupos.



Para la evaluación final del experimento se realizó el corte de la pata infectada y se pesaron en una balanza analítica, se promedió por grupos y se presentan en la siguiente grafica (ilustración 18).



*Ilustración 18. Peso de la lesión de las patas infectadas en un modelo de infección en cojinete plantar*

El grupo tratado con amorolfina en ungüento mostró resultados comparables al grupo de control sin tratamiento, mientras que el grupo tratado con amorolfina en laca presentó un peso similar a los sujetos tratados con anfotericina B. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

### 5.3 Resultados de la comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina en un modelo de leishmaniasis cutánea ulcerativa

Después de procesar todas las fotografías y calcular las áreas de las lesiones, se procedió a promediar estos valores utilizando herramientas estadísticas. Los resultados promedio se presentan en la Ilustración 16, proporcionando una representación visual de la evolución de las lesiones a lo largo del tiempo.

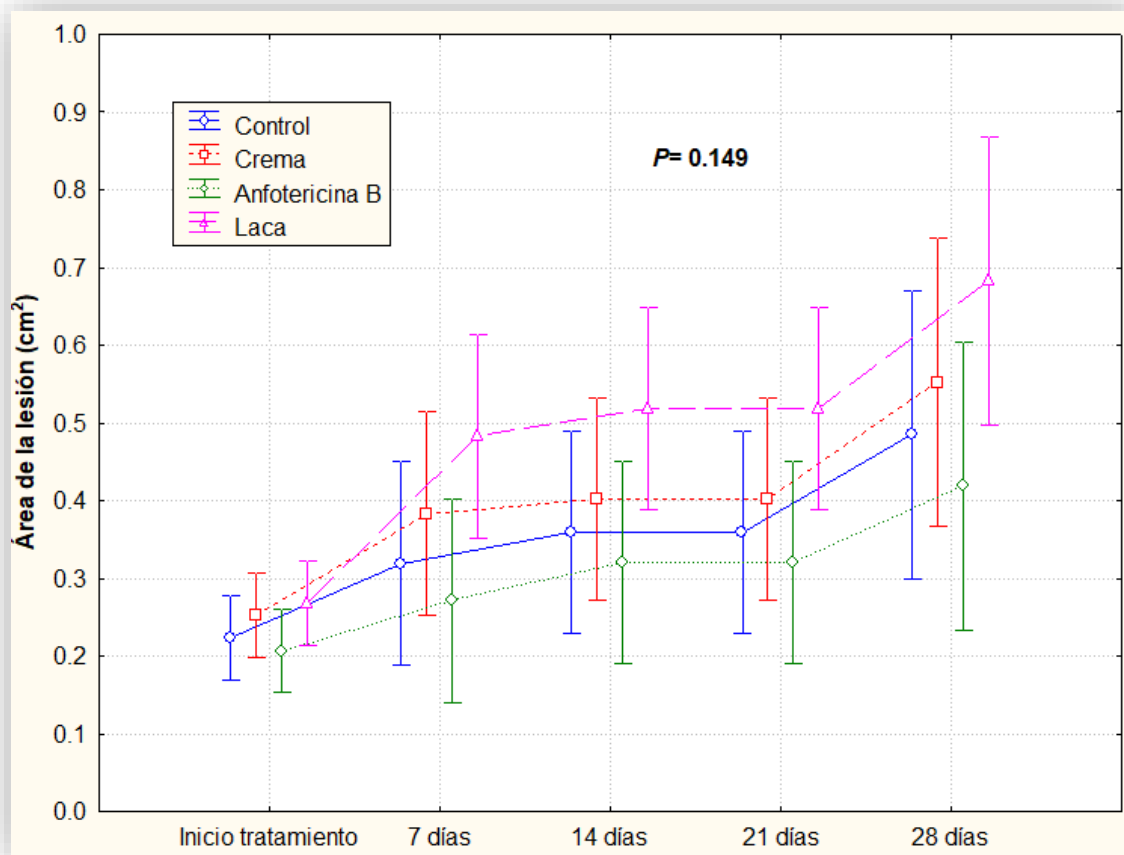
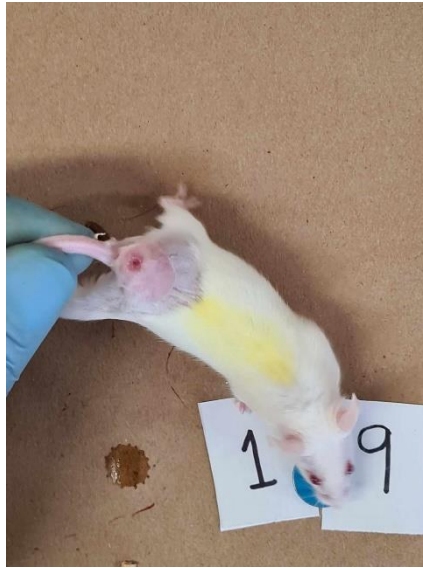


