

Eficacia oral e intralesional del ascaridol en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *Leishmania amazonensis*

Oral and intralesional efficacy of ascaridole in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania amazonensis*

Laura Machín Galarza^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-0708-6789>

Jorge Lázaro Alcantar Socarras¹ <https://orcid.org/0000-0003-3398-4117>

Lars Gille² <https://orcid.org/0000-0003-1223-0201>

Lianet Monzote Fidalgo³ <https://orcid.org/0000-0002-1958-809X>

¹ Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba.

² Universidad de Medicina Veterinaria de Viena. Instituto de Farmacología y Toxicología. Austria.

³ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: lauramachinlaura@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La leishmaniasis, parasitosis causada por especies de protozoos del género *Leishmania*, es un problema de salud de incidencia mundial incluido en la lista de enfermedades tropicales desatendidas. La utilización de medicamentos convencionales está limitada por su alto costo, desarrollo de resistencia y ocurrencia de efectos adversos. En estudios previos se demostró la eficacia del ascaridol por vía intralesional en la leishmaniasis cutánea experimental en ratones BALB/c y se recomendó profundizar en la evaluación antileishmanial *in vivo* de este endoperóxido.

Objetivo: Evaluar las potencialidades del ascaridol en dos modelos de leishmaniasis cutánea experimental basados en ratones BALB/c (susceptible) y C57BL/6 (resistente).

Métodos: Se midió la variación del peso, la evolución del tamaño de la lesión y la carga parasitaria en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. amazonensis* y tratados por vía oral o intralesional, con cinco tratamientos de 30 mg/kg cada cuatro días.

Resultados: En ambos modelos, los animales que se trataron con ascaridol mostraron tamaños de lesión y carga parasitaria menores que el grupo infectado sin tratamiento ($p < 0,05$) y comparables al Glucantime ($p > 0,05$), fármaco de referencia. En el modelo C57BL/6 - *L. amazonensis* se resaltó la capacidad del ascaridol de controlar el desarrollo de la enfermedad tras la administración intralesional.

Conclusiones: Se demuestran las potencialidades *in vivo* del ascaridol sobre *L. amazonensis*. Se recomienda explorar este fármaco en el diseño de nuevos medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Palabras clave: ascaridol; *Leishmania amazonensis*; leishmaniasis cutánea; BALB/c; C57BL/6.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis parasitosis caused by species of protozoa of the genus *Leishmania* is a health problem of worldwide incidence included in the list of neglected tropical diseases. The use of conventional drugs is limited by their high cost, development of resistance and occurrence of adverse effects. Previous studies demonstrated the efficacy of intralesional ascaridole in experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice and recommended further evaluation of *in vivo* antileishmanial properties of this endoperoxide.

Objective: To evaluate the potentialities of ascaridole in two models of experimental cutaneous leishmaniasis based on BALB/c (susceptible) and C57BL/6 (resistant) mice.

Methods: Weight variation, lesion size evolution and parasite load were measured in BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. amazonensis* and treated orally or intralesionally, with five 30 mg/kg treatments every four days.

Results: In both models, animals treated with ascaridole showed smaller lesion sizes and parasite load than the untreated infected group ($p < 0.05$) and comparable to Glucantime ($p > 0.05$), the reference drug. In the model C57BL/6 - *L. amazonensis*, the ability of ascaridole to control the development of the disease after intralesional administration was highlighted.

Conclusions: The *in vivo* potentialities of ascaridole on *L. amazonensis* are demonstrated. It is recommended to explore this drug in the design of new drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: ascaridole; *Leishmania amazonensis*; cutaneous leishmaniasis; BALB/c; C57BL/6.

Recibido: 07/03/2022

Aceptado: 25/09/2022

Introducción

Los endoperóxidos (EP) son moléculas que se distinguen por presentar un enlace O-O entre dos átomos de carbono de un anillo cíclico. Ahí, la ruptura del enlace del peróxido tiene como consecuencia la formación de radicales centrados en el oxígeno y centrados en el carbono.⁽¹⁾

Recientemente, se abordaron los estudios y se observó que los EP obtenidos de diferentes fuentes demostraron actividad antiprotozoaria, especialmente frente a *Leishmania*.⁽²⁾

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por parásitos protozoos digenéticos del orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*.⁽³⁾ Se transmite a los humanos por la picadura de insectos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*,⁽⁴⁾ y presenta una variedad clínica que incluye complicaciones cutáneas (LC), mucocutáneas y viscerales.⁽⁵⁾ Aproximadamente, cada año se diagnostican dos millones de nuevos casos en regiones tropicales y subtropicales en casi 100 países y más de 1 billón de personas viven en riesgo de contraer la infección.⁽⁶⁾

