



Susceptibilidad *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* frente a Anfotericina B, Miltefosina y los Alcaloides Totales de *Galipea longiflora* mediante el Método Colorimétrico XTT-PMS

SALAMANCA CAPUSIRI, EFRAIN¹
ROMERO, DANITZA¹
SANTALLA, JOSÉ A.²,

OPORTO, PATRICIA²
FLORES, NINOSKA¹
GIMÉNEZ TURBA, ALBERTO¹

CORRESPONDENCIA: ALBERTO GIMÉNEZ TURBA
AGIMENEZ@MEGALINK.COME

FECHA DE RECEPCIÓN: 20 DE MARZO DE 2015

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10 DE JUNIO DE 2015

Resumen

En el presente trabajo se determinó la susceptibilidad *in vitro* de 27 cultivos de promastigotes de *Leishmania* adaptados *in vitro* a partir de aislados de lesiones cutáneas de pacientes que asistieron a los laboratorios del INLASA. Los antiparasitarios evaluados fueron Anfotericina-B, Miltefosina y los Alcaloides Totales de *Galipea longiflora*. Los resultados muestran un amplio rango de susceptibilidad de los diferentes aislados de *L.m.amazonensis* y *L.b.braziliensis* con CI50 para Anfotericina-B entre 0.06-0.42µg/mL y 0.03-0.41µg/mL, y para Miltefosina CI50 entre 1.67-12.93µg/mL y 1.25-21.17µg/mL y finalmente para los Alcaloides de *Galipea longiflora* CI50 entre 14.4-39.55µg/mL y 6-22.05µg/mL, respectivamente. De esta manera el método colorimétrico XTT-PMS muestra cepas circulan-

Abstract

This paper presents research results in determining the *in-vitro* susceptibility of 27 *Leishmania* promastigote cultures adapted to *in-vitro* conditions from skin lesion samples of patients lending assistance to INLASA laboratories. Antiparasitic activity was measured in the following: Amphotericin B, Miltephosine, and the total alkaloids present in *Galipea longiflora*. Results using IC50 show that the various isolated strains of *L.m.amazonensis* and *L.b.braziliensis* show a wide spectrum of susceptibility to Amphotericin B, from 0.06-0.42µg/mL to 0.03-0.41µg/mL; to Miltephosine, from 1.67-12.93µg/mL to 1.25-21.17µg/mL; and to the total alkaloids of *Galipea longiflora*, from 14.4-39.55µg/mL to 6-22.05µg/mL respectively. Application of the XTT-PMS colorimetry method reveals strains of *Leishmania*

1 Unidad Parasitología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.

2 Instituto Nacional de Laboratorios de Salud - INLASA - Laboratorio de Parasitología. Av. Saavedra # 2224, Miraflores, La Paz-Bolivia.

tes de *Leishmania* con un amplio rango de susceptibilidad *in vitro*. Así *L.b.braziliensis* frente a Anfotericina-B presentó mayor dispersión mostrándonos CI50 de hasta 14 veces superior en relación al más sensible, frente a Miltefosina un dispersión de CI50 de hasta 17 veces más respecto al más sensible y solo de 3 veces más al tratarlos con los alcaloides de *Galipea longiflora*, dispersión de datos que podría reflejar reportes anteriores al tratar esta enfermedad en Bolivia. El método colorimétrico es una herramienta importante para determinar la susceptibilidad a los antiparasitarios utilizados en Bolivia.

PALABRAS CLAVE

Susceptibilidad, antiparasitarios, XTT-PMS, Anfotericina B, Miltefosina, Galipea longiflora, L.m.amazonensis, L.b.braziliensis, cepas circulantes, Leishmania, Leishmaniasis, Bolivia.

in circulation with a wide spectrum of *in vitro* susceptibility. *L.b.braziliensis* showed a wide IC50 dispersal with Amphotericin B, up to 14 times greater than the most sensitive strain; Miltephosine showed an IC50 dispersal up to 17 times greater than the most sensitive strain; whereas the alkaloids of *Galipea longiflora* showed an IC50 dispersal of only 3 times greater than the most sensitive strain. This dispersal data is congruent with previous research regarding the treatment of Leishmaniasis in Bolivia. Colorimetry techniques are an important tool in determining susceptibility to antiparasitics used in Bolivia.