Ilustración 19. Resultados del tamaño de la lesión en cm<sup>2</sup> de un modelo de leishmaniasis cutánea ulcerativa

Se observó que las úlceras tratadas con amorolfina en laca exhibieron tamaños mayores en comparación con otros grupos de tratamiento. No obstante, es importante destacar que una de las úlceras en este grupo mostró una curación completa. Sin embargo, aquellas úlceras que no experimentaron curación total presentaron dimensiones más amplias en comparación con otros casos. (Ilustración 20 y 21)



*Ilustración 20. Ratón tratado con amorolfina en laca al 5% con úlcera curada*

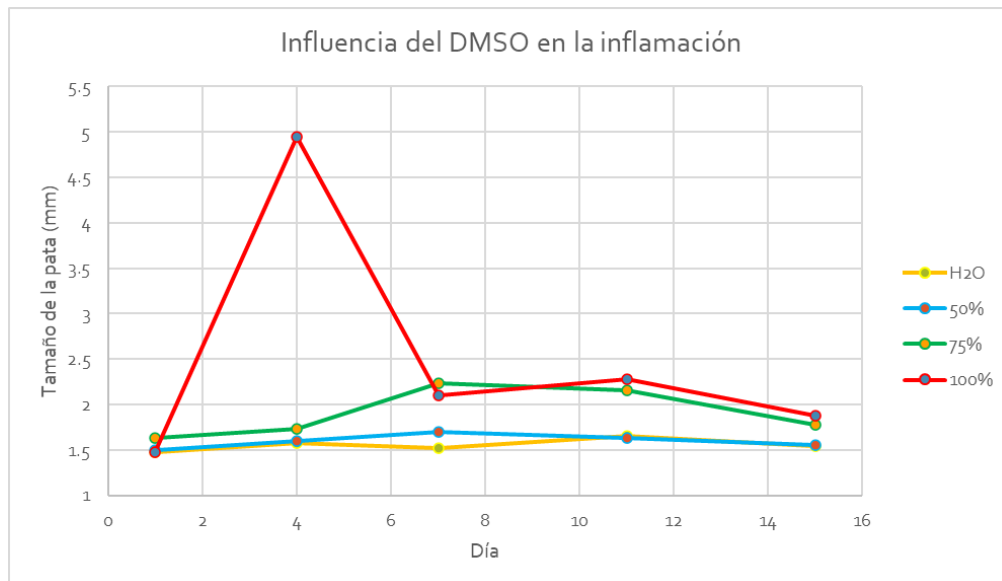


*Ilustración 21. Ratón tratado con amorolfina en laca al 5% con úlcera de gran tamaño*

No se observaron diferencias significativas entre los grupos control positivo y negativo, así como entre los diferentes grupos de tratamiento. Esta falta de diferenciación impide obtener resultados confiables en el estudio.

#### 5.4 Resultados de la influencia del DMSO en la respuesta inflamatoria de los ratones

Se llevaron a cabo mediciones previas a cada aplicación de tratamiento, donde se promediaron los resultados y se representaron gráficamente para facilitar la presentación de los datos. En esta representación, se observa una inflamación superior y significativa en los ratones tratados con DMSO al 100%, mientras que se observa una inflamación similar entre aquellos tratados con DMSO al 50% y aquellos que recibieron agua inyectable. Estos hallazgos indican diferencias notables en la respuesta inflamatoria, destacando el impacto potencial del DMSO al 100% que podría generar sesgos importantes en experimentos que usen el DMSO como vehículo.