Entre las medidas para reducir la prevalencia de esta enfermedad se incluye el tratamiento oportuno. Sin embargo, los medicamentos disponibles presentan limitaciones como desarrollo de resistencia, la necesaria administración parenteral, la elevada toxicidad y costo. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.^(7,8)

Una posible alternativa pudiera ser el EP ascaridol (ASC), el cual fue capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* y controlar el desarrollo de la LC en ratones BALB/c infectados experimentalmente.^(9,10) Además, se demostró que su enlace EP se rompe en presencia del Fe^{2+} , proveniente o no del grupo hemo, y da lugar a radicales que se centran en el carbono. Estas especies, que desencadenan estrés oxidativo intracelular, son esenciales en las acciones biológicas del ASC, particularmente en la actividad antileishmanial.⁽¹¹⁾

Con la finalidad de poder recomendar el ASC como una posible alternativa antileishmanial, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las potencialidades del ASC en dos modelos de leishmaniasis cutánea experimental basados en ratones BALB/c (susceptible) y C57BL/6 (resistente).

Métodos

Se utilizó una cepa de referencia de *L. amazonensis* (MHOM/77/LTB0016) que la proporcionó el Departamento de Inmunología de la Fundación Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil. En el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK; La Habana, Cuba), la cepa se conservó en ratones BALB/c, de cuyas lesiones cutáneas se realizó un aspirado con jeringuilla que se depositó en un tubo de cultivo estéril en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), se suplementó con una solución de 200 UL de penicilina sódica y 200 µg/mL estreptomicina (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) y 10 % de suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) inactivado (30 min a 56 °C). Los parásitos se mantuvieron con pases cada tres o cuatro días hasta el momento de su utilización.

Se emplearon ratones BALB/c y C57BL/6 jóvenes-adultos hembras (18-22 g) suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB; Mayabeque, Cuba), con su correspondiente certificado de calidad. Las condiciones sanitarias empleadas fueron: régimen de luz-oscuridad (12-12 horas), alojamiento en cajas de macrolón T2 habilitadas con bagazo de caña desmeollado como cama y esterilizado por autoclave, y pienso concentrado para roedores (CENPALAB; Mayabeque, Cuba) como alimento, además agua para consumirse libremente.

El protocolo aplicado en el manejo de los animales fue supervisado por el Comité de Ética del IPK con número de aprobación CEI-IPK 16-16. En este sentido, se respetaron las guías recomendadas para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio; así como las normas establecidas según la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, 22 de septiembre de 2010).

Cada animal del estudio se infectó con 5×10^6 promastigotes en fase de crecimiento estacionaria en un volumen de 50 µL de solución salina fisiológica estéril (SSFE; IMEFA, La Habana, Cuba), en los cojinetes plantares de la extremidad posterior derecha en vista ventral, por vía subcutánea, lo que se consideró como el día 0 posinfección (p.i.).

Con el objetivo de reunir información preliminar sobre la relación dosis-respuesta y la toxicidad de nuevos candidatos frente a la LC, se utilizaron, con frecuencia modelos murinos basados en BALB/c – C57BL/6 infectados con *L. amazonensis*.⁽¹²⁾ El primero constituye un modelo extremadamente susceptible que requiere de un período extendido de tratamiento para controlar el desarrollo de las lesiones; mientras que el segundo muestra una mayor resistencia,

y desarrolla pequeñas lesiones crónicas que curan espontáneamente como ocurre en el humano.⁽¹³⁾

Actividad antileishmanial

El ASC lo donó el Instituto de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Veterinaria de Viena, Austria, con una pureza del 95 % y diluido en dimetilsulfóxido (DMSO; BDH, Poole, Inglaterra) a 40 mM. El Glucantime (Rhône-Poulenc Rorer, Ciudad de México, México) disuelto en SSFE a 82 mM que se utilizó como fármaco de referencia.

El día 30 p.i. los animales se distribuyeron aleatoriamente en siete grupos experimentales de ocho ratones BALB/c o C57BL/6: grupo I - ASC oral (BALB/c); grupo II - Glucantime iL (BALB/c); grupo III - control sin tratamiento (BALB/c); grupo IV - ASC oral (C57BL/6); grupo V - ASC iL (C57BL/6); grupo VI - Glucantime iL (C57BL/6) y grupo VII - control sin tratamiento (C57BL/6). A partir de este momento, se inició el tratamiento correspondiente (30 mg/kg en 50 µL) cada cuatro días a completar cinco tratamientos.

