

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLE

# LA MEDICINA TRADICIONAL Y EL REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS COMO ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA

## Traditional medicine and drug repositioning as therapeutic strategies to treat cutaneous leishmaniasis

Diana Paola PEÑA<sup>1\*</sup> , Patricia ESCOBAR<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>: Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. diana2208183@correo.uis.edu.co, pescobar@uis.edu.co

\* For correspondence: diana2208183@correo.uis.edu.co

**Recibido:** 22 de marzo de 2024. **Revisado:** 27 de junio de 2024. **Aceptado:** 01 de agosto de 2024

**Editora asociada:** Rosa Angélica Plata Rueda

**Citation/ citar este artículo como:** Peña, D.P., y Escobar, P. (2025). La medicina tradicional y el reposicionamiento de fármacos como estrategias terapéuticas en leishmaniasis cutánea. *Acta Biol Colomb.*, 30(1), 47-66. <https://doi.org/10.15446/abc.v30n1.112313>

### RESUMEN

Las opciones terapéuticas para los pacientes con leishmaniasis cutánea son pocas, de eficacia variable y tóxicas. La medicina tradicional (MT) y el reposicionamiento de fármacos (utilización de fármacos de entidades diferentes) proveen alternativas de estudio. Se evaluaron en *Leishmania (Leishmania) amazonensis* sustancias como la miel de abejas, café, extracto de *Cannabis sativa* y el tetrahidrocannabinol (THC), también se evaluó el calor y algunos fármacos. La potencia se expresó en concentraciones inhibitorias o citotóxicas ( $CI_{50}$  o  $CC_{50}$ ) de promastigotes, amastigotes intracelulares, células THP-1 y la efectividad en la inhibición de las lesiones en ratones BALB/c tratados tópicamente con formulaciones tipo crema, gel y ungüento. Adicionalmente se evaluó el efecto del calor y la actividad antioxidante. Los más potentes de mayor a menor fueron el nifurtimox, THC, celecoxib,  $Sb^{III}$ , extracto de *C. sativa*, ribavirina, azitromicina y el tratamiento veterinario con  $CI_{50}$  entre 1,1 y 85,8  $\mu g/mL$ . En amastigotes intracelulares, el nifurtimox, celecoxib y  $Sb^{III}$  fueron activos. La interacción del  $Sb^{III}$  y celecoxib fue indiferente; sin embargo, *in vivo* el ungüento combinado preparado con cera de abejas presentó reducción y reepitelización completa de la lesión. Individualmente estos fármacos al igual que la crema de café más ribavirina, controlaron el crecimiento de las lesiones. Los promastigotes, amastigotes axénicos y células THP-1 fueron susceptibles a altas temperaturas y el café y el THC mostraron actividad antioxidante. Estudios complementarios orientados a mejorar la dosificación, formulación, determinación de permeabilidad, entre otros, son recomendados.

**Palabras Clave:** Leishmaniasis del Nuevo Mundo, reposicionamiento de medicamentos, sinergismo farmacológico, terapéutica tradicional, termoterapia.

### ABSTRACT

Therapeutic options for patients with cutaneous leishmaniasis are few, have variable efficacy, and are toxic. Traditional medicine (TM) and drug repositioning (use of drugs from different entities) provide study alternatives. Mixtures or compounds such as honey, coffee, *Cannabis sativa* extract, tetrahydrocannabinol (THC), heat and other drugs were also evaluated in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Potency was expressed in inhibitory or cytotoxic concentrations ( $IC_{50}$  or  $CC_{50}$ ) of promastigotes, intracellular amastigotes, and THP-1 cells, and effectiveness in inhibiting lesions in BALB/c mice treated topically with cream, gel, and ointment-type formulations. Additionally, the effect of heat and antioxidant activity were evaluated. The most potent antileishmania compounds from highest to lowest were nifurtimox, THC, celecoxib,  $Sb^{III}$ , *C. sativa* extract, ribavirin, azithromycin, and veterinary treatment with  $IC_{50}$  between 1.1 and 85.8  $\mu g/mL$ . In intracellular amastigotes, nifurtimox, celecoxib and  $Sb^{III}$  were active. The interaction of  $Sb^{III}$  and celecoxib was indifferent; however, *in vivo*, the combined ointment prepared with beeswax showed reduction and complete re-epithelialization of the lesion. Individually, these drugs, as well as coffee cream and ribavirin, controlled the growth of lesions. Promastigotes,

axenic amastigotes, and THP-1 cells were susceptible to high temperatures, and coffee and THC showed antioxidant activity. Further studies are recommended to improve dosage, formulation, and permeability determination, among other factors.

**Keywords:** new world cutaneous leishmaniasis, drug repositioning, drug synergism, traditional therapeutics, thermotherapy

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea (LM) son enfermedades infecciosas que afectan a la piel y las mucosas causadas por protozoos del género *Leishmania* y transmitidas a los humanos y a otros reservorios por vectores de la familia Psychodidae. Representan un problema de salud pública en los países afectados, siendo Brasil, Colombia y Perú los países más afectados en las Américas con 54 000 casos de LC anuales (Pan American Health Organization [PAHO], 2022). En Colombia, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* son las especies prevalentes (Salgado-Almario et al., 2019). El 90% de los casos presentan lesiones localizadas, únicas o múltiples, en áreas expuestas al vector como brazos, cara y tobillos. Los fármacos disponibles son los antimoniales pentavalentes (Sb<sup>V</sup>), anfotericina B (AmB), miltefosina (MTF) y pentamidina (PMD), recomendados según la especie de parásito, manifestación clínica (localizada, diseminada o difusa), edad, enfermedades concomitantes, tratamientos previos y el estado inmunitario del paciente (PAHO, 2022). Estos tratamientos presentan una eficacia variable, contraindicaciones y efectos adversos. Los tratamientos localizados p. ej. termoterapia, infiltraciones intralesionales con Sb<sup>V</sup>, ungüento de paromomicina (PM), son recomendados en LC no complicada, mujeres embarazadas y pacientes con enfermedad cardíaca, renal y hepática de base, entre otros (PAHO, 2022). Las terapias combinadas de un tratamiento localizado y uno sistémico también son recomendadas. La búsqueda de alternativas terapéuticas en LC es prioritaria.

Se han explorado alternativas interesantes provenientes de la medicina tradicional (MT) y del avance terapéutico en otras enfermedades (reposicionamiento de fármacos) (Pineda-Reyes et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018). Esta ha sido utilizada ampliamente en LC. Esta se basa en las creencias de los pueblos transmitidas a lo largo de generaciones utilizando remedios sobre las heridas o en algunos pocos casos “pócimas” o brebajes orales (Odonne et al., 2017). Se tratan las lesiones con desinfectantes (ácidos, alcalinos, detergentes, alcoholes), antibióticos, productos vegetales, animales, minerales, petroquímicos o de uso veterinario, calor (i.e. uso de metales calientes, ceras derretidas), o el uso de tratamientos recomendados por otros habitantes de la región basados en plantas medicinales en forma de infusiones o emplastos (Weigel et al., 1994; Valadeau et al., 2009; Patiño-Londoño et al., 2017). El reposicionamiento de fármacos, por su parte, es un método orientado a la identificación de un nuevo uso terapéutico a fármacos existentes y aprobados para otras enfermedades (Xue et al., 2018). Este método aceleraría el descubrimiento de nuevos fármacos en LC, dado que aprovecharía los perfiles

físicoquímicos, toxicológicos, biológicos y de seguridad de agentes ya desarrollados. Los tratamientos para la LC han sido adaptados de la leishmaniasis visceral (LV) del Viejo Mundo, y a su vez, reposicionados de otras enfermedades. Por ejemplo, los Sb<sup>V</sup> fueron utilizados inicialmente como antimoniales trivalentes (Sb<sup>III</sup>) en tripanosomiasis africana, la AmB como antifúngico, la MTF como anticancerígeno, la PM como antibacteriano y la PMD como hipoglucémico o antiparasitario para la tripanosomiasis africana (Charlton et al., 2018). Actualmente se evalúan en modelos experimentales de LC medicamentos que incluyen antiinflamatorios, antiparasitarios, antifúngicos, antibióticos, antivirales, antidepresivos, antihipertensivos, antioxidantes y anticancerígenos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antileishmania de algunos compuestos utilizados en la medicina tradicional, incluyendo el extracto de *Cannabis sativa* junto con un tratamiento veterinario y fármacos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Compuestos