KEY WORDS

Susceptibility, antiparasitic, XTT-PMS, Amphotericin B, Miltephosine, Galipea longiflora, L.m.amazonensis, L.b.braziliensis, strains in circulation, Leishmania, Leishmaniasis, Bolivia.

INTRODUCCIÓN

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades transmitidas por vectores que causan diferentes enfermedades por distintas especies de *Leishmania* y están presentes en todos los continentes habitados. Se estima que alrededor de 12 millones de personas están actualmente infectadas, más de 350 millones viven en zonas de riesgo y 2 millones de nuevos casos se producen cada año (Wert et al., 2011).

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentra en alto riesgo de enfermar con leishmaniasis (Mollinedo, 2007), donde se administra como tratamiento los antimoniales pentavalentes (SbV), Anfotericina-B, pentamidina y recientemente se introdujo la miltefosina (Soto et al., 2008 ; Soto et al., 2006), la actividad de estos compuestos varía de acuerdo a la especie de *Leishmania* involucrada. El mal uso de los medicamentos y la mala administración ya sea por bajas dosis y tratamientos discontinuos son unas de las razones que llevan a fallas terapéuticas y aparición de formas de resistencia (Gil et al., 2007) como es el caso del glucantime, que se encuentra bien documentado en países como la India (Osorio et al., 2005 ; Nascimento-Zauli et al., 2010), y en Bolivia con un 10% de falla en el tratamiento, (Bermudez et al., 2006) a su vez también se observa una disminución de la sensibilidad al tratamiento de la Anfotericina B el cual fue reportado en cepas de pacientes tomados tras varias recaídas al tratamiento (Croft et al., 2006), lo mismo sucede en pacientes con *L.visceral* coinfectados con VHI (Koert et al., 2011) y se ten-

dría una cura de solo del 50% de pacientes con *L.mucosa* en un ensayo realizado en Palos Blancos–Bolivia (Soto et al., 2007).

Por otro lado existen reportes del uso de Miltefosina al tratar paciente con *L.cutánea* en Bolivia con un 70% de cura (Soto et al., 2008) y al tratar pacientes con *L.mucosa* leve el 83% de cura y solo el 53% en *L. mucosa* grave (Soto et al., 2007). Por lo mencionado y ante la carencia de estudios al respecto se hace patente el determinar la susceptibilidad *in vitro* de las cepas circulantes en Bolivia a través de un método semicuantitativo frente a los antiparasitarios convencionales utilizados para esta enfermedad, teniendo de esta forma un esquema de susceptibilidad *in vitro* antes de iniciar un determinado tratamiento, evitando así el uso de un medicamento que muestre poca susceptibilidad *in vitro* y su posible posterior fallo terapéutico y así poder escoger terapias alternativas.

MATERIAL Y METODOS

Cepas utilizadas para los ensayos

Se utilizaron 27 cepas de *Leishmania*, aisladas en el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud – INLASA a través de aspirado de lesión con jeringa como parte del procedimiento de diagnóstico clínico, la muestra obtenida se inoculó en medio difásico NNN suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), el cual fue incubado a 26°C y así obtener los promastigotes de *Leishmania*, finalmente se inoculó los promastigotes obtenidos a medio Schneider suplementado con 10% de SBF para obtener poblaciones parasitarias adecuadas para los ensayos de susceptibilidad *in vitro*. Las cepas de referencia utilizadas fueron (Tabla 1)

Tabla 1.
Nombres cepas de referencia promastigotes de *Leishmania*, utilizadas.

Género y especie	Nombre de la cepa
<i>Leishmania amazonensis</i>	clon1 MHOM/BR/76/LTB-012
<i>Leishmania braziliensis</i>	M2904 C192 RJA

Y las cepas del INLASA que pertenece al complejo *L. mexicana amazonensis* fueron: INL-296-10, INL-JTD-09, INL-371-10, INL-377-10, INL-097-10, INL-297-09, INL-386-10, INL-153-10, INL-001-10, FLA-09, INL-435-10, y las que pertenecen al *L.braziliensis braziliensis* fueron INL-452-10, INL-264-10, INL-329-10, INL-396-10, IIFB-01-AS, INL-436-10, INL-011-10, INL-065-10, INL-414-10, INL-051-10, INL-448-10, INL-012-10, INL-367-10, INL-298-10, INL-366-10, INL-413-10.