Diariamente, los animales fueron chequeados para observar la ocurrencia de muertes y se pesaron en una balanza técnica (Sartorius, Goettingen, Alemania) cada 7 días. A partir de las mediciones realizadas se calculó la variación en el peso corporal y se consideraron las diferencias entre el inicio del tratamiento (semana 4 p.i.) y el final del experimento (semana 10 p.i.). Además, semanalmente, se midió el tamaño de ambas extremidades posteriores de los animales, en dirección dorso-ventral con un cutímetro (Krøplin Längenmesstechnik, Alemania) y se determinó la diferencia entre la extremidad infectada y no infectada. En este caso, se obtuvo un promedio por grupo con su correspondiente desviación estándar (DE).

Finalmente, se determinó la carga parasitaria de la zona infectada en las semanas 6 y 10 p.i. mediante el método de microtitulación en placas de 96 pozos.⁽¹⁴⁾ Para ello, tres animales por grupo fueron seleccionados al azar y sometidos a eutanasia por dislocación cervical. Dentro de un gabinete de seguridad se desinfectó la región infectada con etanol al 70 %, se eliminó la piel y se tomaron muestras del tejido subcutáneo infectado. Luego de pesarlas en balanza analítica (Sartorius, Goettingen, Alemania) y homogenizarlas en una placa Petri con 4 mL de medio Schneider y los antibióticos correspondientes, se tomaron 15 µL del homogenado y se adicionaron en la primera y la séptima columna de una placa de 96 pozos de fondo plano, a los que se había añadido previamente 185 µL del mismo medio.

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (1:4) y la placa se incubó a 26 °C. A los 15 días se observó la presencia o no de promastigotes móviles en cada pozo, para ello se usó un

microscopio invertido (Olympus, Tokyo, Japón) a 400 ×. El título final se determinó teniendo en cuenta la última dilución donde se observó al menos un promastigote móvil. La carga parasitaria por gramo (g) se calculó mediante la expresión: carga parasitaria = (Peso de la muestra (g) × Título⁻¹) × 400; donde el título se refiere al último pozo o dilución con promastigotes móviles previamente observado al microscopio.

A partir de estos resultados se calculó el Log₁₀ de la carga parasitaria para cada animal, además de la media y DE para cada grupo experimental. En la semana 10 p.i., se calculó la reducción de la infección (%) respecto al control no tratado, mediante la expresión: reducción de la infección (%) = 100 – (índice de tratados × índice de controles⁻¹) × 100; donde cada índice es el resultado de la multiplicación del tamaño de la lesión por la carga parasitaria de cada grupo. Para identificar si existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de tratamiento, se aplicó un análisis de varianza de clasificación doble con mediciones repetidas (ANOVA), seguido de una prueba de comparación planificada (post hoc test o LDS test). El procesamiento estadístico se realizó con el programa STATISTICA para Windows, Versión 4.5, 1993.

Resultados

Entre el inicio del tratamiento y final del estudio no hubo muertes en ninguno de los grupos experimentales, ni se evidenciaron pérdidas en el peso promedio de los animales (Tabla 1).

Tabla 1 – Comportamiento del peso corporal en ratones infectados con *L. amazonensis* según grupo de tratamiento

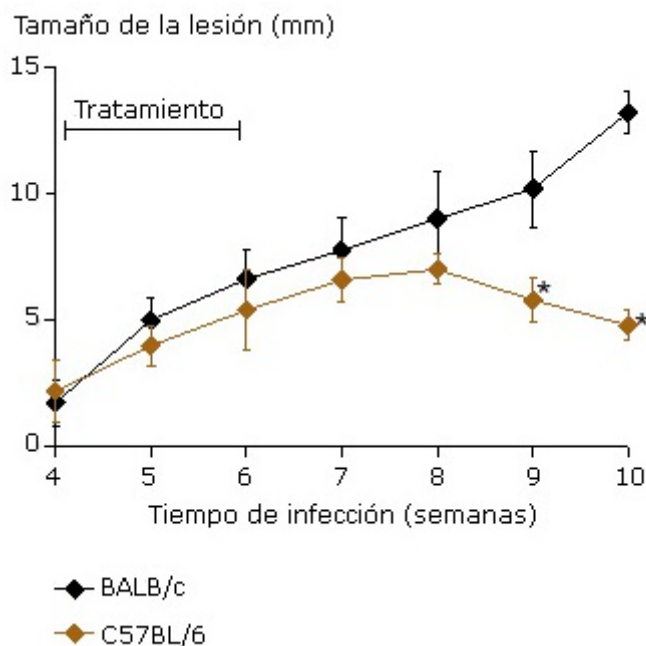
Grupos de tratamiento ^a	Línea animal	Peso corporal promedio (g) ^b		Variación del peso corporal (%) ^c
		Semana 4 p.i.	Semana 10 p.i.	
Ascaridol-oral	BALB/c	21,5	22,0	2,0
Glucantime®-iL		22,1	23,3	5,0
Control		21,0	21,8	3,9
Ascaridol-oral	C57BL/6	23,3	24,0	3,1
Ascaridol-iL		23,4	23,9	2,3
Glucantime®-iL		22,7	22,9	1,0
Control		22,7	23,6	4,1