*Ilustración 22. Resultados de la influencia del DMSO usado como vehículo en la respuesta inflamatoria de cojinetes plantares*

Es importante señalar que se interrumpieron las aplicaciones de DMSO al 100% después de la tercera administración debido a que la inflamación resultante fue muy significativa, generando sangrado y malestar evidente en los animales. Con el objetivo de cumplir con las normativas de experimentación en animales y evitar posibles conflictos con el comité de ética de la institución, se tomó la decisión de detener las aplicaciones de DMSO al 100% para salvaguardar el bienestar de los animales.

La proporción que mostró una mayor aceptación por parte de los roedores, en comparación con el grupo que recibió agua inyectable, fue el DMSO al 50%. En este grupo, no se observó malestar ni inflamación significativa en los ratones, lo que sugiere que esta concentración de DMSO fue mejor tolerada por los animales de este experimento.

### **5.5 Resultados de la comprobación *in vivo* de la capacidad leishmanicida de la amorolfina por tratamiento intralesional**

Como último recurso para evaluar la efectividad de la amorolfina como posible agente antileishmanial, se optó por el uso del principio activo puro. Esta elección buscaba evitar posibles complicaciones que podrían haber surgido en experimentos anteriores, donde se aplicó de manera intralesional y se realizaron mediciones antes de cada aplicación. El enfoque con el principio activo puro proporciona una evaluación más directa y simplificada de la capacidad antileishmanial de la amorolfina, minimizando potenciales variables externas y facilitando la interpretación de los resultados.

Se presenta un gráfico con los resultados obtenidos al inicio y al final del tratamiento, donde se puede observar que no se obtienen resultados positivos sobre la eficacia de la amorolfina como antileishmanial. La comparación entre el grupo tratado con Glucantime y los demás grupos muestra una clara diferencia, indicando que la amorolfina no logró generar un impacto significativo en la leishmaniasis en comparación con el tratamiento estándar. Estos hallazgos condujeron al cierre de la experimentación con amorolfina,

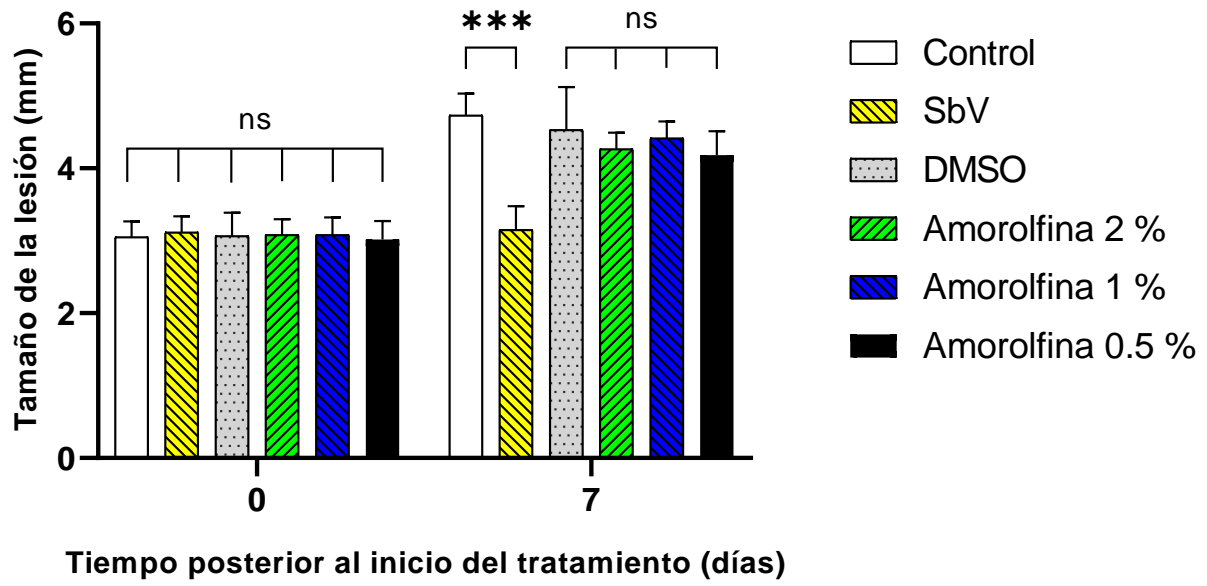


Ilustración 23. Resultados del tratamiento intralesional de amorolfina en leishmaniasis cutánea por *L. mexicana*

## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Comparativa de la actividad antileishmanial del clomifeno y el tamoxifeno frente a *L. Infantum*

Se encontró una  $ci_{50}$  promedio del clomifeno en  $2.352\mu\text{g}$  y la del tamoxifeno en  $7.785\mu\text{g}$  concordante con lo obtenido por Sifontes S. en 2023, en la comprobación *in vitro* de ambos fármacos frente a *L. mexicana*, la cual es hasta el momento la única investigación que aborda el tema del clomifeno como un posible antileishmanial.

Por lo cual, se podría decir que de manera *in vitro* el clomifeno es más eficaz que el tamoxifeno para inhibir el crecimiento de *Leishmania* tanto en cepas causante de LV como lo es *L. infantum* y en aquellas causantes de LC como lo menciona el trabajo de Sifontes S. en el que se menciona una diferencia de 3 veces el  $ci_{50}$  del clomifeno en comparación del tamoxifeno.

Por otro lado, el grupo tratado con anfotericina B exhibió la  $CI_{50}$  más baja, aproximadamente  $0.075\mu\text{g}$ , resaltando la importancia de preservar los tratamientos actuales que demuestran ser efectivos y prevenir nuevos mecanismos de resistencia de la *Leishmania*.

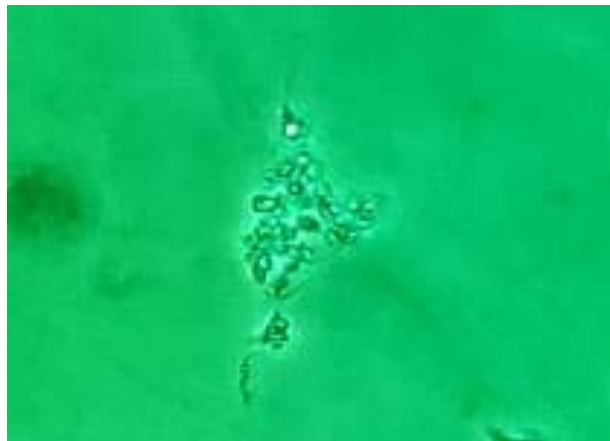
Aunque la resistencia a la anfotericina B es poco común, se han documentado casos aislados. La propagación de estos casos podría generar nuevas cepas de *Leishmania* con membranas plasmáticas más fluidas y sin ergosterol, lo que podría afectar la afinidad de este medicamento y comprometer su éxito terapéutico. (Sanchez, 2015). La atención constante a la resistencia y la adaptación de enfoques terapéuticos son esenciales para abordar la complejidad de la evolución de la respuesta parasitaria frente a los tratamientos disponibles.

Se requiere profundizar la experimentación *in vitro* e *in vivo* de lo presentado en este trabajo, ya que, de ser funcional en un modelo *in vivo* podría darnos indicio de un posible tratamiento que sirva para las diferentes manifestaciones de la enfermedad.

No fue posible comprobar la eficacia de los fármacos frente a amastigotes de *L. Infantum*, debido a la complejidad de su cultivo axénico. Se transformaron  $10^7$  promastigotes en

medio 199 modificado con sales de Hank, suplementado con 20% de suero fetal bovino a una temperatura de  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . (Seren D, 1997)

Sin embargo, no se logró el cultivo axénico de amastigotes, se realizaron varios experimentos en donde se identificaron varias problemáticas. La primera fue, que los amastigotes una vez transformados no se reproducían, manteniendo el mismo número de parásitos todo el tiempo; la segunda fue el número de promastigotes a transformar, se requirió aumentar a  $2 \times 10^7$  para lograr la supervivencia. Por último, los amastigotes convertidos presentaban una forma amorfa y poca vitalidad (ilustración 24), después de consultarlo con ciertos expertos del tema, se añadió orina humana estéril procedente de hombres jóvenes sanos, obteniendo una forma redondeada y vitalidad en los cultivos, pero sin reproducción (ilustración 25).