Preparación de los antiparasitarios.

Los medicamentos evaluados fueron Anfotericina-B (ANFOTERICIN-CRISTÁLIA), Miltefosina (IMPAVIDO), y los Alcaloides Totales de Galipea longiflora (CAT).

La Anfotericina B se diluyó en Medio Schneider donde a partir de una solución madre (1mg/mL) se realizaron diluciones seriadas en concentraciones de 0.62 hasta 0.01µg/mL, preparado previo a su uso.

También se preparo una solución madre de Miltefosina 10mg/mL al igual que CAT utilizando DMSO (GC-Sigma–Aldrich) como solvente, a partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas desde 100 hasta 1,5µg/mL, las concentraciones de DMSO fueron \leq al 1%.

Preparación placa de 96 pozos.

Se tomó 20µL de un cultivo *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* (solución madre) y se depositó en 180µL de glutaraldehido (5%) para fijar los parásitos y poderlos contar en cámara de Neubauer. Se ajustó la población a 3×10^6 parásitos/mL con medio Schneider (pH=6.2) al 10% de SBF, para luego distribuirlos en placas de 96 pozos (Nunc) en un volumen de 100µL (Giménez et al., 2005). A continuación se procedió a añadir las distintas concentraciones de los antiparasitarios en volumen similar al de los parásitos, se diseñó un blanco para cada concentración de las drogas así por ejemplo 100µL medio Schneider más 100µL de la concentración de drogas en estudio. Se realizó además un control de parásitos más DMSO al 1% (concentración no tóxica para los parásitos), para evaluar la viabilidad, además se coloco en cada placa y como controles las cepas de referencia frente a las distintas drogas en estudio. Las placas se incubaron durante 72 horas a 26°C.

Obtención de la CI_{50} por el método colorimétrico XTT-PMS

Luego de 72 horas de incubación a 26°C se procedió a la determinación del CI_{50} mediante el método colorimétrico XTT-PMS previamente descrito por Cornelly.et.al (Salamanca et al., 2008) donde el análisis de datos fue realizado en Microsoft Excel programa 2003 transformando las absorbancia a porcentaje de viabilidad de los parásitos, donde el 100% representa la absorbancia del control de parasitos sin extracto La conversión del porcentaje de viabilidad a su correspondiente valor de CI_{50} que se realizó por función de tendencia lineal que ajusta la recta calculada por el método de los mínimos cuadrados a los valores de las matrices $Y =$ porcentaje de inhibición y $X =$ concentración de la droga, devolviendo los valores de $Y = 50\%$ de inhibición a su respectivo valor de X . (Cornelly et al., 2003)

RESULTADOS

Todas las muestras fueron obtenidas de pacientes que cursaban con leishmaniasis cutánea, quienes procedían de diferentes zonas del departamento de La Paz excepto INL-JTD-09 y INL-FLA-09 que procedían del departamento Beni.

Luego de un periodo de adaptación de los promastigotes aislados de las lesiones al Medio Schenider, se trabajo con todos los aislados puesto que todos se adaptaron muy bien al nuevo medio, teniendo así poblaciones ideales de trabajo (3×10^6 Parasitos/mL) para realizar los ensayos de susceptibilidad *in vitro*.

Ensayos de susceptibilidad

En todos los experimentos las cepas de referencia se evaluaron en paralelo con los aislados, así se procedió al ensayo de susceptibilidad *in vitro* de las

cepas identificadas molecularmente como *Leishmania.mexicana.amazonensis* y *L. braziliensis.braziliensis* (Cárdenas et al., 2011) frente a Anfotericina B, Miltefosina y Alcaloides totales de *Galipea longiflora* como muestra la Tabla 2

Tabla 2.
Susceptibilidad *in vitro* de promastigotes de *Leishmania.m.amazonensis* y *L.b.braziliensis* frente a Anfotericina-B, Miltefosina y Alcaloides de *G.longiflora*