^a: todos los tratamientos fueron administrados a partir de la semana 4 posinfección (p.i.) a una dosis de 30 mg/kg en 50 µL por vía oral o intralesional (iL), cada cuatro días hasta completar cinco administraciones, excepto los animales controles que no recibieron tratamiento;

^{bb}: Peso en el inicio del tratamiento (semana 4 p.i.) y final del experimento (semana 10 p.i.);

^{ccc}: Ganancia de peso corporal entre la semana 4 p.i. (inicio del tratamiento) y la semana 10 p.i. (final del experimento).

En modo general, en los ratones C57BL/6 se registraron tamaños de lesión inferiores a los observados en BALB/c, lo cual se evidenció entre los grupos infectados sin tratamiento (Fig. 1). Además, a las 10 semanas p.i. se observó una tendencia a la disminución espontánea de las lesiones.

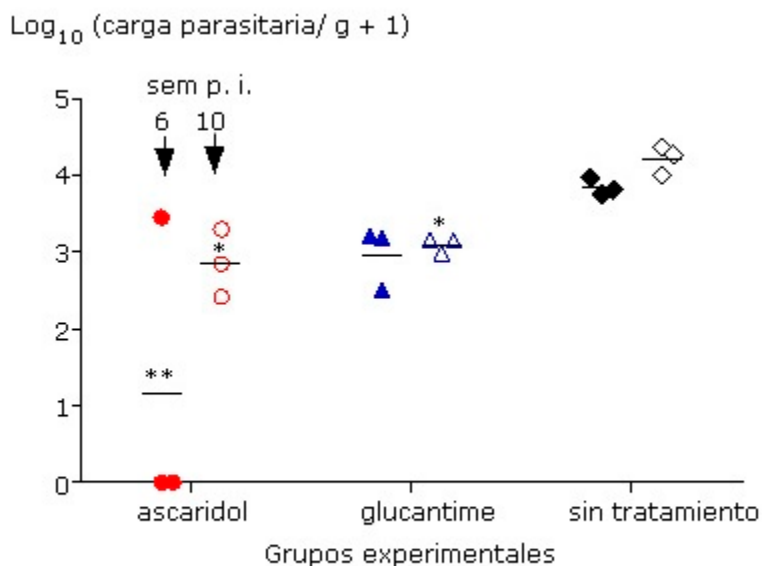
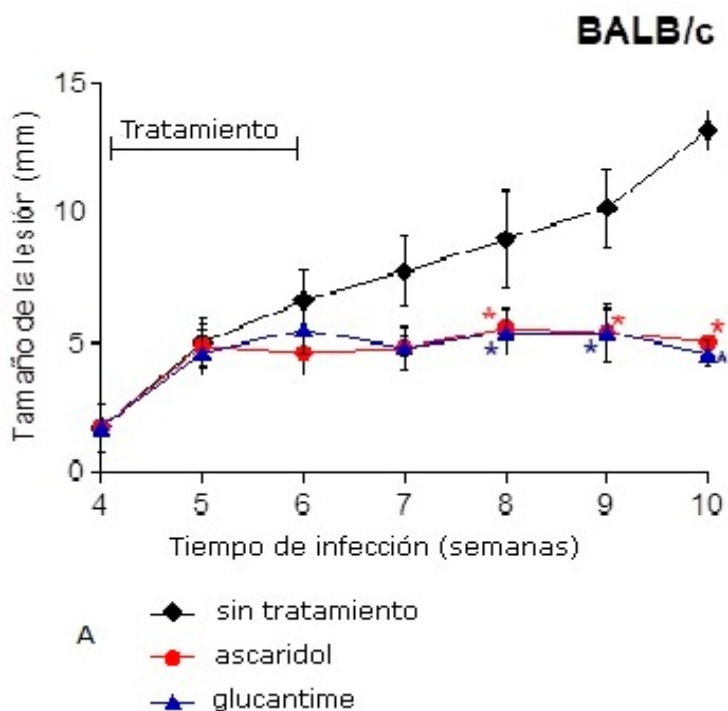


*: Diferencias significativas con respecto a la línea BALB/c ($p < 0,05$).