*Ilustración 24. Amastigotes de L. infantum aglomerados y con poca vitalidad*



*Ilustración 25. Amastigotes de L. Infantum en un medio con orina humana estéril presentando forma redondeada y de gran vitalidad*



En cuanto a la seguridad en el uso de estos fármacos, debido a una baja virulencia de la cepa usada, el tiempo de los experimentos y la poca disponibilidad de ratones, no se pudo comprobar la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* en un modelo murino, por lo que se hace uso de bibliografía disponible para este punto de la investigación.

Al utilizar una metodología de reposicionamiento de fármacos, se trabajó con medicamentos ya estudiados y aprobados para el uso en humanos, nos podemos basar en literatura ya existente, como la del metaanálisis de Serkan Yilmaz y colaboradores en 2018, donde recopilaron información sobre la seguridad en el uso del clomifeno en donde ciertos estudios han evidenciado que presenta propiedades genotóxicas y citotóxicas. Aunque no se presentó una asociación significativa en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, por lo que, su uso no mayor a 6 rondas de tratamiento se considera seguro tanto para hombres como mujeres.

Erick Wooltorton en 2002, realizó una revisión bibliográfica sobre el uso del tamoxifeno en donde se advierte las complicaciones y reacciones adversas del tratamiento. En diversos ensayos de corto y mediano plazo se identificaron cáncer de endometrio, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y cataratas. En un estudio de seguimiento a largo plazo se presentó el aumento de las tasas de accidente cerebrovascular, sarcoma uterino y adenocarcinoma endometrial. Por lo que, se debe de valor de manera importante el riesgo beneficio.

Sifontes S. al experimentar en un modelo animal la eficacia de ambos fármacos frente a *L. Mexicana*, identifico lesiones uterinas en aquellos ratones tratados con tamoxifeno, concordantes con los reportes de cáncer cervicouterino en mujeres.

## **9.2 Comprobación *in vivo* de la amorolfina como posible tratamiento para la leishmaniasis cutánea por *L. Mexicana***

Durante el primer experimento con amorolfina en ungüento, no se observaron resultados favorables ya que presentaba similitudes con el grupo sin tratamiento, en contraste, la presentación en laca parecía indicar éxito al obtener pesos de la lesión similares al grupo tratado con anfotericina B, aunque la diferencia no era significativa, los resultados *in vitro* obtenidos por Sifontes S. en 2023 y la capacidad de ciertos antifúngicos como la anfotericina B de ser tratamientos efectivos o el itraconazol, (María Belén Castaño, 2016) proporcionaban un contexto alentador para este compuesto.

Tras consultar los hallazgos con diferentes expertos en el tema, nos enfocamos en realizar una revisión más detallada y con el objetivo de mejorar las condiciones experimentales, se usó un nuevo modelo de infección que permitiera una mejor cuantificación. En consecuencia, se decidió llevar a cabo un nuevo ensayo utilizando una diferente presentación comercial de la amorolfina y un enfoque bioinformático con el software ImageJ.

Lamentablemente, los resultados obtenidos no cumplían con las expectativas planteadas en el experimento. Se identificaron ciertos factores que podrían haber interferido, como el acicalamiento constante del producto por parte de los roedores, evitando así el tiempo necesario para que se generara un efecto terapéutico. Aunque se eligió la base de la cola como área de inoculación para contrarrestar este comportamiento, se observó un acicalamiento mutuo, donde las ratas limpiaban el producto unas a otras, concordante con conductas observadas por Bernal M. et al. En 2020. A pesar de estos desafíos, algunos casos de curación total de las úlceras tratadas con amorolfina en laca proporcionaron indicios alentadores sobre un posible tratamiento.

El Dimetilsulfóxido se utiliza principalmente como vehículo en numerosos medicamentos y compuestos debido a sus propiedades terapéuticas y farmacéuticas. Se ha reconocido por sus efectos como agente antiinflamatorio, analgésico local y sistémico, así como por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y su capacidad para mejorar la penetración en las membranas. (Hoang C, 2021) Por ello, se buscaba conocer su impacto en el experimento al ser usado como vehículo de la amorolfina.