Cepa	Código	Complejo	Especie	Anfotericina B	Miltefosina	Alcaloides de <i>G.longiflora</i>
				CI ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL
MX	INL-296-10	mexicana	amazonensis	0,22±0,07	2,93±0,40	15,1±4,17
MX	INL-JTD-09	mexicana	amazonensis	0,16±0,05	2,53±0,06	16,13±5,47
MX	INL-377-10	mexicana	amazonensis	0,31±0,12	3,8±1,69	15,55±5,02
MX	INL-371-10	mexicana	amazonensis	0,4±0,14	5,95±0,21	39,55±0,35
MX	INL-097-10	mexicana	amazonensis	0,20±0,06	2,3±0,27	14,4±6,22
MX	INL-297-09	mexicana	amazonensis	0,42±0,007	3,5±1,27	38,15±5,16
MX	INL-386-10	mexicana	amazonensis	0,06±0,02	12,93±4,94	16,95±3,18
MX	INL-153-10	mexicana	amazonensis	0,26±0,01	2,33±0,52	20,83±2,55
MX	INL-001-10	mexicana	amazonensis	0,26±0,02	1,67±0,72	20,9±2,2
MX	FLA-09	mexicana	amazonensis	0,41±0,03	2,6±0,2	19,63±2,80
MX	INL-435-10	mexicana	amazonensis	0,41±0,16	2,55±0,5	16,13±5,62
Control	LA			0,21±0,06	10,45±1,4	19,54±5,5
BZ	INL-452-10	braziliensis	braziliensis	0,12±0,02	5,7±1,11	6±0,14
BZ	INL-264-10	braziliensis	braziliensis	0,03±0,007	5,5±0,70	6,57±1,76
BZ	INL-329-10	braziliensis	braziliensis	0,04±0,001	8,65±1,77	9,85±1,5
BZ	INL-396-10	braziliensis	braziliensis	0,14±0,001	1,25±0,07	10,17±0,46
BZ	IIFB-01-AS	braziliensis	braziliensis	0,25±0,007	2,35±0,35	8,47±2,56
BZ	INL-436-10	braziliensis	braziliensis	0,06±0,006	11,93±1,62	7,47±3,41
BZ	INL-011-10	braziliensis	braziliensis	0,41±0,14	4,5±1,39	7,33±1,19
BZ	INL-065-10	braziliensis	braziliensis	0,10±0,03	2,65±0,50	15,3±4,16
BZ	INL-414-10	braziliensis	braziliensis	0,39±0,13	16,9±6,42	21,47±5,21
BZ	INL-051-10	braziliensis	braziliensis	0,11±0,01	15,4±6,78	8±2,55
BZ	INL-448-10	braziliensis	braziliensis	0,14±0,09	11,2±0,14	12,65±3,46
BZ	INL-012-10	braziliensis	braziliensis	0,2±0,08	7±3,2	22,05±4,31
BZ	INL-367-10	braziliensis	braziliensis	0,05±0,02	11,03±0,80	16,08±6,32
BZ	INL-298-10	braziliensis	braziliensis	0,26±0,03	2,67±0,20	18,57±5,76
BZ	INL-366-10	braziliensis	braziliensis	0,3±0,06	21,17±1,70	14,7±6,36
BZ	INL-413-10	braziliensis	braziliensis	0,14±0,04	14,13±5,60	8,53±2,58
Control	M2904			0,09±0,01	5,26±1,04	17,05±4

MX = Complejo *Leishmania mexicana* ; Lma= MHOM/BR/76/LTB-012. BZ= *Leishmania braziliensis* ; M2904= C192 RJA

Se pudo observar una variable susceptibilidad *in vitro* de las dos especies de *Leishmania* estudiadas mostrándonos inicialmente una diferencia entre los CI₅₀ de *L.amazonensis* y *L.braziliensis* (cepas de referencia) frente a Anfotericina-B y Miltefosina, con CI₅₀ de casi el doble en el caso de *L.amazonensis*, siendo así este un parámetro de diferencia entre estas dos especies.