Fig. 1 - Tamaños de lesión en ratones BALB/c y C57BL/6 experimentalmente infectados con *Leishmania amazonensis*. El día 0 posinfección los animales se infectaron (5×10^6 promastigotes) por vía subcutánea en el cojinete plantar de la extremidad posterior derecha en vista ventral.

En la figura 2A se muestra el comportamiento del tamaño de la lesión en los ratones BALB/c de los diferentes grupos experimentales. Se puede apreciar que, a partir de la semana 7 p.i., el tratamiento con ASC por vía oral resultó en un tamaño de lesión inferior en comparación con la ausencia de tratamiento ($p < 0,05$) y similar a la administración del Glucantime ($p > 0,05$). En cuanto a la carga parasitaria determinada en los sitios de infección de estos animales (fig. 2B), en la semana 6 p.i., en los animales tratados con ASC se observó una reducción significativa ($p < 0,05$) respecto al resto de los grupos. En este sentido, dos ratones mostraron una carga parasitaria indetectable, a diferencia de los animales tratados con Glucantime y los no tratados, que presentaron una carga parasitaria detectable. Adicionalmente, en la semana 10 p.i. la carga parasitaria promedio detectada en las lesiones de este grupo fue inferior ($p < 0,05$) en relación con los animales sin tratar y similar a la mostrada por los animales tratados con el

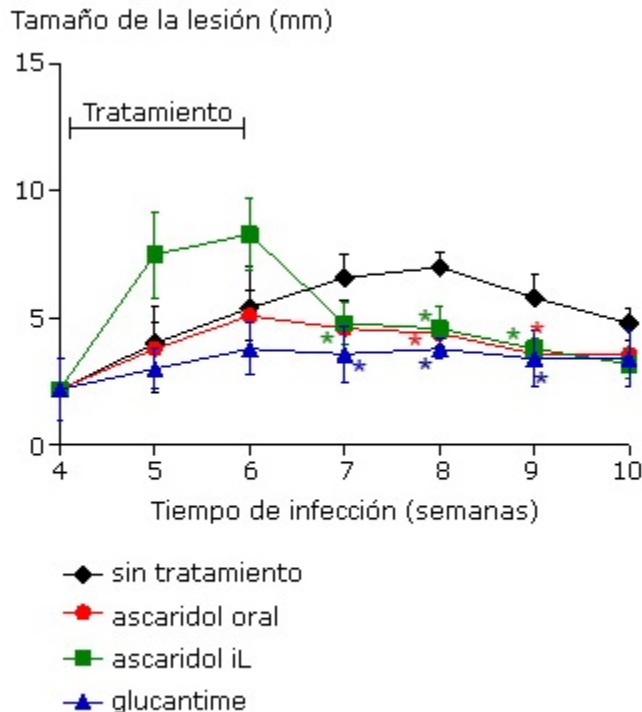
Glucantime ($p > 0,05$). A partir de los resultados, se apreció que al final del experimento (semana 10 p.i.) el porcentaje de reducción de la infección para los grupos tratados con ASC y Glucantime fue, en ambos casos, de 74 %.



*Indica diferencias significativas respecto al grupo infectado sin tratamiento ($p < 0,05$). ** Indica diferencias significativas respecto al grupo tratado con Glucantime® ($p < 0,05$).

Fig. 2 – Efecto del ascaridol en ratones BALB/c experimentalmente infectados con *Leishmania amazonensis*. A) Tamaños de lesión. B) Carga parasitaria detectada en las semanas 6 (símbolos rellenos) y 10 (símbolos sin relleno) posinfección (p.i.), donde las barras horizontales representan el promedio por grupo en cada semana. El tratamiento (30 mg/kg en 50 μ L, cinco administraciones cada cuatro días) con ascaridol (oral) o Glucantime (intralesional) se inició a partir de la cuarta semana posinfección.

En la figura 3A se muestra el comportamiento del tamaño de la lesión en los ratones C57BL/6. En general, no se observaron diferencias entre los grupos tratados ($p > 0,05$). Desde la semana 7 p.i. el tratamiento con ASC por vía iL disminuyó el tamaño de la lesión de forma significativa en comparación con el grupo sin tratamiento ($p < 0,05$). Los animales tratados por vía oral fueron capaces de disminuir el tamaño de la lesión en las semanas 8 y 9 p.i. en relación con el grupo que no fue tratado ($p < 0,05$). Respecto al grupo tratado con el fármaco de referencia, se observaron resultados similares ($p > 0,05$) en las semanas 7 – 10 p.i.