Contrario a lo expresado por varios autores, se observó una respuesta inflamatoria en las patas de los roedores tratados con DMSO al 100%, que incluía enrojecimiento, sangrado y dolor en los ratones. En cambio, cuando se utilizó diluido al 50%, se obtuvieron resultados comparables con el grupo tratado con agua inyectable. Por lo tanto, se establece que el uso de DMSO como vehículo a esa concentración del 50% es óptimo, teniendo en cuenta sus propiedades beneficiosas y minimizando los efectos adversos observados a una concentración más elevada.

La experimentación con amorolfina como posible tratamiento para la leishmaniasis concluyó con resultados negativos en el tratamiento intralesional. No se observaron mejoras significativas entre el grupo tratado con amorolfina y el grupo sin tratamiento, mientras que los ratones tratados con Glucantime experimentaron una mejoría significativa. Estos hallazgos evidencian la incapacidad de la amorolfina como un tratamiento efectivo en mamíferos para la leishmaniasis, resaltando la importancia de continuar explorando otras opciones terapéuticas y estrategias para abordar esta enfermedad. Un enfoque destacado se centra en compuestos azoles, que han demostrado una gran capacidad inhibitoria *in vitro*, pero que, hasta ahora al probarse *in vivo*, han carecido de éxito terapéutico. Es crucial profundizar en el mecanismo de acción de estos compuestos en el parásito para comprender a mayor profundidad su inhibición y desarrollar estrategias que conduzcan al descubrimiento de nuevos tratamientos.

## 7 CONCLUSIONES

Se comparó ambos fármacos propuestos de manera *in vitro* con éxito, obteniendo una eficacia tres veces mayor del clomifeno frente al tamoxifeno, se requiere implementarlo en un modelo animal.

En cuanto a seguridad, es importante resaltar las advertencias de toxicidad del clomifeno para un uso seguro del fármaco y disminuir las complicaciones, pero en comparación con las presentadas del tamoxifeno, la poca relación con el desarrollo de cáncer y menores efectos adversos hace un perfil de uso más seguro.

Demostrando la hipótesis propuesta en esta investigación, que nos da indicio a un nuevo posible fármaco antileishmanial con un perfil más seguro y mayor eficacia que el tamoxifeno.

Sin embargo, debido a las problemáticas presentadas en la investigación, se requiere una mayor experimentación *in vitro* e *in vivo*, lo que da lugar a desarrollar futuras investigaciones en el tema, hasta un posible tratamiento tópico, si se demuestra su capacidad terapéutica y se desarrollan presentaciones en crema.

A pesar de los resultados *in vitro* prometedores presentados por Sifontes S. en 2023 sobre la amorolfina, los hallazgos *in vivo* revelan una capacidad antileishmanial nula. La experimentación con diversas presentaciones comerciales confirmó la falta de viabilidad de la amorolfina como posible tratamiento para la leishmaniasis. Estos resultados sugieren la importancia de considerar las diferencias entre las respuestas *in vitro* e *in vivo* al evaluar la eficacia de un compuesto, y refuerza la necesidad de usar modelos animales antes de realizar ensayos en humanos.

La metodología empleada de reposicionamiento de fármacos es viable para buscar alternativas que no requieren inversiones económicas excesivas y tiempos razonables. Continuar trabajando en esta metodología para abordar enfermedades desatendidas no solo puede llevar a la identificación de nuevas terapias, sino que también tiene el potencial de generar un impacto social importante al mejorar la salud y el bienestar en comunidades que enfrentan desafíos de acceso a tratamientos adecuados.