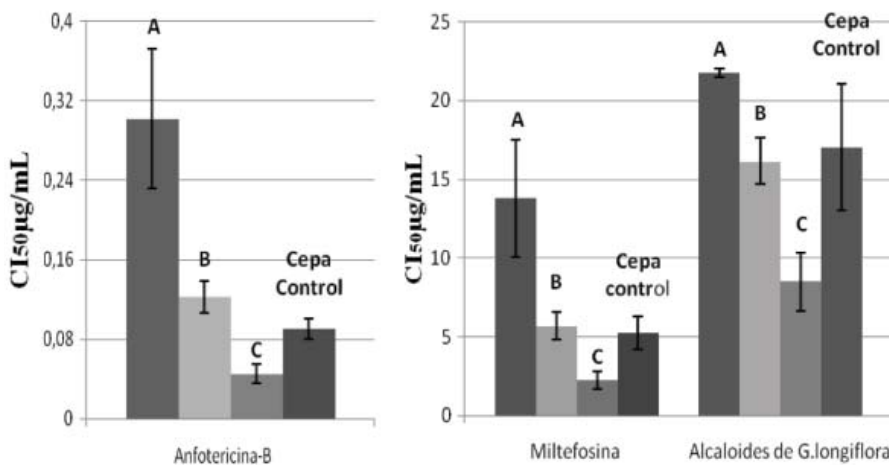
La respuesta *in vitro* a Anfotericina-B de las diferentes cepas nativas de *L.amazonensis* nos permitió dividir las según su CI₅₀ en tres diferentes categorías, aquellas que respondieron muy bien como la cepa INL-386 con CI₅₀ de 0,06±0,02µg/mL, aquellas que tuvieron una respuesta poco alentadora como la cepa INL-297 con

CI₅₀ de 0,42±0,007µg/mL (5 cepas) y quienes se encuentran alrededor de la CI₅₀ de la cepa de referencia (CI₅₀0,21±0,06 µg/mL) como la cepa INL-297 con CI₅₀ de 0,20±0,06 µg/mL. (5 cepas)(Tabla 2) De la misma manera *L.amazonensis* frente a Miltefosina muestra una susceptibilidad variable, teniendo una gran cantidad de cepas con CI₅₀ muy sensibles como la cepa INL-001 con CI₅₀ de 1,67±0,72 µg/mL, o aquella con respuestas por encima del control (CI₅₀10,45±1,4 µg/mL) (10 cepas) como la cepa INL386 con CI₅₀ de 12,93±4,94µg/mL.(Tabla 2), y finalmente se observo resultados más homogéneos al tratar con los alcaloides de *Galipea longiflora* ya que los CI₅₀ de una mayoría (9 cepas) estaba cerca de la cepa control (CI₅₀ de 19,54±5,5µg/mL) como la cepa INL-386, con CI₅₀ de 16,95±3,18µg/mL y solo 2 cepas se encuentra por encima de la cepa control como la cepa INL-297 con CI₅₀ 38,15±5,16µg/mL. Mostrándonos así también cepas que tiene CI₅₀ altos para un tratamiento pero siendo estas mismas sensibles para otro tratamiento como la cepa INL-371. (Tabla2)

Así también el método colorimétrico XTT-PMS nos permitió clasificar en diferentes categorías la respuesta *in vitro* (CI₅₀) de *L.b.braziliensis* frente a los diferentes antiparasitarios. (Figura1)

Figura.1

Susceptibilidad de Promastigotes de *L.b.braziliensis* frente a Anfotericina- B, Miltefosina, Alcaloides Totales de *Galipea longiflora*



A= Cepas con >CI₅₀ que la cepa de referencia, B= Cepas con CI₅₀ Próximos al del control, C= Cepas con <CI₅₀ que la cepa de referencia.

Como se observa en la figura1 se tiene una variable susceptibilidad de las diferentes cepas nativas frente a Anfotericina-B, así tenemos aquellas (5 cepas) que tienen respuesta poco favorable como la cepa INL-011 con CI₅₀ de 0,41±0,14µg/mL, pero también se observo cepas (4 cepas) muy sensibles a este tratamiento, como INL-264 con CI₅₀ de 0,03±0,007µg/mL, y muchas cepas (7 cepas) que se encuentran alrededor del control (CI₅₀ de 0,09±0,01µg/mL) como la cepa INL-065 con CI₅₀ de 0,10±0,03µg/mL. De la misma manera se observo cepas de *L.braziliensis* frente a Miltefosina con CI₅₀ elevados (7 cepas) como la cepa INL-366 con CI₅₀ de 21,17±1,70µg/mL, sin embargo también observamos cepas nativas (5 cepas) con CI₅₀ bastante sensibles como la cepa INL-396 con CI₅₀ de 1,25±0,07µg/mL y muchas otras que se encontraban alrededor (4 cepas) de la CI₅₀ del control (CI₅₀ de 5,26±1,04µg/mL) como la cepa INL-452 con CI₅₀ de 5,7±1,11µg/mL. Frente a