A

Discusión

Leishmania amazonensis es uno de los agentes responsables de LC en América, y puede causar una forma difusa de la enfermedad en algunos pacientes. La aparición de lesiones como úlceras, nódulos y pápulas en brazos, piernas y rostro, se ha asociado a la diseminación de los parásitos debido a una ineficiente respuesta inmune.⁽¹⁵⁾ Por tanto, los estudios encaminados a la búsqueda de nuevas opciones antileishmaniales y que se realizan en esta especie constituyen un punto a favor de contribuir al reclamo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que cada año demanda nuevos esfuerzos para el control y prevención de esta parasitosis tropical.^(7,8)

Los resultados de este trabajo responden a la estrategia de ensayo de nuevos fármacos para la LC. En este sentido, se deben reunir evidencias sobre su efectividad al administrarlos por vía oral y con la utilización de una dosis menor de 30 mg/kg/día. Para considerar a un candidato ideal o aceptable, desde la etapa preclínica de investigación, se establece un máximo 7 y 28 días de tratamiento, respectivamente.⁽¹⁶⁾

A partir de las observaciones diarias que se realizaron a lo largo del experimento, en términos de mortalidad y ganancia en peso, se pudo corroborar que la administración del ASC resultó segura durante el tratamiento de la LC en murinos. Este resultado es importante porque una de las desventajas de los medicamentos antileishmaniales convencionales es su elevada toxicidad.⁽¹⁷⁾

En correspondencia con las características inmunológicas de las líneas murinas utilizadas, se conoce que los C57BL/6 muestran mayor resistencia a la enfermedad con respecto a los BALB/c. En varios trabajos, ratones BALB/c y C57BL/6 exhibieron diferentes susceptibilidades a la infección por *Leishmania*.^(12,18,19) Por ejemplo, tras la infección con *L. panamensis* se detectaron parásitos en el sitio de inoculación de animales de ambas líneas. Sin embargo, se observó una carga parasitaria menor en C57BL/6.⁽²⁰⁾ En otro estudio, ratones BALB/c y C57BL/6 experimentalmente infectados con *L. amazonensis* mostraron cargas de parásitos, tamaños de lesión e infiltrados celulares similares hasta 6 semanas p.i. Después de este tiempo, los ratones C57BL/6 fueron capaces de controlar la infección, lo que indicó que el entorno *in vivo* explica las diferencias en la susceptibilidad a la infección.⁽²¹⁾

Aunque al término de este estudio, las lesiones cutáneas no estaban completamente curadas en los ratones BALB/c, el porcentaje que se alcanzó de la reducción de la infección permite afirmar que el tratamiento oral con ASC es capaz de controlar el desarrollo de la LC experimental. Previamente, en este modelo *in vivo* se demostró la eficacia antileishmanial del

ASC por vía iL, los animales que se trataron aquí mostraron un tamaño de lesión y una carga parasitaria inferiores al grupo sin tratamiento.⁽¹⁰⁾

Si se comparan las observaciones del presente trabajo con un estudio reciente de nuestro grupo,⁽²²⁾ en el que se empleó la vía iL, en modo general por ambas vías de administración se logra un resultado similar. Este hallazgo presenta especial importancia porque la vía oral es la más asimilada por los pacientes, particularmente en largos esquemas de tratamiento. A diferencia de la vía parenteral, se distingue por ser menos invasiva y no dolorosa, lo cual favorece la adherencia a la terapia. En esta dirección, el ASC cumple con la regla de los cinco (RO5) descrita por Lipinski, la cual describe las propiedades moleculares con importancia farmacocinética y que se asocian a la biodisponibilidad de los fármacos tras la administración oral, lo que permite predecir su posible comportamiento. Según *Lipinski* y otros, una molécula cumple con la RO5 si presenta: (I) peso molecular < 500 Da, (II) número de átomos aceptores de enlace de hidrógeno ≤ 10 , (III) número de átomos donadores de enlace de hidrógeno ≤ 5 , (IV) coeficiente de partición octanol – agua ≤ 5 y (V) refractividad molar de 40 a 130 A². Esta regla establece que para que un fármaco pueda administrarse por vía oral no debe violar más de una de las consideraciones anteriores.⁽²³⁾

En relación con la evaluación oral, solo se tuvieron evidencias de la actividad antileishmanial del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, en el cual se reconoció al ASC como el principal responsable de su actividad biológica.^(9,10) Tras la administración de diferentes dosis de este aceite (30 – 150 mg/kg), durante 15 días y en similar modelo de infección en ratones BALB/c, se observaron tamaños de lesión inferiores ($p < 0,05$) al grupo sin tratamiento.⁽²⁴⁾ En adición, la efectividad oral del aceite (30 mg/kg; 100 μ L; 15 días) fue superior al tratamiento iL y al de referencia (anfotericina B; 1 mg/kg; 100 μ L; 15 días).⁽²⁵⁾ En modo general, la eficacia oral que se observó para el ASC está en correspondencia con la eficacia *in vivo* observada para el aceite, aunque en el actual trabajo se empleó un menor número de administraciones.