Dos tipos de miel de abejas monofloral (roble y caucho) fueron obtenidas de apicultores del corregimiento de Cachiri, Santander, Colombia. La cera de abejas y manteca de cacao fueron obtenidas del Laboratorio León SA, Bucaramanga, Colombia, el café (*Coffea arabica*) tostado, molido y liofilizado de Colcafé SA, Medellín, Colombia. El producto veterinario, (solución SDS-activador) fue obtenido de Servicios Integrales Veterinarios SAS, Sevinet (Bucaramanga, Colombia), y el extracto de *Cannabis sativa* y tetrahidrocannabinol (THC) fue obtenido por extracción orgánica (Radwan et al., 2008). Se utilizaron los medicamentos ribavirina (Rebetol®, Merck Sharp & Dohme, EE.UU.), azitromicina (Zitromax®, Pfizer), benzimidazol (LAFEPE, BA, Brazil), boceprevir (Victrelis® Merck & Co.), y celecoxib (Genfar), distribuidos comercialmente y fármacos grado reactivo azitromicina, celecoxib, tartrato antimonio de potasio (Sb<sup>III</sup>), cafeína, metronidazol y nifurtimox (NFX) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). La estructura de los fármacos utilizados, peso molecular (PM) y LogP se muestran en la tabla S1.

### Ensayos de actividad de los compuestos contra parásitos y células

#### Parásitos y Células

Los promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/LV78) fueron mantenidos en medio de cultivo de Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor (SFBi, Gibco), a 27 °C. Las células THP-1 (ATCC

TIB-202) fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1614 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de SFBi a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los amastigotes intracelulares fueron obtenidos al infectar las células THP-1 previamente transformadas con 40 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (Sigma) con promastigotes de *Leishmania* en un radio de 1: 5 (célula: parásito) a 32 °C por 24 h. Los amastigotes axénicos fueron generados a partir de promastigotes metacíclicos cultivados a 32 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y pH 5,5 por seis días.

#### **Preparación de las Soluciones Stock**

La solubilidad de los compuestos en agua tipo I, buffer fosfato salino PBS, pH 7,2 y DMSO se determinó mezclando 100 mg del compuesto en 500 µL del solvente. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g para observar la presencia de precipitado. Las soluciones stock fueron preparadas disolviendo dos a seis mg del compuesto en el solvente donde no se observó precipitado.

#### **Pruebas de Actividad Antileishmania y Citotóxica in vitro**

Los promastigotes y amastigotes axénicos (1 x 10<sup>6</sup> parásitos/mL) y las células THP-1 diferenciadas (6 x 10<sup>5</sup> células/mL) fueron incubadas con diluciones seriadas de los compuestos por 72 h. Parásitos y células controles fueron tratados con medio sin compuesto. El efecto de los compuestos en la inhibición del crecimiento de los parásitos se determinó por el ensayo de reducción de resazurina (Sigma-Aldrich), adicionando resazurina (0,12 µg/mL) por cuatro horas y determinado espectrofotométricamente las absorbancias a 570 y 600 nm. El efecto citotóxico de los compuestos en las células THP-1 se determinó por el método colorimétrico de MTT (Sigma-Aldrich) adicionando 2,5 mg/mL de MTT por cuatro horas. Después de agregar DMSO se determinaron espectrofotométricamente las absorbancias a 580 nm. Se calcularon los porcentajes de inhibición y de citotoxicidad comparando las absorbancias de los pozos control y las muestras. La actividad en amastigotes intracelulares se determinó microscópicamente en laminillas circulares fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Se realizó el conteo de células infectadas y no infectadas en 300 células. Se calcularon los porcentajes de inhibición comparando el número de células infectadas y las no infectadas. La potencia de los compuestos fue expresada como la concentración inhibitoria o citotóxica 50% (CI<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub>) calculada por análisis de regresión no lineal utilizando el software Mxslfit™. (ID Business Solution, UK). La selectividad de los compuestos se calculó relacionando la CC<sub>50</sub> de las células y la CI<sub>50</sub> de los parásitos (índice de selectividad, IS), un valor >3,0 se consideró selectivo.

#### **Prueba de Sinergismo**

La eficacia de la combinación de Sb<sup>III</sup> y celecoxib (en pastilla grado reactivo) se evaluó en promastigotes por el método de dilución en radio fijo (Salazar-Villamizar and Escobar, 2022). Se prepararon proporciones 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4

y 0:5 de Sb<sup>III</sup> y celecoxib. Los parásitos fueron tratados con diluciones seriadas (1:3) de las mezclas durante 72 h. Se calcularon los porcentajes de inhibición, las concentraciones inhibitorias fraccionadas (FIC) de cada fármaco y la media de la sumatoria (ΣFICs) utilizada para clasificar la interacción como sinérgica (ΣFICs ≤ 0,5), aditiva (ΣFICs > 0,5 - 4,0) o antagonista (ΣFICs > 4,0) (Odds, 2003).

#### **Efecto del calor en la sobrevida de los parásitos**

Los promastigotes, amastigotes axénicos y las células THP-1 fueron mantenidos por diez días a 37, 39 y 50 °C y los controles a 26, 32 y 37 °C respectivamente. La viabilidad se determinó microscópicamente por conteo diario en hemocitómetro utilizando eosina amarilla 0,25% (Sigma-Aldrich). Se comparó el crecimiento en las condiciones estándares por la alta temperatura utilizada. Los cambios morfológicos se determinaron microscópicamente en láminas fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. El efecto de formulaciones calientes se determinó incubando los parásitos con concentraciones de 100–750 µg/mL de cera de abejas a 50 °C, por 24, 48 y 72 h. La actividad se determinó según lo descrito anteriormente.

#### **Ensayos de actividad de los formulaciones topicas en ratones**

##### **Preparación de las Formulaciones Tópicas**

Se prepararon formulaciones tipo crema (C1-C8), geles (G1 y G2) y ungüentos (U1 y U2) y sus respectivos vehículos (Tabla S2). Para las cremas, la fase acuosa (agua, glicerina, trietanolamina y benzoato de sodio) fue mezclada con la fase oleosa (ácido esteárico y cutina) en agitación continua a 65 °C en baño María. Se agregaron los compuestos (miel, café, extracto de *C. sativa*, THC, ribavirina y azitromicina) hasta obtener una homogenización completa. Para los geles de NFX, se preparó una solución del Carbopol 940® (1% p/p) en agua destilada y posteriormente se agregó el benzoato sódico al 0,1%, el compuesto y trietanolamina hasta formar un gel transparente. Para los ungüentos la cera de abejas y la manteca de cacao se mezclaron a 65 °C en baño María, se añadió el aceite de oliva y los compuestos (Sb<sup>III</sup> y/o celecoxib) a 40 °C agitando hasta su homogenización completa. Se adicionaron DMSO, β-cariofileno o ácido oleico como potenciadores de la permeación (PPP). Las formulaciones se almacenaron a 25 °C.

##### **Caracterización de las Formulaciones Tópicas**

Se determinó el color, la homogeneidad [poca (+), moderada (++) y alta (+++)] y la consistencia [sólido (S), semisólido (SS) o líquido (LQ)] por observación; el pH utilizando tiras indicadoras; y la extensibilidad midiendo el área de expansión superficial (mm<sup>2</sup>) de 100 mg de la formulación al ser presionada por otra lámina portaobjetos y tres objetos de 7,1 g a intervalos de un min. Para los ungüentos estas

características fueron evaluadas a 8, 25, y 50 °C por 30 días. El punto de fusión (PF) de la cera de abejas y el ungüento se determinó por el método de Thiele colocando 50 mg del compuesto en un capilar de vidrio con un extremo en un termómetro de mercurio inmerso en un vaso precipitado con aceite castor sobre una placa de calentamiento. Se registró la temperatura (°C) de cambio de estado sólido a líquido. La esterilidad se determinó por el método de recuento en placa sembrando diluciones en agar nutritivo (para bacterias) y agar papa dextrosa (para mohos y levaduras) a 37 °C y 25 °C por 24 h o cinco días respectivamente. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias por gramo.