## 8 REFERENCIAS

- Abadías-Granado, D. P.-R. (2021). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Academia Española de Dermatología y Venereología*.
- Adriano C. Coelho, C. T.-Y. (2015). Leishmania is not prone to develop resistance to tamoxifen. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 77-83.
- Alberto Cortés, J. F. (2008). Especies de Lutzomyia en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*.
- Allan Ching Chacón, B. V. (2022). Leishmaniasis: evaluación clínica y diagnóstico. *Revista Médica Sinergia*.
- Ariza Márquez, Y. V., Briceño Balcázar, I., & Ancízar Aristizábal, F. (2016). Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. *Biotecnol*.
- Cañeda Guzmán, L. S. (2017). Leishmaniasis: Vectores. *Ciencia*.
- Carranza, R. (2015). Clomifeno: antiestrógenos inductores de la ovulación. *VAM*.
- Chabbert-Buffe, A. T. (2016). Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (MSRE). *EMC - Ginecología-Obstetricia*.
- Danilo C., J. K. (2008). Tamoxifen Is Effective in the Treatment of Leishmania amazonensis Infections in Mice. *NEGLECTED TROPICAL DISEASES*.
- Escobedo, A. (2001). Efectos colaterales del tratamiento sistémico del cáncer de mama. *ELSEVIER Medicina Integral*, 475-477.
- Fleta Zaragozano, R. M. (2001). Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. *ELSERVIER*, 264-269.
- Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39.
- Hernán Henao, Y. O. (2004). Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomedica*.
- Hidalgo Solís, V. R. (2021). Leishmaniasis cutánea. *Sinergia*.

- Hoang C, N. A. (2021). Aplicación del dimetilsulfóxido como agente terapéutico y vehículo farmacológico para enfermedades oculares. . *J Ocul Pharmacol Ther*, 441-451.
- Isaza-Jaimes, A., Rodríguez, J. E., Chacón, G., Silva, C., & Bravo, A. (2018). Una visión acerca de la Leishmaniasis americana y de su comportamiento. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*.
- María Belén Castaño, J. C. (2016). Leishmaniasis cutánea con buena respuesta al tratamiento con itraconazol . *Medicina cutánea Ibero-Latino-Americana*.
- Martin Aragon, J. B. (2004). Antimicoticos dermatologicos. *Farmacia profesional*, 38-49.
- Martín R, M. O. (2001). Leishmaniasis Visceral. *ELSEVIER*.
- Martínez-Méndez, D. B.-A.-H. (2023). Antifúngicos: lo que tenemos, lo que tendremos, lo que queremos. *Investigación Clínica* 64, 539-556.
- Monge-Maillo, L.-V. (2021). Anfotericina B liposomal en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Organizacion Mundial de la Salud. (2023). *Leishmaniasis*.
- Parra, H. H. (2021). Reposicionamiento de fármacos para la Enfermedad de Parkinson y estrategias de nanotecnología farmaceutica para su optimización. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional*.
- Perea, A. (2021). Anfotericina B liposomal: farmacología clínica, farmacocinética y farmacodinamia. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Piccolo Johanning, P. E. (2018). Leishmaniasis: Opciones terapéuticas en la población pediátrica. *Medicina Legal de Costa Rica Edición Virtua*.
- Ricciardi, V. d. (2009). Terapéutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gaceta Medica de Caracas*.
- Romero, A. (2000). El mundo de la pobreza. *Tendencias*, 35-59.
- Rosal Rabesa, B.-A. G. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Pediatría Atención Primaria*.
- Sanchez, S. G. (2015). Mecanismo de resistencia a la Miltefosina en Leishmania: Caracterización proteica de la subunidad LiRos3. *Universidad de Granada*.
- Sánchez-Puelles, J. M. (2020). Reposicionamiento de fármacos: viejos fármacos en nuevas terapeuticas. *Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas*, 12.
- Scholar, E. M. (2010). Tamoxifen. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1-8.

- Secretaria de Salud de México. (2022). *Guía para la Atención Médica de la Leishmaniasis en México*. México.
- Sereno D, L. J. (1997). Axenically Cultured Amastigote Forms as an In Vitro Model. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 972-976.
- Serkan Yilmaz, N. Y. (2018). Seguridad del citrato de clomifeno: una revisión de la literatura. *Citotecnología*.
- Sifontes, S. (2017). Descubrimiento racional de compuestos químicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas. *Universidad Computense de Madrid*.
- Siria, R. L. (2021). Reposicionamiento de fármacos como estrategia para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. *Universidad de Sevilla*, 6-8.
- Vásquez, L. S. (2002). Mecanismos de transmisión de la leishmaniasis. *Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- Vidal, C. M. (2022). Reposicionamiento farmacológico; nuevos usos de medicamentos conocidos. *La Crónica y el Portal Comunicación Veracruzana*.