los alcaloides Totales de *Galipea longiflora* tenemos 2 cepas por encima del control, como la cepa INL-012 con CI_{50} de $22,05 \pm 4,31 \mu\text{g/mL}$, y por el contrario cepas que son bastante sensibles (14 cepas) al tratamiento como la cepa INL-452 con CI_{50} de $6 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$.

DISCUSIONES

La importancia práctica de este trabajo es que a través del método colorimétrico XTT-PMS podemos determinar la susceptibilidad *in vitro* de cepas nativas de *Leishmania* con una gran variedad de respuestas a un determinado tratamiento, así por ejemplo las cepas nativas frente a Anfotericina B nos mostraron una gran dispersión de CI_{50} para *L.braziliensis* teniendo valores de hasta $0,41 \mu\text{g/mL}$ que equivaldría 14 veces más en relación a la cepa más sensible ($CI_{50} = 0,03 \mu\text{g/mL}$), esta dispersión de CI_{50} fue un poco menos en caso de *L.amazonensis* de hasta 7 veces más respecto a la cepa más sensible. Datos *in vitro* que nos muestran que muchas cepas pueden responder muy favorablemente a la Anfotericina-B pero otros no, observando así *in vitro* cepas de *Leishmania* de nuestro medio que evidentemente son inhibidas por esta droga, pero a dosis más altas, lo cual podría tener su implicancia a la hora de tratar a una persona enferma con esta droga ya que la resistencia a Anfotericina B puede surgir como resultado del mayor uso clínico de este antiparasitario en la terapia. (Al-Mohammed et al., 2005) así se observó que solo el 50% de pacientes con *Leishmania* mucocutánea (*L.braziliensis*) tratados con Anfotericina B en Palos Blancos –Bolivia fueron curados. (Soto et al., 2007)

Existen reportes del uso de Miltefosina frente a *L. panamensis* al tratar Leishmaniasis Cutánea en Colombia con un 91% de cura, pero no recomiendan este tratamiento para *L.braziliensis* de Guatemala (Yardleey et al., 2005 ; Soto et al., 2004), en Bolivia existen reportes de 36 personas curadas de 44 tratados con Miltefosina en pacientes que cursaban con L.cutánea (*L.braziliensis*), observándose aumento de la lesión y presencia de parásitos en los que el tratamiento falló y al tratar pacientes con *L.mucosa* leve el 83% de cura y solo el 53% en *L. mucosa* grave (Soto et al., 2008). La susceptibilidad *in vitro* nos mostro una dispersión de CI_{50} para *L.braziliensis* con CI_{50} de hasta $21,17 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ que equivaldría a 17 veces más con respecto al más sensible ($CI_{50} = 1,25 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) y para *L.amazonensis* de hasta 8 veces más con respecto a la cepa más sensible. Claramente el método colorimétrico XTT-PMS nos permite ver que tenemos cepas circulantes de *Leishmania* muy sensibles a la Miltefosina quienes probablemente responderían muy bien al tratamiento *in vivo* como se vio en el estudio en Bolivia, sin embargo nos encontramos también con cepas que presentan CI_{50} que están muy por encima del más sensible, cepas que pueden reflejar la falla en los ensayos clínicos hechos en Bolivia. Y finalmente es muy interesante observar que la dispersión de CI_{50} de los Alcaloides de *Galipea longiflora* frente a *L.braziliensis* y *L.amazonensis* es más homogéneo que los dos anteriores, quizá por tratarse de un producto natural y un conjunto de moléculas, que en su momento serían motivo de discusión cuando se tenga los datos de los ensayos clínicos llevados a cabo en la localidad de Palos blancos. Además pudimos observar cepas nativas que no son muy susceptibles a un tratamiento pero responden muy bien a otro. No existe un tratamiento completamente efectivo (100% de cura) frente a la Leishma-

niasis, sin embargo si existen cepas de pacientes, con bastante sensibilidad *in vitro* a un determinado tratamiento, el poder determinar esta susceptibilidad *in vitro* podría ser de gran utilidad. Constituyéndose de esta manera el método colorimétrico en una herramienta importante para tener un esquema de susceptibilidad *in vitro* a las drogas de uso convencional frente a diferentes especies de *Leishmania* circulantes en nuestro país.