### Animales y Reglamentaciones

Se utilizaron ratones BALB/c de ocho a diez semanas los cuales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, humedad, comida y agua *ad libitum* en estricta conformidad con lo definido en la normatividad nacional. Los estudios fueron desarrollados de acuerdo con la guía y protocolos para el cuidado y uso de animales del CINTROP, aprobado por el Comité de Ética de la UIS, Código D16-00730 comprometiéndonos a minimizar el sufrimiento durante el sacrificio mediante el uso xilacina y ketamina como anestésicos.

### Infección y Tratamiento

Los ratones fueron infectados con  $5 \times 10^5$  promastigotes/100  $\mu\text{L}$  en el dorso por vía subcutánea. Las lesiones fueron medidas semanalmente utilizando un medidor digital. Se calculó el área de la lesión ( $\text{mm}^2$ ). Después del sacrificio se recogieron trozos de lesiones para ser fijadas en formalina tamponada al 10% y procesadas para estudios histológicos. A los 30 - 40 días post infección se aplicaron tópicamente las cremas C5 (café-ribavirina), C6 (azitromicina), C7 (extracto *C. sativa*) y C8 (THC), los geles G1 y G2 (NFX) y el ungüento U1 y U2 ( $\text{Sb}^{\text{III}}$  + celecoxib y  $\text{Sb}^{\text{III}}$  y celecoxib individual). Se empleó un  $n = 4$  para cada grupo experimental. La aplicación fue de 100 mg/día, tres veces por semana por cuatro semanas. Adicionalmente se aplicó un ungüento control (sin fármaco) previamente calentado en baño María a 50 °C durante dos minutos y un control no tratado. Se realizaron registros fotográficos de las lesiones y se determinaron los porcentajes de reducción en el tamaño de la lesión ( $\text{mm}^2$ ) comparando las áreas de lesión antes y después del tratamiento. La presencia del parásito se determinó microscópicamente en las improntas fijadas en metanol y coloreadas con Giemsa y las biopsias procesadas y coloreadas con hematoxilina/eosina (Neira et al., 2019).

### Ensayo de captación del radical DPPH

Se utilizó el ensayo de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Sigma-Aldrich). Se prepararon diluciones seriadas (1: 3) de los compuestos (miel, café, cafeína, extracto de *C. sativa*, THC, tratamiento veterinario, cera de abejas y ocho fármacos) en metanol y se incubaron con el radical DPPH (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 25 °C. El

ácido ascórbico se utilizó como control positivo y DPPH sin muestra como control negativo. Después de 20 min se determinó espectrofotométricamente a 517 nm. El porcentaje de captación del radical fueron calculados como sigue: % de captación del radical DPPH =  $1 - (\text{DO DPPH} - \text{DO DPPH muestra}) / \text{DO DPPH}$  x 100.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.0.1 para Windows. Se emplearon pruebas paramétricas (t-test y ANOVA) y no paramétricas (prueba Shapiro-Wilk). Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

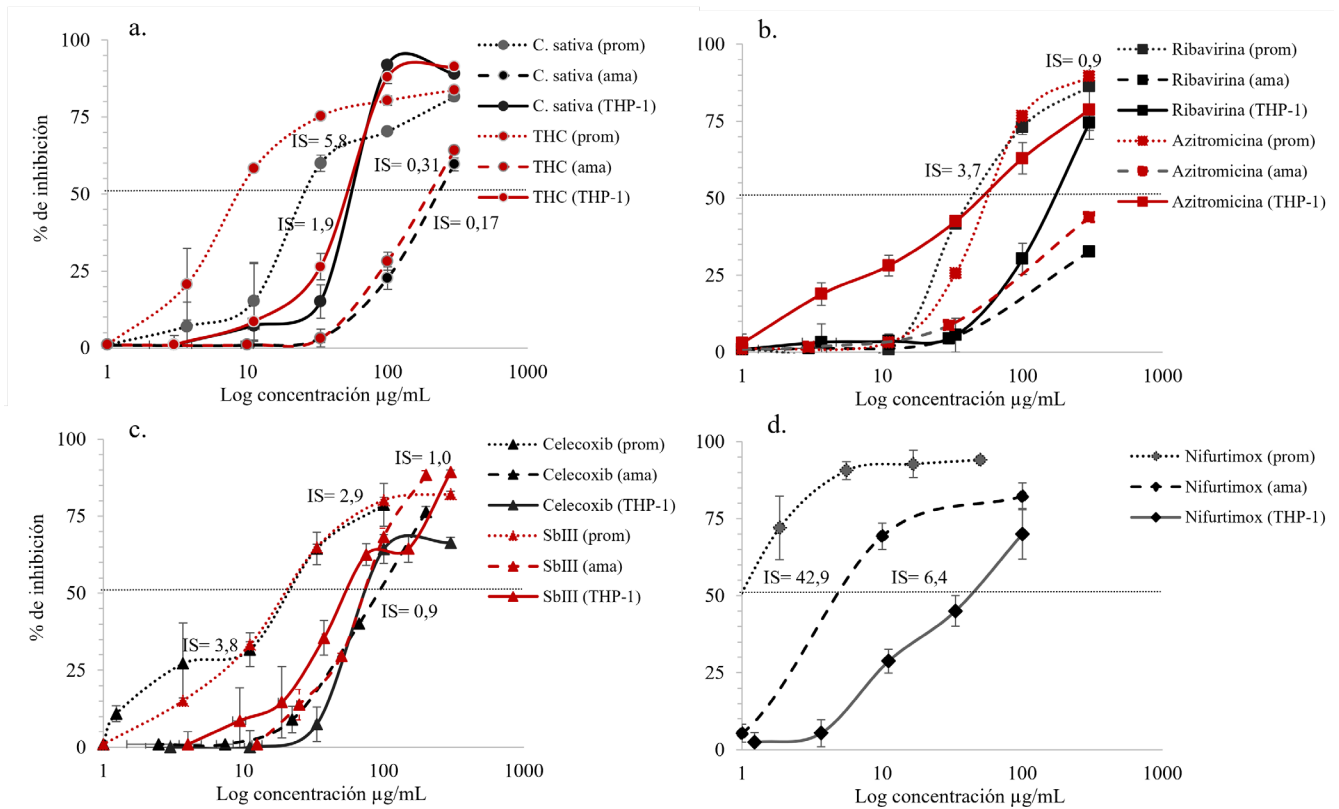
## RESULTADOS

### El NFX, celecoxib, $\text{Sb}^{\text{III}}$ , Ribavirina, *C. Sativa*, THC presentaron actividad antileishmania *in vitro*

El extracto de *C. sativa* y su componente THC mostraron un efecto de dosis respuesta con una potencia de  $\text{Cl}_{50}$  31,6  $\pm$  3,6 y 10,2  $\pm$  1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en promastigotes y de  $\text{Cl}_{50}$  332,7  $\pm$  5,5 y 188,1  $\pm$  14,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en amastigotes intracelulares, respectivamente (Fig. 1a, Fig. 2, Fig. S1). La toxicidad mostró valores similares (entre  $\text{CC}_{50}$  58,5 y 59,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y sólo se calcularon IS mayores de 3,0 en la actividad del THC en promastigotes (IS = 5,8, Fig. 1a). La miel de abejas, cera de abejas, manteca de cacao y café no fueron activas ni en parásitos ni en células THP-1. La fracción SDS del producto veterinario mostró actividad en promastigotes, sin embargo, fue altamente tóxico para las células THP-1 mostrando un IS igual a 0,1 (Tabla S1). Con respecto a los fármacos candidatos a reposicionamiento, el NFX, celecoxib,  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , ribavirina, azitromicina en su orden mostraron un efecto dosis respuesta contra los promastigotes de *L. amazonensis* con valores de  $\text{Cl}_{50}$  entre 1,2 y 55,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  siendo el NFX el compuesto más activo (Fig. 1a-1d). Contra amastigotes intracelulares, el NFX, celecoxib y el  $\text{Sb}^{\text{III}}$  fueron activos con  $\text{Cl}_{50}$  entre 7,4 y 25,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 1d, Fig. 2 y Fig. S1). El extracto de *C. sativa* y su componente THC en la concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostraron una inhibición de los amastigotes del 61,1 y 64,1% respectivamente (Fig. 2 y Fig. S1). Con respecto a la selectividad, la ribavirina y el celecoxib presentaron selectividad sólo para los promastigotes (Figs. 1b y 1c). El único compuesto selectivo para los amastigotes intracelulares fue el NFX (IS= 6,4) (Fig. 1d). En promastigotes y en amastigotes axénicos de *L. amazonensis* la interacción del  $\text{Sb}^{\text{III}}$  con el celecoxib fue de tipo aditivo presentando valores promedios de  $\Sigma\text{FIC}$  entre 1,5 y 1,6 (Fig. S2).