En el caso particular de la LC experimental, la infección con *L. amazonensis* en ratones BALB/c constituye uno de los principales modelos animales utilizados para evaluar las potencialidades de nuevos fármacos.⁽²⁶⁾ Sin embargo, esta línea murina no es la que mayormente se recomienda en la literatura con estos propósitos, debido a que por su elevada susceptibilidad a la infección, fármacos con actividad antileishmanial pueden ser descartados por no lograr la cura completa en estas condiciones experimentales.^(27,28) No obstante, es de

esperar que aquellos agentes capaces de reducir la infección en esta línea animal puedan curar la enfermedad en modelos animales más resistentes.

Adicionalmente, se evaluó la actividad oral e iL del ASC en un modelo de LC basado en *L. amazonensis*-C57BL/6. Las lesiones más pequeñas y la menor carga parasitaria fueron detectadas tras la administración iL, aunque no se detectaron diferencias significativas con respecto al tratamiento oral y al grupo de referencia. Los ratones C57BL/6 son susceptibles a *L. amazonensis* pero, a diferencia de los BALB/c, desarrollan pequeñas lesiones crónicas que curan espontáneamente como ocurre en el humano.^(13,29) Por tanto, la investigación resalta la capacidad del ASC de disminuir el tiempo de cura de las lesiones, así como de controlar la carga parasitaria.

Se concluye que por primera vez se demostró la eficacia oral e iL del ASC frente a la LC experimental causada por *L. amazonensis*, en dos modelos murinos de diferente susceptibilidad. Las observaciones presentadas sugieren el desarrollo del ASC para el tratamiento de la leishmaniasis. Se recomienda en futuros trabajos evaluar las potencialidades de la administración combinada del ASC con otros fármacos antileishmaniales de referencia.

Referencias bibliográficas

1. Fudickar W, Linker T. Release of singlet oxygen from aromatic endoperoxides by chemical triggers. *Angew Chem Int.* 2018;57(39):12971-5. DOI: 10.1002/anie.201806881.
2. Dembitsky VM, Ermolenko E, Savidov N, Glorizova TA, Poroikov VV. Antiprotozoal and antitumor activity of natural polycyclic endoperoxides: origin, structures and biological activity. *Molecules.* 2021;26(3):686. DOI: 10.3390/molecules26030686.
3. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. *Biology and epidemiology Academic Press.* London. 1987 [acceso 05/01/2022];(1):1-120. Disponible en: <https://patua.iec.gov.br/handle/iec/2715>
4. Reimão JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: current and future methods. *Microorg.* 2020;8(11):1632. DOI: 10.3390/microorganisms8111632.
5. Volpedo G, Huston R, Holcomb E, Pacheco T, Gannavaram S, Bhattacharya P, *et al.* From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. *Expert Rev Vaccines.* 2021;20(11):1431-46. DOI: 10.1080/14760584.2021.1969231.