REFERENCIAS

- Al-Mohammed, C., Bates, M., Paul, A. (2005). Production and Characterization of Stable Amphotericin-Resistant Amastigotes and Promastigotes of *Leishmania Mexicana*. *Annals of the American Society for Microbiology*, 49:3274-3280.
- Bermudez, H., Rojas, E., Garcia, L., Desjeux, P., Dujardin, J., Boelaert, M., Chappuis, F. (2006). Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100, 591-600.
- Cardenas, Oscar, Romero, Danitza., Salamanca, Efrain., Santalla, José., Oporto, Patricia., Arteaga, Daniela., Alvares, Ma.Teresa., Terrazas, Enrique., Flores, Ninoska., Giménez, Alberto. (2011) Análisis de marcadores moleculares para la tipificación de *Leishmania* spp circulantes en el departamento de La Paz-Bolivia. *Biofarbo*,
- Cornelly, W., Espinosa, O., Montenegro, H., Cubila, L., Capson, T., Ortega-Barria, E., Romero, L. (2003). Hydrosoluble formazan XTT: Its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *J Microbiol Meth*, 55, 813-816.
- Croft, S., Shyam, S., Fairlamb, A. (2006). *Clin. Microbiol*, 19(1), 111-126
- Giménez, A., Gupta, M., Dehara, E. (2005). Manual de Técnicas de laboratorio para la evaluación de sustancias tripanocidas y leishmanicidas, 89-90.
- Gil, E., Cunha, L., Goncalves, A., Souza, A., Valderrama, N. (2007). Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26 (3), 454-461.
- Koert, R., Rachel, H., Solomon, Ch., Endashaw, Aderie., Turid, P., Collin, S., Davidson, R. (2011). Limited Effectiveness of High-Dose Liposomal Amphotericin B (AmBisome) for Treatment of Visceral Leishmaniasis in an Ethiopian Population With High HIV Prevalence. *Clinical Infectious Diseases*, 53, 152-58.
- Mollinedo, S. (2007). *Leishmaniasis. Guía Operativa para el Control en Bolivia*. 1 ed. La Paz: Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis.....
- Nascimento-Zauli, Danilo, Yokoyama-Yasuyama, J., Pereira, L., Pelli de Oliveira, M., Ribeiro-Dias, F., Dorta, M., Uliana, S. (2010). In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine And International Health*, 15, 68-76.
- Osorio, E., Robledo, S., Arango, G., Muskus, C. (2005). *Leishmania*: papel de la glicoproteína P en la medición de la resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. *Biomédica*, 25, 242-260.
- Salamanca, E., Ruiz, G., Ticona, J.C., Giménez, Alberto. (2008). Método colorimétrico - XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *Biofarbo*, 15, 21-27.
- Soto, J., Rea, J., Valderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L., Berman, J. (2008). Efficacy of Miltefosine for bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 78, 210-211.
- Soto, J., Soto, P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*, 26, 207-217.
- Soto, J., Arana, A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J., Diaz, A., Gutierrez, P., Arboleda, M., Junge, K., Engel, J., Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 1266-1272.
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gomez, A., Mollada, F., Fuentesaz, C., Anders, G., Sinderman, H., Engel, J., Berman, J. (2007). Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 350-356.
- Soto, J., Rea, J., Balderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L., Berman, J. (2008). Efficacy of Miltefosine for Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 78, 210-211.
- Wert, L., Alakurtti, S., Corral, M., Fortun-Sánchez, S., Yli-Kauhaluoma, M. (2011). Toxicity of betulin derivatives and in vitro effect on promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* and *L. donovani*. *The Journal of Antibiotics*, 1-7.
- Yardley, V., Croft, L., Doncker, S., Dujardin, Jean-Claude., Siddhartha, K., Suman, C., Llanos-Cuentas, A., Chappuis, F. (2005). The Sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Perú and Nepal to Miltefosine. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 272-275.