### Los parásitos y células fueron susceptibles al calor

Los promastigotes fueron altamente susceptibles a las altas temperaturas con porcentajes de inhibición superiores al 40% desde el primer día de cultivo y alcanzando un 100% de inhibición



**Fig. 1.** Dosis respuesta de la actividad antileishmania y citotóxica de los compuestos. Promastigotes (prom) y amastigotes intracelulares (ama) y en células THP-1. Se muestra el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos ( $n = 9$ ) de: a. Extracto de *C.sativa* y componente THC; b. Ribavirina y azitromicina; c. Celecoxib y antimonio  $Sb^{III}$ ; y d. Nifurtimox. Se calculó en índice de selectividad (IS) ( $CC_{50}/CI_{50}$ ). Inhibición del 50 % (La línea horizontal).

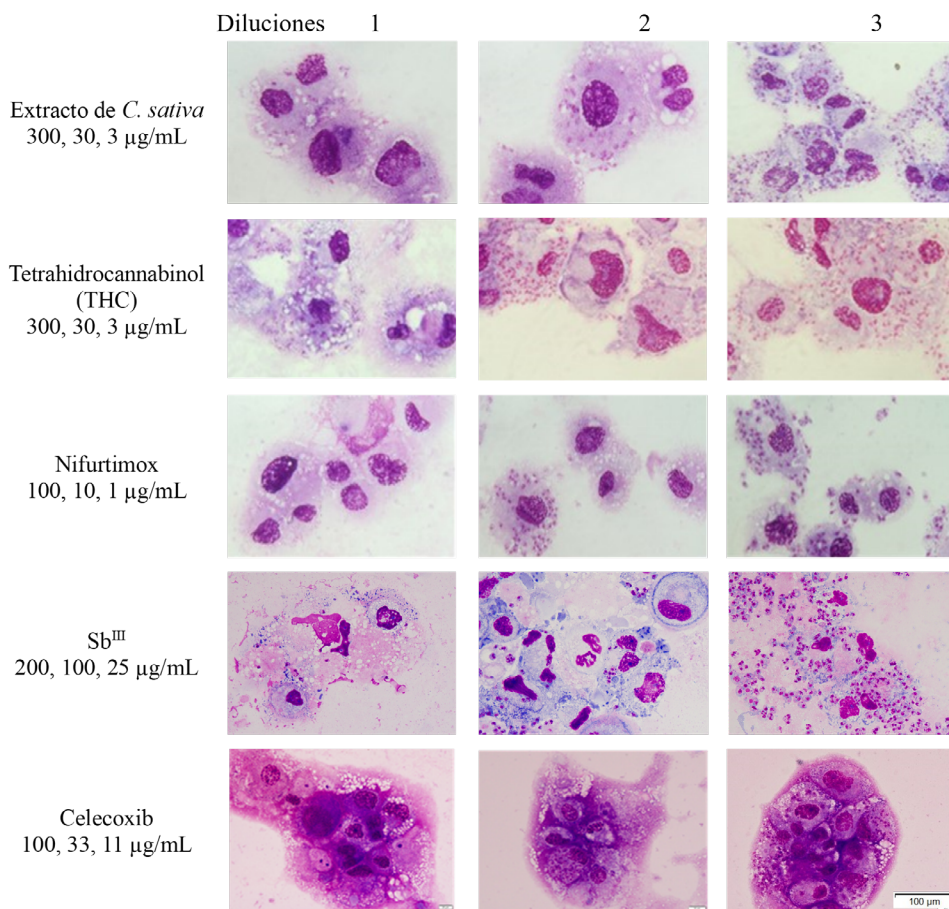
entre el cuarto y quinto día de cultivo (Fig. 3). Los amastigotes axénicos fueron significativamente más resistentes ( $p < 0,05$ ) con porcentajes de inhibición entre 93 y 100% a los cinco a seis días de cultivo (Fig. 3a-3c). A los ocho a diez días, no se observaron parásitos en los cultivos. En este estudio no se determinó la relación temperatura (37, 39 o 40 °C): porcentaje de inhibición en amastigotes axénicos debido a la heterogeneidad de los resultados (Fig. 3a3b). Morfológicamente a 26 °C los promastigotes presentaron formas alargadas, móviles, con el flagelo anterior. A 39 °C los parásitos disminuyeron en número observándose aglomeraciones y alteraciones estructurales en forma, continuidad de la membrana y vacuolización desde el día quinto. A 50 °C, se observaron cambios en morfología, pérdida de flagelo, disminución de tamaño y aglomeración al día uno con poca cantidad y completa pérdida de estructura desde el día quinto y pérdida de flagelo y núcleo al día diez (Fig. 3d). A 32 °C los amastigotes axénicos mostraron formas pequeñas y esféricas sin flagelo tomando muy bien la coloración con Giemsa. A 39 y 50 °C no se observaron cambios evidentes, sin embargo, al quinto día los amastigotes se aglomeraron, mostraron pérdida de continuidad de la membrana. Al día diez se observaron pocos amastigotes redondeados con evidente pérdida de continuidad de la membrana y núcleo (Fig. 3d).

En las células THP-1, a 50 °C se observó un ligero aumento en el crecimiento (3,6%) al primer día, sin embargo, entre los dos y cuatro días, el crecimiento redujo del 35 al 100% (datos no mostrados).

La potencia de la cera de abejas sin compuesto a la temperatura de 50 °C comparada a la temperatura óptima de crecimiento fue menor. En promastigotes con valores de  $CI_{50}$  entre 250,3 y 311,4 µg/mL a 27 °C y de 650 y 657 µg/mL a 50 °C. En amastigotes con valores de  $CI_{50}$  entre 448,3 y 558,0 µg/mL a 27 °C y de 593,6 y 724,2 µg/mL a 50 °C

### Se prepararon 12 formulaciones: cremas C1-C8, geles G1 Y G2 y ungüentos U1 Y U2

Con respecto a las cremas C1-C8, el color fue variado dependiendo del compuesto que contenían (Tabla S2). En general las cremas fueron homogéneas, semisólidas (SS), estables durante el tiempo y temperatura evaluadas, exceptuando la crema C1 (miel de abejas, roble) que perdió homogeneidad a 25 °C 40 días post preparación (pp.) y la crema C3 (miel de abejas y ribavirina) que fue poco homogénea y pasó de SS a líquida 40 días pp. Los geles de NFX G1 y G2 fueron homogéneos y SS. El ungüento de cera de abejas (U1) o con fármacos (U2) presentaron punto de fusión



**Fig. 2.** Actividad antileishmania *in vitro* en amastigotes intracelulares. Las células THP-1 diferenciadas fueron infectadas con promastigotes de *L. amazonensis* y tratadas con *C. sativa*, THC, nifurtimox, Sb<sup>III</sup> y celecoxib en diferentes diluciones. El porcentaje de infección sin fármaco fue de 75,5 %. Se muestran microfotografías de láminas coloreadas con Giemsa, aumento de 400X. Los puntos intracitoplasmáticos son los amastigotes.

de 60-61 °C y de 45- 46 °C respectivamente (Tabla S2). A 50 °C el U1 pasó de sólido a SS y el U2 de SS a líquido 40 días pp. El pH de las formulaciones en general fue de 6,0 y la extensibilidad aumentó significativamente a 25 °C (Tabla S2). En el análisis microbiológico no se observó crecimiento de bacterias aerobias mesófilas ni de hongos.