6. Pacheco-Fernandez T, Volpedo G, Gannavaram S, Bhattacharya P, Dey R, Satoskar A, *et al.* Revival of Leishmanization and Leishmanin. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:639801. DOI: 10.3389/fcimb.2021.639801.
7. Olías AI, de la Fuente C, Cuquerella M, Torrado JJ, Alunda JM. Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model? *Microorganisms.* 2021;9(12):2500. DOI: 10.3390/microorganisms9122500.
8. Daga MK, Rohatgi I, Mishra R. Leishmaniasis. *Indian J Crit Care Med.* 2021;25(2):166-70. DOI: 10.5005/jp-journals-10071-23844.
9. Monzote L, García M, Pastor J, Gille L, Scull R, Maes L, *et al.* Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Exp Parasitol.* 2013;136:20-6. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.10.007.
10. Monzote L, García M, Scull R, Cuellar A, Setzer WN. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytother Res.* 2014;28(5):753-8. DOI: 10.1002/ptr.5055.
11. Geroldinger G, Tonner M, Hettegger H, Bacher M, Monzote L, Walter M, *et al.* Mechanism of ascaridole activation in *Leishmania*. *Biochem Pharmacol.* 2017;132:48-62. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.02.023.
12. Bhattacharya A, Corbeil A, do Monte R, Fernandez C. Of drugs and trypanosomatids: New tools and knowledge to reduce bottlenecks in drug discovery. *Genes (Basel).* 2020;11(7):722. DOI: 10.3390/genes11070722.
13. Probst CM, Silva RA, Menezes JP, Almeida TF, Gomes IN, Dallabona AC, *et al.* A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. *BMC Microbiol.* 2012;12:22. DOI: 10.1186/1471-2180-12-22.
14. Buffet P, Sulahian A, Garin Y, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(9):2167-8. DOI: 10.1128/aac.39.9.2167.
15. Hong A, Andrade R, Jon J, Maria L, Laranjeira-Silva F. One health approach to leishmaniasis: understanding the disease dynamics through diagnostic tools. *Pathogens.* 2020;9(10):809. DOI: 10.3390/pathogens9100809.
16. Caridhna D, Vesely B, Van Bocxlaer K, Arana B, Mowbray C, Rafati S, *et al.* Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *IJP: Drug Drug Resist.* 2019;11:106-17. DOI 10.1016/j.ijpddr.2019.06.003.

17. Serbate Á, Margotto C, da Silva MF, Silva SA, Moreira AM, Parreiras MA. Adverse reactions to meglumine antimoniate in Brazilian inpatients with visceral leishmaniases: A case series. *J Clin Pharm Ther.* 2020;45(3):573-6. DOI: 10.1111/jcpt.13089.
18. Restrepo CM, Llanes A, Herrera L, Ellis E, Leonart R, Fernández PL. Gene expression patterns associated with *Leishmania panamensis* infection in macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(2):e0009225. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009225.
19. Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet.* 2006;7(4):294-305. DOI: 10.1038/nrg1832.
20. Herrera L, Llanes A, Alvarez J, Degracia K, Restrepo CM, Rivera R, *et al.* Antileishmanial activity of a new chloroquine analog in an animal model of *Leishmania panamensis* infection. *Int J Parasitol Drugs Drug Resis.* 2020;14:56-61. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2020.08.002.
21. Velasquez L, Galuppo M, Rezende E, Brandão W, Peron JP, Uliana S, *et al.* Distinct courses of infection with *Leishmania (L.) amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitol.* 2016;143(6):692-703. DOI: 10.1017/S003118201600024X.
22. Machín L, Nápoles R, Gille L, Monzote L. *Leishmania amazonensis* response to artemisinin and derivatives. *Parasitol Int.* 2021;80:102218. DOI: 10.1016/j.parint.2020.102218
23. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Dis Today Technol.* 2004;4(1):337-41. DOI: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
24. Monzote L, García M, Montalvo AM, Linares R, Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. *Forsch Komplementmed.* 2009;16(5):334-8. DOI: 10.1159/000237741.
25. Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomed Pharmacother.* 2007;61(2-3):148-53. DOI: 10.1016/j.biopha.2006.12.001.
26. Briones CA, Cid A, Romero AI, García MF, Villegas M, Bermúdez JM. An appraisal of the scientific current situation and new perspectives in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2021;221:105988. DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.105988.

27. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to Leishmania infection. Indian J Med Res. 2004 [acceso 01/02/2022];119(6):238-58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15243162/>
28. Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(9):e0003889. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003889.
29. Ide J, Hong A, Andrade R, Floeter LM, Laranjeira MF. In vivo infection with Leishmania amazonensis to evaluate parasite virulence in mice. J Vis Exp. 2020;156. DOI: 10.3791/60617.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Laura Machín Galarza, Lianet Monzote Fidalgo.

Curación de datos: Lianet Monzote Fidalgo.

Metodología: Jorge Lázaro Alcantar Socarras, Lianet Monzote Fidalgo.

Recursos: Jorge Lázaro Alcantar Socarras, Lianet Monzote Fidalgo.

Supervisión: Lianet Monzote Fidalgo, Lars Gille.

Visualización: Laura Machín Galarza.

Redacción-borrador-original: Laura Machín Galarza.

Redacción-revisión y edición: Laura Machín Galarza, Lianet Monzote Fidalgo, Lars Gille.

Financiación

Esta investigación se financió por la Organización “Austrian Science Fund”, grant P27814-B22. Se agradece la beca Ernst Mach otorgada a Laura Machín por la Organización “Austrian Exchange Office (OEAD)”.