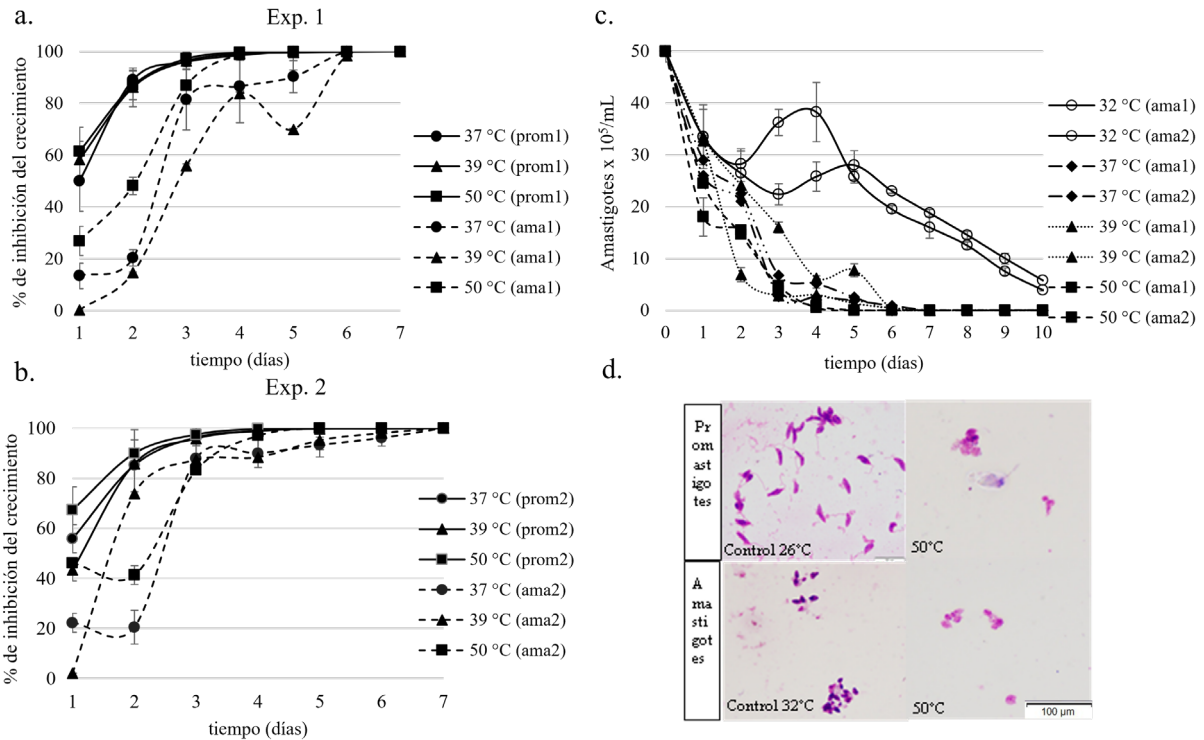
**Eficacia *in vivo***

Las cremas C1, C2, C3, C4 (de miel de abejas, café) no se evaluaron por la inactividad que mostraron sus compuestos en modelos *in vitro* (CI<sub>50</sub> <300 µg/mL). La crema C5 (café + ribavirina) estabilizó el tamaño de las lesiones, mostrando reducciones del 31% (Fig. 4). El tratamiento con C6 (azitromicina), C7 (*C. sativa*) y C8 (THC) no fue efectivo, sin embargo, el incremento de las lesiones fue significativamente menor que el control no tratado (*p* < 0,03). Las lesiones tratadas con el gel G1 (1,0% de NFX) aumentaron del 4 al 70% y las tratadas con G2 (0,5 NFX) aumentaron del 26 al 150%. Los tratados con U1 más calor mostraron un ligero control durante el tratamiento, sin embargo, después de éste, las lesiones aumentaron gradualmente del 17 al

120%. Los ratones tratados con U2 (Sb<sup>III</sup>/celecoxib) mostraron una reducción completa de la lesión a partir del día 129 con presencia de una costra necrótica de bordes eritematosos a la primera semana de tratamiento (Fig. 4). Al final del seguimiento se observó cura estética completa. El tratamiento con U2 (celecoxib) mantuvo estable las lesiones con un incremento del 11 al 31% en los últimos días de seguimiento mientras que el U2 (Sb<sup>III</sup>) mantuvo una disminución del tamaño de las lesiones del 2 al 30% en los tiempos evaluados (Fig. 4) Al análisis histopatológico, el tratamiento con el U2 (Sb<sup>III</sup>/celecoxib) mostró leve acantosis e infiltrado inflamatorio y la presencia de pocos amastigotes. En piel no infectada mostró ausencia de signos de irritación en epidermis-dermis (Fig. S3).

**Algunos productos utilizados en la MT mostraron actividad antioxidante**

Los compuestos de la MT en su orden café > miel abeja (caucho) > *C. sativa* > THC > tratamiento veterinario (SDS) mostraron porcentajes de captación del radical DPPH



superiores al 40% con valores de  $85,4 \pm 7,5\%$  (café),  $67,6 \pm 13,9$  (miel de abejas de caucho),  $63,5 \pm 2,2\%$  y  $66,2 \pm 2,8\%$  (*C. sativa* y THC), y de  $61,8 \pm 0,7\%$  para la fracción SDS del tratamiento veterinario (TV) a la mayor concentración evaluada. Se demostró un efecto de dosis respuesta con una potencia en la inhibición del radical de  $CE_{50}$   $37,4 \pm 3,9$ ;  $118,1 \pm 19,5$ ;  $156,0 \pm 50,1$ ;  $36,7 \pm 3,1$   $\mu\text{g/mL}$  y  $12,6 \pm 7,4\%$  respectivamente. La cera de abejas, la miel de abejas (roble), el TV y la cafeína (99% pureza) alcanzaron porcentajes de captación menores del 40%. Con respecto a los compuestos candidatos a reposicionamiento ninguno mostró un porcentaje de captación del radical superior al 20% (Tabla S1). Ninguno de los compuestos tuvo un porcentaje de captación o  $CE_{50}$  mayor o igual al control antioxidante de ácido ascórbico ( $p < 0,05$ ) el cual fue de  $18,07 \pm 5,10$   $\mu\text{g/mL}$ .

## DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que tanto el extracto de *C. sativa* como su componente principal, el THC, mostraron actividad frente a promastigotes y en menor medida contra amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*. La actividad de cannabinoides, incluido el THC ha sido demostrada contra las formas libres de algunas especies de *Leishmania* (Radwan et al., 2008). Ambos compuestos también mostraron actividad antioxidante con valores similares o mayores a los encontrados en otros estudios (Hacke et al., 2019, Cásedas et al., 2022). Sin

embargo, en los ratones tratados con las cremas de *C. sativa* y THC las lesiones aumentaron, aunque en menor medida comparada al control no tratado. Igualmente, extractos de *C. sativa* han mostrado actividad contra hongos y bacterias patógenas (Schofs et al., 2021). En términos de citotoxicidad, valores de  $CC_{50}$  de 32 a 36  $\text{mg/mL}$  en células J774, y actividad hemolítica de 109,4  $\mu\text{g/mL}$  han sido reportados (Mehwish et al., 2019). En estudios de *docking* molecular, el delta-9-THC, óxido de cariofileno y cannabidiol exhibieron las mejores energías de unión con los sitios activos de la arginasa de *Leishmania*, enzima clave en la vía biosintética de las poliaminas (Assouab et al., 2022).

De los compuestos candidatos de reposicionamiento, el NFX fue el más potente frente en promastigotes ( $CI_{50}$  1,1) y amastigotes intracelulares ( $CI_{50}$  7,4), con una citotoxicidad de  $CC_{50}$  de 47,2  $\mu\text{g/mL}$ . Actividades similares han sido reportadas en promastigotes de *L. tropica* ( $CI_{50}$  1,0 - 3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) (Berman y Lee, 1983). Estudios recientes mostraron la actividad inhibitoria de compuestos análogos como la nitrofurantoína y el nifuratel en *Leishmania* con valores de  $CI_{50}$  0,6 a 34,4  $\mu\text{M}$ ; para el nifuratel se reportó además sinergismo con MTF (Melcon-Fernandez et al., 2023). El NFX es un fármaco activo contra el *Trypanosoma cruzi* utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Cerecetto y González, 2011). El tratamiento con el gel de NFX no fue efectivo, sin embargo, experimentos con mayores dosis o vehiculización del NFX son recomendadas. No encontramos estudios similares en modelos de LC, a pesar de

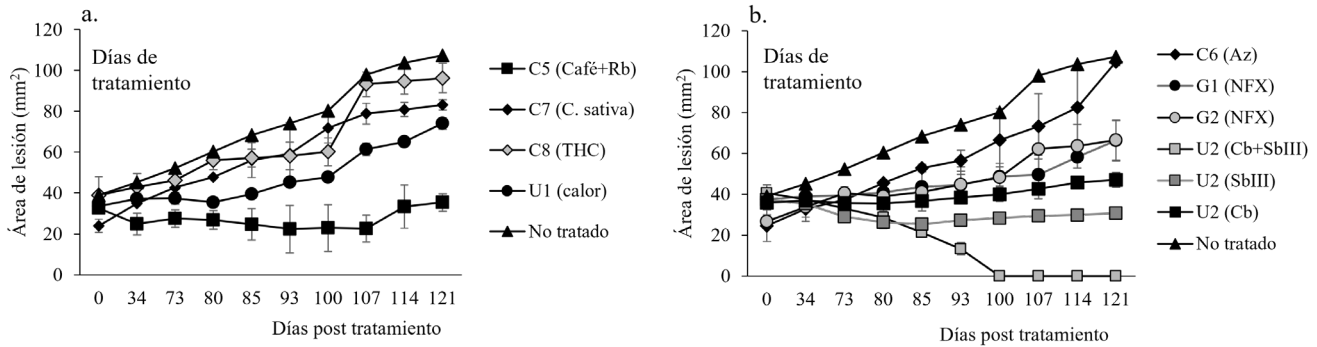


Fig. 4. Seguimiento de ratones infectados con *L. amazonensis* tratados con formulaciones tópicas de los compuestos y con el control (No tratado). Se muestran el tamaño del área de las lesiones (mm<sup>2</sup>) desde el inicio del tratamiento (día 0) hasta finalizar el seguimiento post tratamiento (día 121, semana 12 post tratamiento). Rb. Ribavirina, Az. Azitromicina, NFX. Nifurtimox, Cb. Celecoxib.

que su actividad antileishmania fue demostrada en estudios iniciales donde el tratamiento con NFX oral mostró una eficacia clínica en el 60% de pacientes con LC y LMucosa (Guerra et al., 1981). El Sb<sup>III</sup>, mostró actividad frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, con una toxicidad en células de CC<sub>50</sub> de 75 µg/mL. A diferencia del Sb<sup>V</sup>, el Sb<sup>III</sup> es altamente tóxico para los parásitos, mientras que el Sb<sup>V</sup> resulta la forma menos tóxica para los pacientes (Ephros et al., 1999). La potencia del Sb<sup>III</sup> ha sido demostrada en promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* y también en líneas celulares como Hep2, Vero y renales correlacionada con los eventos adversos de los Sb como la hepato y nefro toxicidad (Haldar et al., 2011). Los resultados encontrados con el celecoxib también fueron interesantes. Este fármaco es un inhibidor de la ciclooxygenasa-2 conocido por sus propiedades antiinflamatorias, pero también por su actividad antimicrobiana contra diversos patógenos, incluyendo hongos y bacterias (Yang et al., 2021). Debido a sus propiedades, como bajo peso molecular y pKa entre uno y tres podría ser un buen candidato para su reformulación vía tópica (Yang et al., 2021). En este trabajo se observó una actividad diferencial entre la presentación comercial y la de grado reactivo siendo esta última más activa y selectiva. No encontramos reportes de estudios similares con el celecoxib. La azitromicina por otro lado es una azida y antibiótico macrólido que logra una alta concentración en células particularmente en los macrófagos la célula hospedera de la *Leishmania*. Su presentación comercial mostró una actividad reducida en promastigotes y mayor toxicidad en células. La presentación grado reactivo mostró mayor potencia en promastigotes (CI<sub>50</sub> de 55 µg/mL). Estudios iniciales demostraron la potencia en amastigotes intracelulares de *L. major* (Krolewiecki et al., 2002), *L. braziliensis* y *L. amazonensis* (de Oliveira-Silva et al., 2008). Sin embargo, en nuestro estudio este fármaco no mostró actividad en las formas intracelulares y la crema fue efectiva en los ratones. Diferencias en los ensayos, clones de parásitos, podrían estar involucrados.

Por otro lado, los ratones tratados tópicamente con la combinación Sb<sup>III</sup>/celecoxib mostraron una reducción completa

del área de la lesión en todos los animales. El ungüento de Sb<sup>III</sup>, mayormente, pero también el de celecoxib estabilizaron el tamaño de las lesiones. Se observó leve acantosis e hiperqueratosis en la epidermis, necrosis moderada y abundante infiltrado inflamatorio en la dermis. Se requieren estudios complementarios orientados disminuir su toxicidad. La combinación de un fármaco antileishmania y un antiinflamatorio podría ser una alternativa útil en LC. Combinaciones de PM + anticuerpos anti-TNF-α para controlar la respuesta inflamatoria local en ratones BALB/c y la MTF+ factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) han sido evaluadas (Mendes et al., 2021).

En el presente trabajo se evaluaron tres productos muy importantes de la MT, la miel, la cera de abejas y el café. La miel de abejas ha sido utilizada por la MT a lo largo de los siglos debido a su amplio espectro de propiedades que incluyen sus efectos antitusivos, antibacterianos, antimicrobianos, cicatrizante, antiinflamatoria, los cuales pueden variar en función del origen floral de la miel (Alvarez-Suarez, 2017). Estas y sus propiedades fisicoquímicas (dureza, PF, pH entre otras) las hacen aptas de ser utilizadas como componentes de formulaciones tópicas para la LC. Aunque la miel no mostró actividad contra los parásitos, tampoco resultó ser tóxica. Un estudio reciente mostró que geles enriquecidos con miel a base de alginato y un alcohol graso fueron estables y mantuvieron la hidratación de la piel al ser utilizados en el cerramiento de heridas (Hossain et al., 2023). La cera de abejas gracias a sus propiedades aislantes, alto punto de fusión y aplicaciones que incluyen la fabricación de velas, el sellado térmico de alimentos y la protección industrial son aptas para ser utilizadas en diversos productos médicos y cosméticos, como cremas y ungüentos y tratamientos térmicos (Saralaya et al., 2021). El café, por otro lado, cuyo grano proviene de la planta de *Coffea arabica* L, se utiliza para mejorar el estado de ánimo, combatir la fatiga, aumentar los niveles de energía, ayudar a la digestión y aliviar el dolor. Además, el grano y hojas se ha utilizado en la MT para tratar la diarrea y la malaria (Chen, 2019). Sobre la actividad antioxidante se conoce que el café preparado



tiene capacidades antioxidantes que oscilan entre  $CE_{50}$  0,4 y 37,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo algunos de sus componentes como el ácido clorogénico, acetato de kahweol, cafestol, y la cafeína los involucrados en su actividad antioxidante (Złotek et al., 2016). En nuestro trabajo el café mostró una actividad antioxidante en rangos similares de  $CE_{50}$  37,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sin embargo la cafeína no mostró actividad antioxidante ( $CE_{50}$  300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se conoce que la capacidad antioxidante del café está influenciada por el tipo de grano, las condiciones de procesamiento postcosecha y el proceso de extracción entre otros (Liang y Kitts, 2014; Bedoya-Ramírez et al., 2017). Importante también en este trabajo es que se pudieron preparar formulaciones tópicas estables para ser aplicadas sobre las lesiones de LC inducidas en los ratones. Aunque el efecto de algunas se restringió a mantener el tamaño de las lesiones o disminuir el tamaño de las lesiones en porcentajes bajos pero importantes. Adicional a los resultados anteriormente descritos, también la crema de café/ribavirina mostró una reducción importante al inicio del tratamiento. No encontramos estudios del uso de la ribavirina en LC, fármaco antiviral empleado en el tratamiento de hepatitis C (Hézode, 2018). Estos resultados muestran que la ribavirina podría ser un candidato cambiando las condiciones p.ej. utilizando otros PPP, concentraciones mayores, etc.

Es en este trabajo demostramos también el efecto del calor en la viabilidad de los parásitos y las células. El uso de cucharas u objetos metálicos calentados, como tenedores y cucharas, es uno de los métodos de tratamiento alternativo más utilizados para la LC en zonas rurales de Ecuador y Colombia (Valadeau et al., 2009; Patiño-Londoño et al., 2017). La temperatura es un factor importante en el dimorfismo de *Leishmania* en sus diversos hospederos (mosquita, mamífero). La temperatura es importante en el tropismo de las especies de *Leishmania*, sea por piel u órganos durante la transmisión al hospedero mamífero. Algunos estudios sobre la sensibilidad a la temperatura de los promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* muestran que las especies viscerales (*L. donovani* y *L. infantum*) son resistentes a temperaturas de 37 a 40 °C, las especies cutáneas presentan pequeñas diferencias en sus susceptibilidades al calor (*L. mexicana* > *L. braziliensis*, > *L. panamensis* > *L. amazonensis*) y las especies del Viejo Mundo son más resistentes a la temperatura que las del NM (Callahan et al., 1996). Los promastigotes de *L. peruviana* mostraron crecimiento a 26 °C y pérdida del 100% de viabilidad a los 40 °C entre los días dos y ocho, donde además se encontró que las proteínas de choque térmico aumentaban la fosforilación disminuyendo su capacidad infectiva *in vitro* (Hlavacova et al., 2013; Hombach-Barrigah et al., 2019). En *Lutzomyia* un estudio encontró que el nicho ecológico de *Lu. peruensis*, podría cambiar en escenarios de cambio climático en Perú, observándose una disminución en la distribución de la especie (Moo-Llanes et al., 2017). Por otro lado, se sugiere que la distribución potencial de *Lu. longipalpis*, una especie de flebótomo incriminada en la transmisión de *Leishmania* involucradas en la LV podría expandirse en escenarios climáticos futuros

(Peterson et al., 2017). Sobre los amastigotes axénicos, no encontramos estudios que muestren el impacto de altas temperaturas, sin embargo, es conocido que para la generación de amastigotes axénicos a partir de promastigotes en cultivo en especies como *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* los parámetros utilizados muestran variaciones considerables en temperatura que van desde 31 a 37 °C (Dias-Lopes et al., 2021). La termoterapia es una estrategia utilizada en el tratamiento de la LC en el Viejo Mundo como la crioterapia utilizando por ejemplo nitrógeno líquido para cauterizar las lesiones (Ranawaka et al., 2011). En LC-NM, la termoterapia con calor ( $52 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ha mostrado resultados prometedores utilizando solo o combinado con otros tratamientos con MTF y  $\text{Sb}^{\text{V}}$  (Valencia et al., 2013; López et al., 2022). Es recomendada como tratamiento en casos donde no hay diseminación mucosa, mujeres embarazadas, o contraindicaciones a los tratamientos sistémicos (Cardona-Arias et al., 2018).

## CONCLUSIONES

El compuesto antileishmania, *in vitro*, más potente fue el NFX seguido del THC, celecoxib,  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , *C. sativa*, ribavirina, azitromicina. Las formulaciones tópicas que contuvieron los compuestos fueron estables y de fácil preparación, aunque *in vivo* la efectividad estuvo restringida a estabilizar el crecimiento de las lesiones, o mostrar crecimiento menor que los controles sin fármacos. La excepción fue el ungüento U2 ( $\text{Sb}^{\text{III}}$  y celecoxib) que, pese a su leve toxicidad, inhibió las lesiones de LC en los ratones y abre la puerta a posibles combinaciones sinérgicas que podrían potenciar la eficacia terapéutica mientras se minimizan los efectos adversos. Estos hallazgos en general son prometedores, ya que subrayan la necesidad de hacer estudios complementarios orientados a mejorar la dosificación, formulación, determinación de permeabilidad, tratamientos combinados (tópico más sistémico con medicamentos de referencia), entre otros.

## PARTICIPACIÓN DE AUTORES

Escobar, P.: Conceptualización, metodología, validación, análisis formal, investigación, curación de datos, recursos, redacción: preparación del borrador original, revisión y edición del manuscrito, supervisión, adquisición de fondos.

Peña, D.P.: Conceptualización, metodología, validación, análisis formal, investigación, curación de datos, redacción: preparación del borrador original, revisión y edición del manuscrito.

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de jóvenes investigadores e innovadores del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Minciencias), convenios N° 417 de 2017 y 821 del 2018, a la Universidad Industrial de Santander. A Minciencias, Mineducación, Mincomercio

e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores participantes del manuscrito declaramos que no existen conflictos de interés que puedan influir en los resultados o la interpretación de este estudio.

## REFERENCIAS

- Alvarez-Suarez, J. M. (2017). *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1>
- Andrade-Neto, V. V., Cunha-Junior, E. F., Dos Santos Faiões, V., Pereira, T. M., Silva, R. L., Leon, L. L. and Torres-Santos, E. C. (2018). Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 23(5), 967-996. <https://doi.org/10.2741/4629>
- Assouab, A., El Filaly, H. and Akarid, K. (2022). Inhibiting human and leishmania arginases using *Cannabis sativa* as a potential therapy for cutaneous leishmaniasis: a molecular docking study. *Trop Med Infect Dis*, 7(12), 400. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7120400>
- Bedoya-Ramírez, D., Cilla, A., Contreras-Calderón, J. and Alegría-Torán, A. (2017). Evaluation of the antioxidant capacity, furan compounds and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of commercial Colombian coffee. *Food Chem*, 219, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.159>
- Berman, J. D. and Lee, L. S. (1983). Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg*, 32(5), 947–951. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.947>
- Callahan, H. L., Portal, I. F., Bensinger, S. J. and Grogl, M. (1996). *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. *Exp Parasitol*, 84(3), 400–409. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0128>
- Cardona-Arias, J. A., López-Carvajal, L., Tamayo-Plata, M. P. and Vélez, I. D. (2018). Comprehensive economic evaluation of thermotherapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *BMC Public Health*, 18(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5060-2>
- Cásedas, G., Moliner, C., Maggi, F., Mazzara, E. and López, V. (2022). Evaluation of two different *Cannabis sativa* L. extracts as antioxidant and neuroprotective agents. *Front Pharmacol*, 13, 1009868. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1009868>
- Cerecetto, H. and González, M. (2011). Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism. *Future Microbiol*, 6(8), 847–850. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.74>
- Charlton, R. L., Rossi-Bergmann, B., Denny, P. W. and Steel P. G. (2018). Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology*, 145(2), 219-236. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000993>
- Chen X. (2019). A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(6), 1008–1025. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546667>
- de Oliveira-Silva, F., de Morais-Teixeira, E. and Rabello, A. (2008). Antileishmanial activity of azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, 78(5), 745–749. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.745>
- Dias-Lopes, G., Zabala-Peñafiel, A., de Albuquerque-Melo, B. C., Souza-Silva, F., Menaguali do Canto, L., Cysne-Finkelstein, L. and Alves, C. R. (2021). Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies. *Acta Trop*, 220, 105956. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105956>
- Ephros, M., Bitnun, A., Shaked, P., Waldman, E. and Zilberstein, D. (1999). Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(2), 278–282. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.2.278>
- Guerra, M. F., Marsden, P. D., Cuba, C. C. and Barretto, A. C. (1981). Further trials of nifurtimox in mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75(3), 335–337. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90086-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90086-9)
- Hacke, A. C. M., Lima, D., de Costa, F., Deshmukh, K., Li, N., Chow, A. M., Marques, J. A., Pereira, R. P. and Kerman, K. (2019). Probing the antioxidant activity of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in *Cannabis sativa* extracts. *Analyst*, 144(16), 4952–4961. <https://doi.org/10.1039/c9an00890j>
- Haldar, A. K., Sen, P. and Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int*, 2011, 571242. <https://doi.org/10.4061/2011/571242>
- Hézode C. (2018). Treatment of hepatitis C: Results in real life. *Liver Int*, 38(Suppl 1), 21–27. <https://doi.org/10.1111/liv.13638>
- Hlavacova, J., Votypka, J. and Volf, P. (2013). The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. *J Med Entomol*, 50(5), 955–958. <https://doi.org/10.1603/ME13053>
- Hombach-Barrigah, A., Bartsch, K., Smirlis, D., Rosenqvist, H., MacDonald, A., Dingli, F., Loew, D., Späth, G. F., Rachidi, N., Wiese, M. and Clos, J. (2019). *Leishmania donovani* 90 kD heat shock protein - impact of phosphosites on parasite fitness, infectivity and casein kinase affinity. *Sci Rep*, 9(1), 5074. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41640-0>
- Hossain, M. L., Lim, L. Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D. and Locher, C. (2023). Design, preparation, and

- physicochemical characterisation of alginate-based honey-loaded topical formulations. *Pharmaceutics*, 15(5), 1483. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics1505148>
- Krolewiecki, A., Leon, S., Scott, P. and Abraham, D. (2002). Activity of azithromycin against *Leishmania major* in vitro and in vivo. *Am J Trop Med Hyg*, 67(3), 273–277. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.273>
- Liang, N. and Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- López, L., Valencia, B., Alvarez, F., Ramos, A. P., Llanos-Cuentas, A., Echevarria, J., Vélez, I., Boni, M., Rode, J., Quintero, J., Jiménez, A., Tabares, Y., Méndez, C. and Arana, B. (2022). A phase II multicenter randomized study to evaluate the safety and efficacy of combining thermotherapy and a short course of miltefosine for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in the New World. *PLoS Negl Trop Dis*, 16(3), e0010238. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010238>
- Mehwish, S., Islam, A., Ullah, I., Wakeel, A., Qasim, M., Khan, M. A., Ahmad, A. and Ullah, N. (2019). *In vitro* antileishmanial and antioxidant potential, cytotoxicity evaluation and phytochemical analysis of extracts from selected medicinally important plants. *Biocatal Agric Biotechnol*, 19, 101117. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101117>
- Melcon-Fernandez, E., Galli, G., García-Estrada, C., Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M. and Pérez-Pertejo, Y. (2023). Miltefosine and nifuratel combination: a promising therapy for the treatment of *Leishmania donovani* visceral leishmaniasis. *Int J Mol Sci*, 24(2), 1635. <https://doi.org/10.3390/ijms24021635>
- Mendes, L., Guerra, J. O., Costa, B., Silva, A. S. D., Guerra, M. D. G. B., Ortiz, J., Doria, S. S., Silva, G. V. D., de Jesus, D. V., Barral-Netto, M., Penna, G., Carvalho, E. M. and Machado, P. R. L. (2021). Association of miltefosine with granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: A randomized and controlled trial. *Int J Infect Dis*, 103, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.183>
- Moo-Llanes, D. A., Arque-Chunga, W., Carmona-Castro, O., Yañez-Arenas, C., Yañez-Trujillano, H. H., Cheverría-Pacheco, L., Baak-Baak, C. M. and Cáceres, A. G. (2017). Shifts in the ecological niche of *Lutzomyia peruensis* under climate change scenarios in Peru. *Med Vet Entomol*, 31(2), 123–131. <https://doi.org/10.1111/mve.12219>
- Neira, L. F., Peña, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C. y Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de *Leishmania Viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 51(1), 33–42. <https://doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019004>
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*, 52(1):1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Odonne, G., Houël, E., Bourdy, G. and Stien, D. (2017). Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedical concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. *J Ethnopharmacol*, 199, 211–230. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.048>
- Pan American Health Organization. (2022). Guideline for the treatment of leishmaniasis in the Americas. Second edition. Washington, DC. Available from: <https://doi.org/10.37774/9789275125038>
- Patiño-Londoño, S. Y., Salazar, L. M., Acero, C. T. and Bernal, I. D. V. (2017). Aspectos socioepidemiológicos y culturales de la leishmaniasis cutánea: concepciones, actitudes y prácticas en las poblaciones de Tierralta y Valencia, (Córdoba, Colombia). *Salud Colect*, 13(1), 123–138. <https://doi.org/10.18294/sc.2017.1079>
- Peterson, A. T., Campbell, L. P., Moo-Llanes, D. A., Travi, B., González, C., Ferro, M. C., Ferreira, G. E. M., Brandão-Filho, S. P., Cupolillo, E., Ramsey, J., Leffer, A. M. C., Pech-May, A. and Shaw, J. J. (2017). Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Psychodidae: Phlebotominae). *Int J Parasitol*, 47(10–11), 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.04.007>
- Pineda-Reyes, Roberto, Llanos-Cuentas, Alejandro, & Dancuart, Mauricio. (2015). Tratamientos tradicionales utilizados en un área endémica de Leishmaniasis cutánea en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(4), 761–765. Recuperado en 15 de febrero de 2025, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342015000400020&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000400020&lng=es&tlng=es)
- Ranawaka, R. R., Weerakoon, H. S. and Opathella, N. (2011). Liquid nitrogen cryotherapy on *Leishmania donovani* cutaneous leishmaniasis. *J Dermatolog Treat*, 22(4), 241–245. <https://doi.org/10.3109/09546631003762654>
- Radwan, M. M., Ross, S. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Zulfikar, F. and Elsohly, M. A. (2008). Isolation and characterization of new *Cannabis* constituents from a high potency variety. *Planta Med*, 74(3), 267–272. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1034311>
- Salazar-Villamizar, M. E. and Escobar, P. (2022). *In vitro* selection of ketoconazole-pentamidine-resistant *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Exp Parasitol*, 233, 108206. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108206>
- Salgado-Almario, J., Hernández, C. A. and Ovalle, C. E. (2019). Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985–2017. *Biomedica*, 15(2), 278–290. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312>
- Saralaya, S., Jayanth, B, Thomas, N. S. and Sunil, S. M. (2021). Bee wax and honey-a primer for OMFS. *Oral Maxillofac Surg*, 25(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10006-020-00893-0>

- Schofs, L., Sparo, M. D. and Sánchez Bruni, S. F. (2021). The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacol Res Perspect*, 9(2), e00761. <https://doi.org/10.1002/prp2.761>
- Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Albán-Castillo, J., Estevez, Y., Lores, F. A., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D. and Bourdy, G. (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J Ethnopharmacol*, 123(3), 413-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.041>
- Valencia, B. M., Miller, D., Witzig, R. S., Boggild, A. K. and Llanos-Cuentas, A. (2013). Novel low-cost thermotherapy for cutaneous leishmaniasis in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(5), e2196. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002196>
- Weigel, M. M., Armijos, R. X., Racines, R. J., Zurita, C., Izurieta, R., Herrera, E. and Hinojsa, E. (1994). Cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador: popular perceptions, knowledge, and treatment. *Bull Pan Am Health Organ*, 28(2), 142-155.
- Xue, H., Li, J., Xie, H. and Wang, Y. (2018). Review of drug repositioning approaches and resources. *Int J Biol Sci*, 14(10), 1232-1244. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>
- Yang, B., Mei, Y., Li, Q., Zhang, M., Tang, H., Liu, T., Feng, F., Fu, Q., Jiang, Y. and Ye, Q. (2021). Repurposing celecoxib analogues as leads for antibiotics. *Future Med Chem*, 13(11), 959-974. <https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0030>
- Złotek, U., Karaś, M., Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B. and Jakubczyk, A. (2016). Antioxidant activity of the aqueous and methanolic extracts of coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 15(3), 281-288. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.3.27>